

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Katedra botaniky



Epifytické vláknité sinice: studium morfologické variability a 16S rRNA genu
Bc. Tomáš Fryč

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.
Olomouc 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Hašlera, Ph.D. a použil jsem výhradně prameny uvedené v seznamu literatury.

v Olomouci dne 30. 6. 2015

podpis:

Poděkování

Mé poděkování patří především doc. RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D. za přátelský přístup a poskytování odborných rad a připomínek při vypracování této práce. Dále můj dík náleží Mgr. Petru Dvořákovi, Ph.D. za pomoc při molekulární analýze kmenů a konzultace s touto prací spojenou. Rovněž děkuji své rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

Bibliografická identifikace

Jména a příjmení autora: Tomáš Fryč

Název práce: Epifytické vláknité sinice: studium morfologické variability a 16S rRNA genu

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP

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

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Tato diplomová práce se zabývá epifytickými sinicemi, jejich taxonomií, morfologickou a genetickou variabilitou. Teoretická část představuje souhrn soudobých poznatků týkajících se systematické problematiky rodů *Pseudanabaena* a *Phormidium* vydaných v impaktovaných vědeckých publikacích. Pozornost je věnována především implementaci molekulárních metod do systematiky sinic. Praktickou část reprezentuje vlastní hydrobiologické šetření zkoumající variabilitu a diverzitu epifytických sinic ve stojatých vodách na Opavsku a Olomoucku. Kmeny získané kultivací z vybraných lokalitách byly podrobeny morfologické a molekulární analýze.

Klíčová slova: epifytické sinice, taxonomie, morfologická variabilita, 16S rRNA gen

Počet stran: 81

Počet příloh: 2

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Tomáš Fryč

Title: Epiphytic filamentous cyanobacteria: study of morphological variability and 16S rRNA gene

Type of thesis: Master

Department: Department of Botany

Supervisor: Doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract: This thesis provides characteristics about epiphytic cyanobacteria, their taxonomy, morphological and genetic variability. The theoretical part presents a summary of current knowledge regarding the systemic problems of families *Pseudanabaena* and *Phormidium* published in prestigious scientific publications. Attention is dedicated to the implementation of molecular methods in systematics of cyanobacteria. The practical part represents own hydrobiological investigation examining the variability and diversity of epiphytic Cyanobacteria in stagnant waters in Opava and Olomouc region. Culturing strains were obtained from selected locations and were subjected to morphological and molecular analysis.

Numer of pages: 81

Numer of appendices: 2

Language: Czech

Obsah

1 Úvod	7
2 Phormidium.....	8
2.1 Taxonomie	8
2.2 Genetická variabilita	10
2.3 Fyziologie a využití.....	13
3 Pseudanabaena	16
3.1 Úvod.....	16
3.2 Taxonomie	16
3.3 Genotypová a fenotypová variabilita	19
3.4 Ekofyziologické vlastnosti	21
4 Cíle práce	24
5 Metodika práce	25
6 Výsledky	31
7 Diskuze	39
8 Závěr	44
9 Literatura.....	45

1 Úvod

Jen málokterá skupina organismů vyvolává ve všeobecném povědomí tak rozporuplné pocity jako právě sinice. Rody jako *Microcystis*, nebo *Aphanizomenon* vytváří v důsledku eutrofizace nápadné biofilmy na vodní hladině, známé též jako vodní květy, představující běžný ekologický problém. Naproti tomu značným přínosem pro rozvoj života na Zemi a pozdější kolonizaci terestrického prostředí bylo spuštění foto-autotrofie sinicemi před 3,5 mld. let, čímž začalo docházet k úniku kyslíku do atmosféry a tím vzniku kyslíkem obohaceného plynného obalu Země. Sinice rovněž představují díky rozmanitému sekundárnímu metabolismu perspektivní nástroj v biotechnologiích pro výrobu řady produktů, a to nejen farmaceutických přípravků.

Zvláštní, ekologicky vyhraněnou skupinou zůstávají sinice epifytické. Termínem epifyton jsou označovány taxony, které trvale žijí na povrchu ponořených částí rostlin, zpravidla makrofyt a to bez parazitického způsobu života. Jedná se o složitou interakci, jež není dodnes plnohodnotně prozkoumána a vysvětlena. Epifyté se zpravidla ukotvují na povrchu hostitelských buněk dvěma způsoby: v prvním případě se váží k vnějším vrstvám buněk, pak se jedná o tzv. holoeipifytismus, typickým příkladem je *Leibleinia nordgaardii*, případně se zanoří hluboko do pletiva, či tkání, pak jsou označovány jako amfieipifyté, jako je tomu u *Homoethrix* (Ducker and Knox, 1984).

Druhy žijící tímto způsobem života lze nalézt napříč různými rody. Po dlouhou dobu unikaly pozornosti algologů, případně zůstávaly v pozadí zájmu. V současnosti se však stále častěji ukazuje, že jsou důležitou součástí ekosystémů stojatých vod.

2 Phormidium

2.1 Taxonomie

Morfologické taxonomie

Rod *Phormidium* Kützing ex Gomont (1892) poprvé popsal Kützing (1843). Je charakterizován na základě morfologických znaků jakými jsou metrické vlastnosti a tvorba hyalinní, či rozplývavé slizové pochvy, díky níž se tato vlákna často seskupují do nápadných hustých povlaků. Rod je druhově bohatý, jednotliví zástupci obývají sladkovodní i mořské habitáty, liší se rovněž velikostí buněk, tvarem apikální buňky, nebo zaškrcováním.

Rod *Phormidium* byl revidován v monografii Maurice Gomont's Monographie des Oscillatoriales (1892). Práce Gomonta je považována za prvotní (starting point) v taxonomii vláknitých sinic netvořících heterocyty. Gomontův systém byl posléze opakovaně revidován Geitler (1932), Frémy (1934) a Desikachary (1959). V uvedených publikacích představovala slizová pochva stěžejní determinační kritérium, což však často vedlo k nesprávnému určení, rovněž takto definované *Phormidium* odpovídalo více entitám.

Na základě pozdějšího zjištění, že fenotypy představují výsledek spolupůsobení genotypu a prostředí, pozměnil Drouet (1968) radikálně klasifikaci řádu Oscillatoriales. Výsledkem byla drastická redukce počtu rodů a druhů řadou algologů považována za neakceptovatelnou (Anagnostidis and Komárek 1985), tato taxonomická zjednodušení byla navíc později experimentálně vyvrácena jako neplatná (Stam and Venema 1977; Castenholz and Waterbury 1989).

Klasifikace rodu *Phormidium* v současnosti prochází zásadními změnami s ohledem na aplikaci molekulárních metod. Rod se postupně štěpí se vznikem nových rodů. Jako hlavní kritérium štěpení se jeví molekulární odlišnosti v rámci dosud popsaných morfotypů.

LPP group B

Organismy s problematickou taxonomií *Leptolyngbya/Phormidium/Plectonema* a *Lyngbya* byly Ripkou et al. (1979) začleněny do LPP group B. Současný Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, jenž přijal LPP group B (Castenholz 2001), tak představuje kompilaci bakteriologického přístupu (Rippka et al. 1979) a fyziologických charakteristik (Geitler 1932). Největší revize LPP group B byla provedena Anagnostidis and Komárek (1988) a Komárek and Anagnostidis (2005) představením nových kritérií jakými jsou velikost buněk, charakter buněčného dělení, mobilita a typ rozpadu vláken.

Biochemická klasifikace

Řada studií klasifikovala sinice na základě přítomnosti specifických fotosyntetických pigmentů (Liaaen–Jensen 1979; Aakermann et al. 1992; Hirschberg and Chamovitz 1994; Karsten and Garcia–Pichel 1996). Například byla vypracována chemotaxonomie rodu *Spirulina* Turpin ex Gomont 1892, *Oscillatoria* Vaucher ex Gomont 1892 a *Microcoleus* Desmazières ex Gomont 1892. (Liaaen–Jensen 1979; Aakermann et al. 1992; Karsten and Garcia–Pichel 1996). Sinice produkují stejné karoteny jako vyšší rostliny, nicméně vytváří též některé specifické xantofyly jako například echinenon. Ačkoliv morfologické charakteristiky jsou chemicky podmíněny, chemické charakteristiky zpravidla neodpovídají morfologii (Liaaen–Jensen 1979). Omezené množství karotenoidů ve vláknech rodu *Phormidium* vykazuje určitý stupeň příbuznosti. Analýza karotenoidů u četných rodů sinic prokázala, že se jedná o vhodné biochemické kritérium pro zařazení do rodové příslušnosti, některé druhy sinic často vykazují stejné složení. Nicméně pro *Phormidium* tato vlastnost není zcela platná, jednotlivá vlákna vykazují rozdílná karotenová složení, toto kritérium však může být adekvátní pro rozčlenění rodu *Phormidium* na podrody. Shodným znakem všech vláken napříč rodem *Phormidium* je přítomnost zeaxantinu a B-karotenu, čímž se však vlákna tohoto rodu neliší od vláken rodu *Leptolyngbya*.

Polyfázický přístup

Střídavé užívání dvou různých přístupů, botanického a bakteriologického, vedlo k nepřehledné situaci v mnoha rodech sinic. S ohledem na vědecké zaměření autorů některé druhy byly charakterizovány spíše morfologicky a jiné naopak s posílením molekulárních dat na úkor morfologického popisu (Wilmotte and Herdman, 2001; Rajaniemi et al., 2005). Posledních 30 let se tak vytvářel systém nový, který by představoval jistý kompromis mezi dvěma dříve užívanými přístupy (Oren, 2004; Komárek, 2005, 2010; Marquardt and Palinska, 2007; Oren et al., 2009).

V současnosti se povětšinou užívá tzv. polyfázický přístup (García-Pichel et al., 2001; Komárek, 2005, 2010; Palinska and Marquardt, 2008). Ten spočívá v morfologickém, submikroskopickém, biochemickém, fyziologickém a molekulárním popisu jednotlivých druhů.

2.2 Genetická variabilita

Gen 16S rRNA a oblast 16S – 23S ITS jsou používány jako vhodné molekulární markery pro všechna prokaryota (Iteman et al., 2000; Casamatta et al., 2005; Premanandh et al., 2006; Palinska and Marquardt, 2008). Analýzou výše zmíněných úseků a jejich srovnáním s morfologií a ekologií studovaných druhů byla popsána celá řada nových rodů a druhů sinic. V dnešní době se jedná o plně zavedenou metodu klasifikace sinic, která je široce akceptovaná.

CpcB-IGS-CpcA oblast (kódující část operonu fykocyaninu), rpoC1 gen (kódující c podjednotky RNA polymerázy), GyrB gen (kódující b podjednotky DNA gyrázy, topoizomerázy typu II), a gen rbcL (kódující velké podjednotky ribulosa 1,5-bisfosfát karboxylázy/oxygenázy, enzym kontrolní fixace CO₂ Calvinova cyklu) jsou oblasti, na jejichž základě se ustanovují fylogenetické vztahy mezi sinicemi. (Toledo and Palenik, 1997; Fergusson and Saint, 2000; Wilson et al., 2000; Watanabe et al., 2001; Seo and Yokota, 2003; Teneva et al., 2005; Premanandh et al., 2006; Tomitani et al., 2006; Ballot et al., 2008). Dříve byl pro tyto účely sekvenován gen nifD. (Henson et al., 2004).

Užívání rozdílných molekulárních markerů vede k sestavení řady fylogenetických stromů. Tyto markery lze zařadit do dvou na sobě nezávislých skupin: první z nich zahrnuje geny 16S rRNA, rpoC1 and gyrB geny, které jsou zodpovědné za replikaci a translaci genetické informace a druhá skupina rbcL and nifD geny, které spoluzodpovídají především za fixaci CO₂. Tyto dvě skupiny genů se tak zřejmě vydaly jiným evolučním vývojem, což se odráží při konstrukci fylogenetických stromů. Geny řídící replikaci a translaci reflektují pravděpodobně přesněji vývoj sinic na úrovni řádů, či rodů, zatímco ostatní markery jsou vhodnější pro pochopení a rekonstrukci vztahů na nižších taxonomických úrovních.

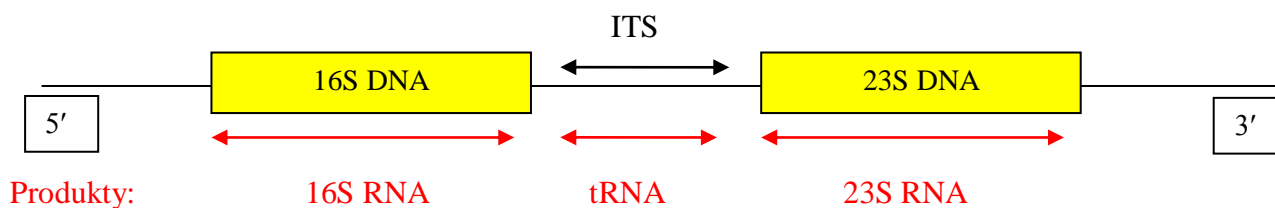


Schéma 1: Uspořádání molekulárních markerů v oblasti 16S-23S rRNA genů.

16S rRNA jako molekulární marker

Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů bakterií se užívá 16S rRNA gen (Woese 1987), protože obdobný mechanismus byl navržen pro sestrojování fylogenetických stromů sinic (Giovannoni et al. 1988). Na základě zkoumání 16S rRNA byl odhalen polyfyletický charakter vláken *Phormidií* (Lee and Bae, 2001). K podobným závěrům došel i Litvaitis (2002), když odhalil seskupování *Phormidia a Leptolyngbye* do společných clusterů, obdobně jako jeho předchůdci (Turner 1997; Ishida et al. 2001; Lee and Bae 2001; Litvaitis 2002; Ceschi-Berrini et al. 2004).

Zdá se, že gen 16S rRNA je druhově (Fox et al. 1992) nebo mezidruhově specifický (Ward et al. 1992, Fergusson and Saint, 2000). Pro určení příbuznosti dvou vláken byly stanoveny hranice shodnosti genomu a to pro 16S rRNA na úrovni rodové 95 % a druhové 97,5 %. (Stackebrandt and Goebel, 1994).

Průzkum ITS oblasti se provádí pro vlákna téměř identická dle 16S rRNA pro přesnější vymezení příbuzenských vztahů. ITS oblast byla dříve sekvenována v rozsahu od 354 do 545 nukleotidů (Iteman et al. 2000; Otsuka et al. 2001; Boyer et al. 2002; Laamanen et al. 2002), nicméně Laloui et al. (2002) a Rocap et al. (2003) rozšířili její sekvenování na 1 000 bází. Skrze sekvenování 16S rRNA genu bylo prokázáno, že přítomnost a množství fykoerytrinu nekoreluje se fylogenetickými vztahy. Vlákna obsahující tento pigment často tvoří clustery s těmi, které tento pigment netvoří. Například *Phormidium persicinum* a na fykoerytrin bohatý taxon *Leptolyngbya ectocarp*i patří do stejného clusteru, neb sdílí 99,7 % 16S rRNA. Geny zodpovědné za fykoerytrin tak nemohou být užity jako taxonomický marker, k podobným závěrům došel též Otsuka et al. (2001) zkoumající fylogenetické vztahy rodu *Microcystis*.

Vlákna shodná, či velmi podobná v 16S rRNA zařazená v jednom clusteru, bývají zpravidla morfologicky velmi podobná. I když podobné morfotypy a ekotypy lze nalézt napříč clustery, což jasně deklaruje, že ani kombinace morfologických a ekologických charakteristik nemusí být spolehlivou cestou ke správnému určení taxonu.

IGS jako molekulární marker

Mezigenový prostor (IGS) spolu s doprovodnými podjednotkami (cpcB) a (cpcA) operonu fykocyaninu byly navrženy jako adekvátní markery pro mezidruhové rozpoznávání (Neilan et al. 1995, Bolch et al. 1996, 1999). Operon fykocyaninu disponuje geny kódující dvě podjednotky (cpcB a cpcA) a tři spojovací polypeptidy. IGS rozprostírající se mezi geny zmíněných podjednotek je potenciálně velmi variabilní oblast sekvence DNA, která může být užitečná pro identifikaci sinic. (Neilan et al. 1995).

Ve studiích užívajících IGS byla odhalena široká morfologická variabilita vláken *Phormidium* 16,5 % (Teneva et al., 2005) nebo 6,7 % (Bolch et al., 1999), což jednoznačně potvrzuje domněnku, že se jedná o rod polyfyletický, navíc druhy a kmeny tvoří koherentní clustery.

Fylogenetický strom sestrojený na základě podobností cpcA a cpcB genů podává odlišné výsledky ve srovnání s těmi vycházejícími z užití 16S rRNA genu. Na jeho základě totiž *Phormidium* tvoří monofyletický klád spolu s dalšími členy řádu Nostocales, což je v rozporu s ostatními studiemi, které uvádějí, že vlákna s heterocyty představují monofyletickou skupinou (Wilmotte 1994; Wilmotte and Herdman 2001; Lyra et al. 2001; Henson et al. 2004).

Užitím tohoto genu jako molekulárního markeru byla dokonce nalezena korelace mezi genetickými clustery rodu *Phormidium* a jejich geografickým původem. U některých vláken však byly detekovány posunové mutace v cpcB genu, jež pravděpodobně sehrávají klíčový význam v přizpůsobování sinic rozličným přírodním podmínkám. Při ozáření sinic světlem s nízkou intenzitou se tak zvyšuje množství fykocyaninu a plynových měchýřků.

Lze tedy říci, že sekvence aminokyselin cpcB-cpcA se výborně hodí pro rekonstrukci fylogenetických vztahů a to i přes jeho relativně krátkou délku asi 180 aminokyselin. Několik dřívějších prací zdůrazňuje důležitost těchto částí genomu jako markeru pro mezirodové rozlišení sinic (Neilan et al. 1995, Bolch et al. 1996, Bolch et al. 1996,1999).

2.3 Fyziologie a využití

Některé řasy a sinice žijí v extrémních podmínkách, kterým se musely v minulosti adaptovat (změny salinity, či teploty, UV radiace apod.). Jednou z cest přizpůsobování je produkce rozličných sekundárních metabolitů, které je ochraňují a které jsou natolik specifické, že nebyly objeveny v jiných organismech. (Mayer et al., 2005). S ohledem na vysokou diverzitu sinic lze předpokládat obdobnou rozmanitost i v produkovaných látkách. Sinice jsou obecně velmi dobrým obchodním artiklem, obsahují totiž velké množství proteinů, mastných kyselin, vitamínů a pigmentů. (Cardosa et al., 2006). Produkují však též řadu sekundárních metabolitů s různými biologickými účinky (protizánětlivé, antivirotické, antibakteriální, protirakovinné) (Burja et al., 2001). Rody sinic jako *Spirulina*, *Lyngbya*, *Nostoc*, a *Oscillatoria* byly pro tyto účely podrobně zkoumány a u mnohých taxonů byla produkce farmaceuticky zajímavých látek skutečně potvrzena. V tomto ohledu však nebyly dosud řádně prozkoumané sinice rodu *Phormidium*, i když některé studie uvádějí protirakovinné účinky látek pocházejících z vláken této sinice (Papendorf, et al 1998, Shirahashi et al., 1993) a inhibici enzymatické aktivity HIV viru glykolipidy izolovanými z *Phormidium tenue* (Reshef, 1997).

Antioxidační vlastnosti

Antioxidační vlastnosti *Phormidia* jsou podmíněny především přítomností fykocyaninů (Soni et al., 2006), které mimo silné antioxidační vlastnosti disponují řadou dalších zajímavých vlastností (Bhat, 2000). Nicméně taktéž karotenoidy jsou známy antioxidačními vlastnostmi (Santoyo, 2006) a jejich přítomnost je tak též nutné brát v úvahu v souvislosti s rodem *Phormidium*. Karotenoidy tak sehrávají v buňkách sinic dvě stěžejní funkce: jednak jsou součástí světlo-sběrného aparátu, jednak chrání buňku před poškozením oxidací. Jsou taktéž součástí cytoplasmatické membrány sinic. Z TEAC testování vyplynulo, že za hlavní antioxidační komponentu sinic rodu *Phormidium* lze považovat především karotenoidy.

Antibiotické vlastnosti

S ohledem na sníženou účinnost široce používaných antibiotik a zvýšenou odolnost běžných patogenů, je stále důležitější nalézat nové zdroje antibiotik (Skulberg, 2000). V tomto kontextu se jeví sinice jako zajímavé organismy pro produkci četných bioaktivních látek (Ehrenreich et al. 2005; Barrios-Llerena et al. 2007) s farmaceutickým dopadem (Thajuddin and Subramanian, 2005). Na základě výzkumu (Thummajitsakul et al., 2012) bylo

jednoznačně potvrzeno, že *Phormidium* produkuje antibakteriální látky, které působí proti četným infekčním agens, například proti *Streptococcus enteritidis* a *E. coli* (Crosby, 1991). Řada těchto bioaktivních látek může být uvolňována do okolního prostředí díky stresujícím podmínkám pro sinice (Martin and Maris, 1995; Nicholson et al., 2000; Soltani et al., 2006). Předpokládá se, že tyto látky pak způsobují úhyn ostatních mikroorganismů poškozením jejich cytoplasmatické membrány a následnou penetraci (Lampe et al., 1998; Maillard, 2002; Ultee et al., 2000). Bioaktivní látky jsou schopny destabilizovat cytoplasmatickou membránu buňku gram-pozitivních bakterií, čímž ji zničí (Ultee et al., 2000). U gram-negativních bakterií je vnější cytoplasmatické membrána hydrofilní tvořena řadou liposacharidů, které tak omezují vstup hydrofobních látek do nitra buňky (Bergsson, 2005). Nicméně terpenoidy či fenolické látky vylučované sinicemi dokážou destabilizovat tuto vrstvu (Helander et al., 1998). Při zkoumání antibakteriálních vlastností sinic rodu *Phormidium* jednoznačně vyplynulo, že za touto aktivitou stojí řada látek rozličné chemické povahy (polarity). Autoři totiž přisuzují antibiotickou povahu rozličným chemickým látkám: indolu, terpenům, fenolům, mastných kyselinám a těkavým halogenovým uhlovodíkům (Mayer et al., 2005, Cardoso et al. 2006).

Elektromagnetické záření

Na naší planetě působí neustále elektromagnetické záření. V průběhu předcházejících století se přírodní prostředí výrazně změnilo zavedením obrovského množství člověkem vytvořených elektromagnetických polí. Tato pole byla považována zpočátku za příliš slabá na to, aby interagovala s biomolekulárními systémy, a aby tak ovlivnila fyziologické vlastnosti živých organismů. Od 18. století se však vědci začali intenzivně zabývat interakcí elektromagnetického pole a životních procesů. Pozornost byla zaměřena na působení mikrovln. Spousta vlivů tohoto záření na živé entity pak byla zaznamenána (Rai et al., 1994; Rai et al., 1999). Mikrovlny jsou součástí elektromagnetického záření, kdy se frekvence radiace pohybuje mezi 300 MHz do 300 GHz, což odpovídá vlnové délce od 1m do 1 mm. Tato neionizující elektromagnetická radiace je absorbována na molekulární úrovni a projevuje se změnami ve vibracích energie a teplem (Banik et al., 2003). Identifikace a hodnocení biologických vlivů mikrovlnného záření je složitou záležitostí. Mikrovlny způsobují termické i netermické změny, které se liší v závislosti na vzdálenosti elektromagnetického pole, síle pole, frekvenci záření, polarizaci atd. Existuje jen málo prací zabývajících se vlivem elektromagnetického záření na mikroorganismy. Ačkoliv jsou sinice odolné vůči řadě

stresujících faktorů prostředí, jakým jsou vysoká teplota, sucho, salinita apod. (Pócs, 2009), ukazuje se, že elektromagnetické záření sinice ovlivňuje v pigmentaci, pohyblivosti, fotosyntézu a fixaci dusíku (Singh et al., 1994; Rai et al., 1999). Díky dlouhé evoluční historii však sinice vyvinuly řadu strategií na ochranu proti elektromagnetickému záření jako např. aktivní vyhýbání zářivě osvětleným habitům, nebo produkce pigmentů absorbující toto záření jakými jsou např. mycosporin nebo scytonemin (Sinha et al., 2002).

Na základě výzkumu (Asadi et al., 2011) byly zjištěny signifikantní rozdíly v rychlosti růstu a přírůstku biomasy. Expozice vyšším intenzitám elektromagnetického záření vyvolala snížený nárůst biomasy. S nárůstem biomasy se také mění (klesá) množství obsaženého chlorofylu a. V buňkách rodu *Phormidium* při inkubaci za zvýšeného elektromagnetického záření došlo rovněž k poklesu množství fykoerytrinu. Hlavní komponenta jádra fykobilizomů – alofykocyanin zůstal ve stejném množství, avšak došlo k redukci počtu samotných fykobilizomů. Dopady elektromagnetického záření na fykoerytrin a alofykocyanin jsou stejné. Celkově koncentrace uvedených pigmentů sice rostou, ale při expozičních 720 a 900 W syntéza látek významně klesá. Samotné fykobilizomy se pak signifikantně zmenšují, což vede ke sníženému množství uvedených přídatných pigmentů.

3 Pseudanabaena

3.1 Úvod

Pseudanabaena reprezentuje velmi málo probádaný rod, blíže příbuzný rodu *Limnothrix*. Pro svou nepatrnou velikost byli zástupci rodu *Pseudanabaena* po dlouhou dobu přehlíženi.

Zástupci tohoto rodu, spadající do řádu Oscillatoriales sensu Komárek (2005), jejichž šířka je zpravidla menší než 4 mikrometry. Buňky bývají povětšinou delší než širší, tylakoidy jsou parietálně uspořádány, některé obsahují též plynové měchýřky, obvykle v apikálních buňkách (Castenholz *et al.*, 2001; Komárek, 2003). *Pseudanabaena* je schopna přizpůsobovat se proměnlivému množství přichozího světla a to skrze chromatickou adaptaci. Samotná adaptace tkví ve změně zastoupení dvou základních fotosyntetických pigmentů: fykoerytrinu a fykocyaninu v buňkách sinice (Kehoe and Gutu, 2006). Skrze tuto schopnost tak může sinice ve vodním sloupci obývat habitáty s rozdílnými světelnými podmínkami.

Morfologicky se *Pseudanabaena* podobá již zmíněné *Limnothrix*, lze je však odlišit na základě přítomnosti výrazných párových aerotopů v blízkosti příčných přehrádek vláken rodu *Limnothrix*. Odlišují se též ekologicky, zatímco *Limnothrix* obývá především mezoeutrofní a eutrofní vody, *Pseudanabaena* má daleko širší distribuci a pravděpodobně též širší ekologickou valenci. Ovšem na základě genetické analýzy 16S rRNA jsou oba rody součástí stejného molekulárního clusteru (Zwart *et al.*, 2005; Willame *et al.*, 2006).

3.2 Taxonomie

Morfologická taxonomie

Rod byl ustanoven Lauterbornem (1914-1917) jako blízký příbuzný rodu *Oscillatoria*, morfologicky se však podobá rodu *Anabaena*, od něhož se odlišuje absencí heterocytů. Právě nápadná morfologická podobnost vedla Lauterborna k tomuto pojmenování. Jeden z prvně objevených druhů (*P. constricta*) byl dokonce mylně přiřazen pod rod *Anabaena*, objevu druhu totiž předcházela objev heterocytů. Geitler (1932) následně k této problematice uvádí: „Možná, že heterocyty zatím nebyly u těchto vláknec objeveny, v takovém případě pak vlákna *Pseudanabaeny* představují jen variety *Anabaeny*. Možná také, že formy rodu *Pseudanabaena* představují pouze vývojová stádia jiných druhů.“ Následně byl rod *Pseudanabaena* ustálen.

Původně rod zahrnoval pouze dva druhy (*P. catenata* Lauterb. a *P. constricta* (Szafer)), ale následující výzkumy odhalily daleko vyšší diverzitu. V současné době je doložena existence více než 33 druhů.

System dle Elenkina (1938) charakterizuje *Pseudanabaenu* jako rod řádu Oscillatoriales, který se vyznačuje samostatně uloženými vlákny, zpravidla bez slizových pochev, výjimečně však připouští přítomnost rozplývavých slizovitých obalů. Dále autor zmiňuje nápadnou mobilitu a protáhlý až oválný tvar jednotlivých buněk. Na základě šíře jednotlivých vláken pak autor rozlišuje 5 druhů: *P. galeata*, *P. catenata*, *P. tenuis*, *P. bipes* a *P. crassa*.

System dle Hollerbach a kol. (1953) vykazuje s předešlým podobnost. Vlákna jsou uložena samostatně, nabývají schopnosti pohybovat se a sestávají se z viditelně zaškracených buněk. Slizová pochva povětšinou chybí, případně nabývá nepatrných kontur. *Pseudanabaena* obývá převážně dna vodních nádrží, je taktéž součástí planktonu a perifytonu. Vlákna bývají nápadně podobná rodu *Anabaena*, snadno je lze též zaměnit s jinými rody spadající do řádu Oscillatoriales. Některé druhy vykazují morfologické atributy na pomezí řádů Oscillatoriales a Nostocales, pročež autor spekuluje o možné přítomnosti heterocytů či podobných struktur u některých druhů tohoto rodu. Rozlišovací kritérium pro určení do druhu představuje šíře vláken a přítomnost/absence plynových měchýřků. Rozpoznány jsou zde 3 druhy: *P. schmidlei* (později zařazeno pod rod *Komvophoron*), *P. galeata*, *P. catenata*.

Další autorkou, která zahrнула *Pseudanabaenu* do svého systému byla Kondrateva – rod tvoří samostatná vlákna, zpravidla bez slizové pochvy, vyznačuje se neustálými plíživými pohyby, vlákna bývají zřetelně zaškrcovaná, buňky cylindrické, či oválné. V tomto systému jsou rozpoznávány dva druhy: *P. catenata* a *P. tenuis*.

Následně Anagnostidis a Komárek (1988) rozčlenili do té doby poznané druhy *Pseudanabaena* do 2 rodů (*Pseudanabaena* a *Ilyonema*) a 5 podrodů (*P. arcuata*, *P. acicularis*, *P. batrachospermum*, *P. nematodes* a *P. raphidiodes*) a vypracovali soudobě nejprogressivnější a zdaleka nejpřesnější taxonomii rodu *Pseudanabaena*. *Pseudanabaena* je zde charakterizována jako planktonní, či bentická vláknitá sinice. Vlákna bývají rozmanitá, rovná, nebo zvlněná, tvořena zpravidla cylindrickými buňkami o rozmanitém počtu. Zaškrčení bývá zpravidla zřetelné, nemusí tomu však vždy být. Vlákna povětšinou nedisponují slizovou pochvou, nicméně běžně bývají pokryta rozplývavým slizem. Apikální buňka se neliší od ostatních, kalyptra chybí, stejně jako zúžení vnější buněčné stěny. U některých vláken byl zaznamenán krouživý pohyb. Buňky nabývají cylindrického, někdy soudečkovitého tvaru, bývají delší než širší, zřídka pak izodiametrické s thylakoidy koncentricky uspořádanými. Důležitým taxonomickým mezidruhovým kritériem je přítomnost/absence aerotopů. Buněčné dělení má charakter binárního dělení.

Polyfázická taxonomie

Prostřednictvím molekulárních dat (analýza genetické informace) bylo prokázáno, že vlákna, která jsou morfologicky velmi podobná, mohou být příbuzensky poměrně vzdálená (Wilmutte and Golubic, 1991). V průběhu přecházejících tří dekad došlo k rozsáhlé revizi dřívějších systematických poznatků (Castenholz, 1992; Skulberg *et al.*, 1993). Většina sinic byla nově zařazena nikoliv pouze na základě morfologie, ale v potaz byly brány též: fyziologické, biochemické a genetické atributy (Waterbury and Stanier, 1977; Castenholz, 1989; Ripka, 1988; Whitton, 1989), společně s nimi byly vyhodnocovány znaky anatomické, cytologické (van den Hoek, 1978).

Současná taxonomie

V současné době se užívá nových moderních postupů molekulární biologie pro řešení taxonomické a příbuzenské otázky (Neilan, 1996). K nejpoužívanějším technikám náleží: fingerprinting a sekvenování DNA (Stam and Stulp, 1988), reverzní sekvenování ribozomální RNA (Lane *et al.*, 1988), nebo RFLP (Wood and Townsend, 1990). Pro prozatímní nedostatek molekulárních dat, která by zcela sjednotila doposud nepřehlednou taxonomii, jsou užívány alternativní metody identifikace sinic. Imunotechnologické postupy zahrnující používání lektinů fluorescenčně značených představují spolehlivou determinační metodu. Vývoj protilátek namířených proti antigenům na povrchu buněk a následná aplikace fluorescenčního barviva byla s úspěchem užita při identifikaci a klasifikaci kokálních sinic (Campbell and Carpenter, 1987; Campbell *et al.*, 1983; Shapiro *et al.*, 1989b). S pomocí této techniky jsou dnes odhalovány mořské sinice produkující toxiny (Bates *et al.*, 1993; Anderson, 1995; Mendoza *et al.*, 1995).

Zdaleka ne všechny druhy *Pseudanabaena* jsou v současnosti objeveny a podrobně probádány. Toto tvrzení ostatně dokumentuje několik recentních výzkumů, realizovaných především na území amerického kontinentu (Kling and Watson, 2003). Na jejich základě byly objeveny druhy nové, dosud nepoznané. Nový druh objevený ve Velkých amerických jezerech byl pojmenován *P. concorta* vyznačující se poměrně nízkou distribucí, preferuje totiž pelagiál Velkých jezer Severní Ameriky, kde je zřejmě limitován množstvím přichozího světla a kvantitou rozpuštěných nutrietů.

V odlišných vzorcích pocházejících rovněž ze Severní Ameriky byl mezi vlákna *Aphanizomenon flos aque* objeven nový morfotyp *Pseudanabaeny*, planktonní druh schopný chromatické adaptace, pojmenovaný *Pseudanabaena rutilus-viridis* (Kling *et al.*, 2012).

Prvotní výzkum odhalil produkci mikrocystinu, zatímco při dalším bádání byly odhalovány další chemické látky produkované tímto druhem. Přítomnost taxonu byla již potvrzena v jezerech Wood, Winnipeg a Killarney rozprostírajících se v Severní Americe, kde ve všech uvedených v letních měsících dominuje rod *Aphanizomenon flos aque* (Kling and Watson, 2003). Jezera Winnipeg a Wood jsou jezera mělká, s kalnou vodou, s velkým množstvím obsažených živin, do nichž ústí říčky z přilehlých prérií přinášející vodu čistou, na živiny poměrně chudou, vodu s kyselým pH. Killarney jezero reprezentuje mělké prérijní eutrofní jezero, s vyšším pH a vyšší konduktivitou. Vlákná této sinice se omotávají okolo shluků *Aphanizomenonu*. *P. rutilis-viridis* se primárně nachází ve jmenovaných vodách ve chvílích, kdy populace *Aphanizomenonu* začíná kolabovat, nebo až v momentě kolapsu.

3.3 Genetypová a fenotypová variabilita

Fylogeneze dle 16S a 23S rRNA genů

Pro rekonstrukci vnitrodruhových fylogenetických vztahů *Pseudanabaeny* byly detailně sekvenovány a analyzovány 16S a 23S rRNA geny. Společně s oblastí 23S rRNA byly sekvenovány části sousedních oblastí, tedy 440 bází předcházejícího 129F primeru a 527 bází nadcházejícího 2241R primeru. Důvodem byla nejednota získaných hypotetických vztahů skrze analýzu výhradně 23S rRNA genu (Acinas et al., 2009). Obě sekvence vypovídají o podobných příbuzenských vztazích, ačkoliv použitím 129F primeru lze detekovat vyšší stupeň polymorfismu.

Příbuzenské vztahy jsou za použití 16S a 23S rRNA genů v 99 % zcela shodné, což indikuje kongruenci daných genů. Gen 23S detekuje větší polymorfismus než gen 16S, který dokonce bývá v některých kulturách shodný. Fylogenetická analýza 16S také potvrzuje, že vlákna spadající do *Pseudanabanea/Limnithrix* vykazují až 99 % podobnost (Zwart et al., 2005; Willame et al., 2006).

Mikrodiverzita a ITS

Vzhledem k tomu, že výše zmíněné geny mnohdy nestačí pro úplné zmapování příbuznosti, byly sekvenovány také oblasti nacházející se mezi nimi (16-23S ITS oblast). Všechny ITS sekvence vykazovaly shodnou strukturu a obsahovaly dva tRNA geny - tRNA^{Ile} a tRNA^{Ala}. Byla však už patrná vyšší variabilita nukleotidů. Fylogenetická analýza ITS odhalila vyšší stupeň diferenciacce uvnitř *Pseudanabaena / Limnithrix* skupiny, která zařazuje většinu vláken do tří hlavních clusterů shodných z 99 % v ITS ("microdiversity clusters"). ITS oblast podléhá větší proměnlivosti ve srovnání se sekvencemi 16S nebo 23S rRNA.

Srovnávací analýza ITS rozčlenila kultury do zmíněných tří clusterů, z nichž jeden obsahoval kmeny pocházející z Baltského moře (99,6 % podobnost), jiný seskupoval izoláty ze španělských stojatých vod (99,2 % podobnost) a třetí zahrnoval vzorky z obou prostorově oddělených lokalit (Acinas, 2009). Existence smíšeného clusteru je překvapující, protože ITS oblast je vysoce variabilní (v délce a sekvencích).

Fylogeneze operonu fykocyaninu: korelace cpcBAa genů a absorpčního spektra světla

Největší omezení ribozomálních genů v molekulárních markerech představuje přisuzování ekofyziologických rysů těmto genům. Proto bývají sekvenovány geny cpcBA, kódující dvě podjednotky fykocyaninu, jež jsou součástí tělíska nazývaného fykobilizom, který představuje hlavní složku fotosyntetických barviv nutných pro příjem světelného kvanta z příchozího slunečního záření. Geny cpcBA se zpravidla užívají pro studie diverzity a fylogeneze sinic (Ivanikova et al., 2007; Six et al., 2007; Haverkamp et al., 2008). Geny cpcBA jsou zásadní. Kultury, jež v nich vykazovaly 100 % shodu, jsou schopné chromatické adaptace. Za vším pravděpodobně stojí gen kódující denitrogenázu reduktázu, který je součástí nitrogenázy. Ten byl objeven v polovině vláken schopných realizovat chromatickou adaptaci, zatímco u vláken bez této schopnosti byl tento gen detekován pouze ojediněle.

Fylogeneze cpcBA genů a přilehlé IGS oblasti poskytla geografické patterny, což z genů cpcBA samotných nevyplývalo. Na základě IGS tak byly determinovány jednotlivé geotypy, tedy systematické jednotky nižší než-li druh. Geotypy jsou definovány na základě přítomnosti specifických párů bází a na základě počtu bází IGS oblasti. IGS některých kultur zahrnovala 104 až 212 bází, jiné kultury disponovaly IGS s nižším počtem bází. Některé kultury byly též postiženy delecemi.

Experimenty dokazují, že *Pseudanabaena* je silným kompetitorem především v prostředí, kde často kolísá množství příchozího světla, ale to jen za předpokladu, že má dostatek času pro chromatickou adaptaci. *Pseudanabaena* může změnit pigmentaci přibližně za 7 dní. *Pseudanabaena* tedy může těžit z chromatické adaptace, pokud je kolísání příchozích světlených kvant nižší a umožňuje dostatečný čas pro realizování chromatické adaptace (Stomp et al., 2008). Předpokládá se, že vlákna bohatá pouze na fykocyanin ztratila brzy tuto schopnost, ztrátou, či přítomností nefunkčních genů zajišťující syntézu fykoerytrinu ve fykobilizomech, nebo genů rcAE, nutných k realizaci tohoto fyziologického pochodu (Terauchi et al., 2004; Kehoe and Gutu, 2006). Odstranění právě zmíněného rcAE genu ukazuje, že je zodpovědný za absorpci červeného a zeleného světla při chromatickému

přizpůsobování (Terauchi et al., 2004). Absence této schopnosti však může být výhodou ve vodách silně zakalených, kam proniká světlo o menších vlnových délkách (Stomp et al., 2007), a při častých disturbancích spojených s intenzivním promícháváním vody. Zde se totiž vlákna nestačí v krátkém časovém horizontu adaptovat na změnu příchozího světla, která je s tím spjata (Stomp et al., 2008). Změny příchozích světlených paprsků dopadajících pod vodní hladinu tak sehrávají klíčovou roli v závislosti na časovém hledisku, mohou tedy indukovat genetickou divergenci mezi vlákny obsahující pouze fykocyanin a vlákny s chromatickou adaptací. Tento mechanismus selekce tak podmiňuje genetickou diverzitu (Cohan, 2002, 2006; Gevers et al., 2005; Cohan and Perry, 2007).

3.4 Ekofyziologické vlastnosti

Toxicita

Sinice představují kosmopolitní skupinu organismů. Při specifických podmínkách eutrofizace (nápadně zvýšená koncentrace dusíku a fosforu) dochází k masivnímu nárůstu sinic a vzniku vodního květu (Roset *et al.*, 2001). Spolu s tímto nárůstem biomasy dochází k intenzivnímu uvolňování toxických látek do vodního prostředí (Vardaka *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006). Vodní květy tak představují závažný ekologický problém, snižují množství rozpuštěného kyslíku ve vodě, podmiňují nepříjemnou chuť a zápach vody (Codd, 2000). Přítomnost vodního květu ovlivňuje populace drobných živočichů (Nagle and Paul, 1999; Nogueira *et al.*, 2006), neboť tyto sinice stojí za produkcí četných metabolitů (Burja *et al.*, 2001), některých toxických (Carmichael, 1994).

Klasifikace těchto toxinů je založena na jejich účincích na ostatní organismy. Rozpoznávají jsou tak neurotoxiny, dermatotoxiny a hepatotoxiny. Nejznámějšími toxickými látkami jsou: microcystin, cylindrospermopsin, anatoxin, lyngbyatoxin, nodularin, a saxitoxin (Codd, 2000; Ouellette and Wilhelm, 2003; van Apeldoorn, 2007). V případě náhlého nárůstu jsou pak tyto organismy zodpovědné za početná úmrtí lidí i zvířat (van Apeldoorn *et al.*, 2007). *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, a *Cylindrospermopsis* reprezentují nejběžnější rody stojící za tímto efektem (Moustaka-Gouni *et al.*, 2006). Toxický účinek je vyvolán přímou expozicí organismů metabolitům uvolněných do vodního sloupce při rozkladu vodních květů (Carmichael, 1994; Moustaka-Gouni *et al.*, 2006; Leflaive and Ten-Hage, 2007).

Na základě výzkumu byla odhalena produkce toxických látek sinicí *Phormidium tenue*. (Ramírez et al., 2010). Při požití těchto sinic perloočkami došlo k jejich razantnímu úbytku, což mimo jiné odpovídá výsledkům zveřejněných v jiných studiích (Nogueira *et al.*, 2006).

Tento jev je vysvětlován nízkou nutriční hodnotou těchto sinic (Porter and McDonough, 1984) a též produkcí toxických látek těmito organismy. Současná toxikologie se však bohužel zabývá pouze nejběžnějším microcystinem a vliv dalších biochemicky aktivních látek nesleduje, protože dosud nebyl prokázán jejich účinek na lidské zdraví (Leflaive and Ten-Hage, 2007).

Mezi další toxikogenní druhy *Pseudanabaeny* lze zařadit *P. mucicola* (Naumann et Huber-Pestalozzi, 2010). Autoři této studie odhalili produkci microcystinu v koncentraci 19 $\mu\text{g g}^{-1}$, což je sice podstatně nižší koncentrace než ta stanovená u rodu *Microcystis*, nicméně překvapivě je *Pseudanabaena mucicola* toxicitější, což indikuje, že toxicita je podmíněná produkcí také dalších buněčných metabolitů.

Dalším druhem z řady *Pseudanabeny*, který byl podroben toxickým testům, byla *P. galeata*. Toxicita byla testována na laboratorních myších, stejně jako buňkách pěstovaných in vitro. Po pěti dnech expozice byly detailně prozkoumány útrobní orgány myši (ledviny a játra), pročež byly detekovány významné histologické změny. Ledviny a játra myši byly poškozeny granulo-vaskulární degradací, krvácením, srůstem a nekrózou buněk. Přítomnost cyanotoxinů a saxitoxinů potvrdily ELISA a HPLC analýzy. *Pseudanabaena galeata* tak může být považovaná za potenciální nebezpečí veřejného zdraví a sehrávat tak významnou roli v distribuci toxinů napříč potravním řetězcem (Teneva et al., 2009).

Léčebné účinky

Fykobiliproteiny reprezentují látky se silnými antioxidačními účinky, protirakovinnými a dalšími léčebnými vlastnostmi (Sekar and Chandramohan, 2007). Allofykocyanin extrahovaný ze *Spirulina platensis* inhibuje například proliferaci leukemicky postižených buněk (Liu et al. (2000), nebo nádorových buněk jater (Huang et al., 2002). Za zvýšené koncentrace jsou však účinky fykobilinů toxické, viz výše uvedený výzkum perlooček *D.magna* a *C. dubia* (Ramírez et al. 2010).

Využití

Sinice jako všudypřítomné organismy mají četná využití v potravinářském průmyslu, při výrobě biopaliv, vitamínů, farmaceutických produktů a podobně. Sinice tak představují nejen významný článek v koloběhu hmoty a energie, ale též perspektivní nástroj biotechnologií. Řada chemických látek získaných extrakcí sinic jsou komerčně využívány v chemickém průmyslu jako pigmenty, vitamíny či enzymy. Především karotenoidy a fykobiliproteiny představují takřka neomezený zdroj pro vývoj nových průmyslově atraktivních látek

(Thajuddin, 2005). Fykoproteiny, představované fykoerytrinem, fykocyaninem a allofykocyaninem reprezentují po chemické stránce proteiny opatřené tetrapyrolovými strukturami. Jsou základním stavebním kamenem světlo-sborného aparátu sinic, ruduch, glaukophyt a některých pyrophyt (Glazer, 1989). Celý komplex se sestává ze tří základních barviv, fykoerytrin nachází se po obvodu sběrného aparátu, na něhož dostředivě navazuje fykocyanin, zatímco allofykocyanin tvoří jádro struktury. Světlo-sběrný aparát je tedy seřazen následně: fykoerytrin zachytává fotony na molekuly fykocyaninu, jenž je transportuje na allofykocyanin a posledním akceptorem je pak chlorofyl a. Fykobiliproteiny disponují protizánětlivými a antioxidačními vlastnostmi, které by mohly v budoucnu sehrávat klíčovou roli při léčbě nádorů (Khan et al. 2005).

Fykocyanin a fykoerytrin představují současné používané přírodní pigmenty s všestranným použitím. Jejich podstatnou předností je stabilita při nízkých teplotách. (Patel, 2004). Konzervují se s kyselinou citronovou nebo v alkalických roztocích za tvorby potravinového barviva pro žvýkačky, želé, nebo zdravotní nápoje (Eriksen, 2008).

Pro získávání fykocyaninu z pěstovaných sinic byla vyvinuta řada metod. Fykoerytrin se získává převážně z řas *Porphyra*, *Ceratium*, *Polysiphonia*, *Porfyridium*, protože jmenované řasy obsahují velké množství polysacharidů, což komplikuje extrakci fykoerytrinu. Pouze několik druhů sinic syntetizuje fykoerytrin při růstu pod zeleným světlem. Fykoerytrin sinic se liší od fykoerytrinu ruduch absorpčním maximem (565 nanometrů), pro což obdržel odlišné označení jako C-FE (fykoerytrin ruduch jímá 3 absorpční maxima 500, 550 a 565 nanometrů).

4 Cíle práce

1. Hodnocení morfologické variability izolovaných kmenů epifytických vláknitých sinic
2. PCR v oblasti 16S rRNA genu
3. Srovnání získaných dat s literaturou

5 Metodika práce

Sběr materiálu

Ve vybraných lokalitách na Opavsku a Olomoucku (viz mapy) byly v období léto 2012-podzim 2013 odebrány ze submerzních makrofyt vzorky epifytonu. Takto získaný organický materiál byl posléze do 48 hodin převezen do algologické laboratoře, kde podstoupil primární zpracování.

Kultivace

Za pomoci preparačních nástrojů (žiletka, skalpel, preparační jehly aj.) byly získány vzorky společenstev sinic a řas, která byly po dobu jednoho roku kultivovány v médiu podle Zehndera (Staub 1961) za standardizovaných podmínek v klimatizovaném boxu za stálé teploty (22 °C, 12h/12 stětlo/tma). Složení 1 litru média Z: 10 ml NaNO₃, 10 ml Ca(NO₃)₂·4H₂O, 10 ml K₂HPO₄, 10 ml MgSO₄·7H₂O, 10 ml Na₂CO₃, 10 ml Fe EDTA, 250 µl roztok mikroprvků (Gaffron). Skrze opakovanou izolaci prováděnou ve sterilním prostřední flow boxu bylo získáno 9 kmenů.

Determinace a záznam

Výše získané kmeny byly determinovány prostřednictvím odborné určovací literatury (Komárek and Anagnostidis, 2005) a studentského mikroskopu Zeiss PrimoStar. Morfologická variabilita byla fotograficky dokumentována pomocí digitálního fotoaparátu Panasonic DMC-TZ10 a mikroskopu Zeiss AxioImager s kamerou AxionCam HRc (Carl Zeiss, Německo). Fotografie byly následně upravovány pomocí programu Adobe Photoshop 7.0.

Hodnocení morfologických charakteristik

Kultivovaný materiál byl podroben detailní morfologické analýze. Při zvětšení 400 x bylo náhodně vybráno 30 buněk třiceti rozdílných vláken každé kultury a s pomocí měřítkového okuláru byly naměřeny jejich parametry (délka, šířka). Dále byly samostatně vyhodnocovány tvary apikálních buněk vláken všech kultur, přítomnost či absence větvení vláken a granulí, případně byla stanovena míra konstrikce. Výsledky byly statisticky zpracovány analýzou variance ANOVA (program NCSS).

PCR amplifikace a sekvenování DNA

Za pomoci UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA) byla izolována genomická DNA. Princip užitého kitu spočívá v lyzi mikroorganismů spolupůsobením tepla, čisticího prostředku a mechanické síly. Uvolněná DNA se posléze váže na křemičité filtry, kde se opětně pročistí. K extrakci DNA bylo použito 50 mg kultivované biomasy. Množství získané DNA bylo kvantifikováno za prostřednictví NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA).

Pro PCR amplifikaci molekulárních markerů (celé 16S-23S ITS oblasti a části 16S rRNA genu) byly použity primery

P2 (5'- GGGGAATTTTCCGCAATGGG- 3')

P1 (5'- CTCTGTGTGCCTAGGTATCC- 3')

(Boyer et al, 2002).

Reakční roztok pro PCR o objemu 50 μ l zahrnoval 5 μ l 10xPerfectTaq Plus PCR Buffer, 5 μ l PerfectLoad Dye concetrate, 0,25 μ l Perfect PerfectTaq Plus DNA polymerázu, 1 μ l 10 mM DTP mix (5 PRIME GmbH Hamburg, Germany), 1 μ l od každého primeru, 36,75 μ l sterilizované vody a 1 μ l templátové DNA. PCR amplifikace probíhala za těch to podmínek: počáteční denaturace byla navozena zahřátím na 94°C na dobu 3 minut, následovaná 35 opakovanými denaturacemi při teplotě 94°C na sobu 30 sekund. Nasednutí primeru bylo dosaženo za snížené teploty 57°C po dobu 30 sekund a prodlužovací fáze probíhala za 72°C po dobu 1 minuty a 50 sekund. PCR produkty byly purifikovány za pomoci GenEluteTM PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Co., Saint Louis, MO, USA) a sekvenovány PCR primery z obou stran. PCR reakce probíhala v GeneQTM termálním cycleru (BIOER TECHNOLOGYCO., LTD, Čína). Sekvence byly rozpoznány přístrojem Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) a následně deponovány v GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Fylogenetická analýza

Nejpodobnější sekvence 16S rRNA oblasti byly identifikovány použitím BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>). Dodatečně, v případě srovnávání 16S rRNA oblasti, byly konfrontovány se sekvencemi řady dalších rodů sinic. Srovnávání více sekvencí probíhalo skrze MEGA 5 (Tamura et al., 2011) použitím Muscl algoritmus (Edgar, 2004). Nejvhodnějším modelem pro maximum likelihood analýzy v tomto případě byl 16S rRNA: Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980).

Fyzicko-geografická charakteristika okresu Opava

Zemský povrch studované oblasti okresu Opava je tvořen Opavskou pahorkatinou, která spadá do geomorfologického celku Středoevropské nížiny. Dominantním činitelem modelující tamní reliéf bylo pleistocénní zalednění, jehož působením došlo k zásadnímu shlazení povrchu, dalo vzniknout četným depresím, které byly posléze vyplněny vodou, a v neposlední řadě transportovalo neogenní sedimenty. Výsledkem těchto procesů je současná podoba povrchu, tedy reliéf tvořený ne příliš strmými a tvarově výraznými pahorky a kopci lemované údolní nivou řeky Opavy.

Samotný geomorfologický vývoj oblasti lze označit za značně komplikovaný, Opavská pahorkatina podlela stejně jako Český masív variskému vrásnění, které se uskutečnilo v období karbonu a permu, vzniklé útvary zde však brzy podlehly denudaci. Ve třetihorách docházelo opakovaně k mořské transgresi, která podmínila přítomnost usazenin, zároveň dochází k formování sladkovodních jezer v oblasti Jeseníků. Pod vlivem alpínsko - himalájského vrásnění došlo k narušení kompaktnosti geomorfologických prvků a vzniků ker. Následovalo období provázené vulkanickou činností, kdy při styku jednotlivých ker docházelo k výlevu rozličných hornin, především čedičů. Nejdůležitější roli však sehrálo čtvrtohorní zalednění způsobené dvě stě metrovým ledovcem, prostřednictvím něhož došlo nejen k již zmíněné sedimentaci spraší, ale též dalšími shlazení povrchu.

Území okresu Opava je součástí Baltského úmoří, páteřní tok pak představuje řeka II. řádu Opava ústící do řeky Odry. Daná řeka pramení v pohoří Hrubý Jeseník, vzniká soutokem Střední a Černé Opavy, za další zdrojnicí je posléze považována Bílá Opava. Vlastní tok Opavy měří 109 km, průměrný průtok pak činí $15 \text{ m}^3/\text{s}$, sklon dna se pohybuje v rozmezí od 1-5‰. Ojedinelý rybník na Opavsku představuje Stříbrné jezero, jedná se o zatopený sádrovcový lom, kde byla těžba ukončena v 60. letech minulého století. Rybník samotný má úctyhodné parametry, plocha činí kol 6,5 ha, délka byla vyměřena 600 metry, šířka 200 metry. Maximální hloubka dosahuje 15 metrů, litorální vegetace je zastoupena převážně rákosem obecným, orobincem širokolistým. Daná flóra tak představuje optimální prostředí pro ukotvení epifytickými organismy.

Tamní klimatické poměry nejlépe odpovídají Quitově definované mírně teplé oblasti. Průměrná roční teplota osciluje mezi 8° a 9°C , roční úhrny srážek kolísají kol 500 a 550 mm ročně.

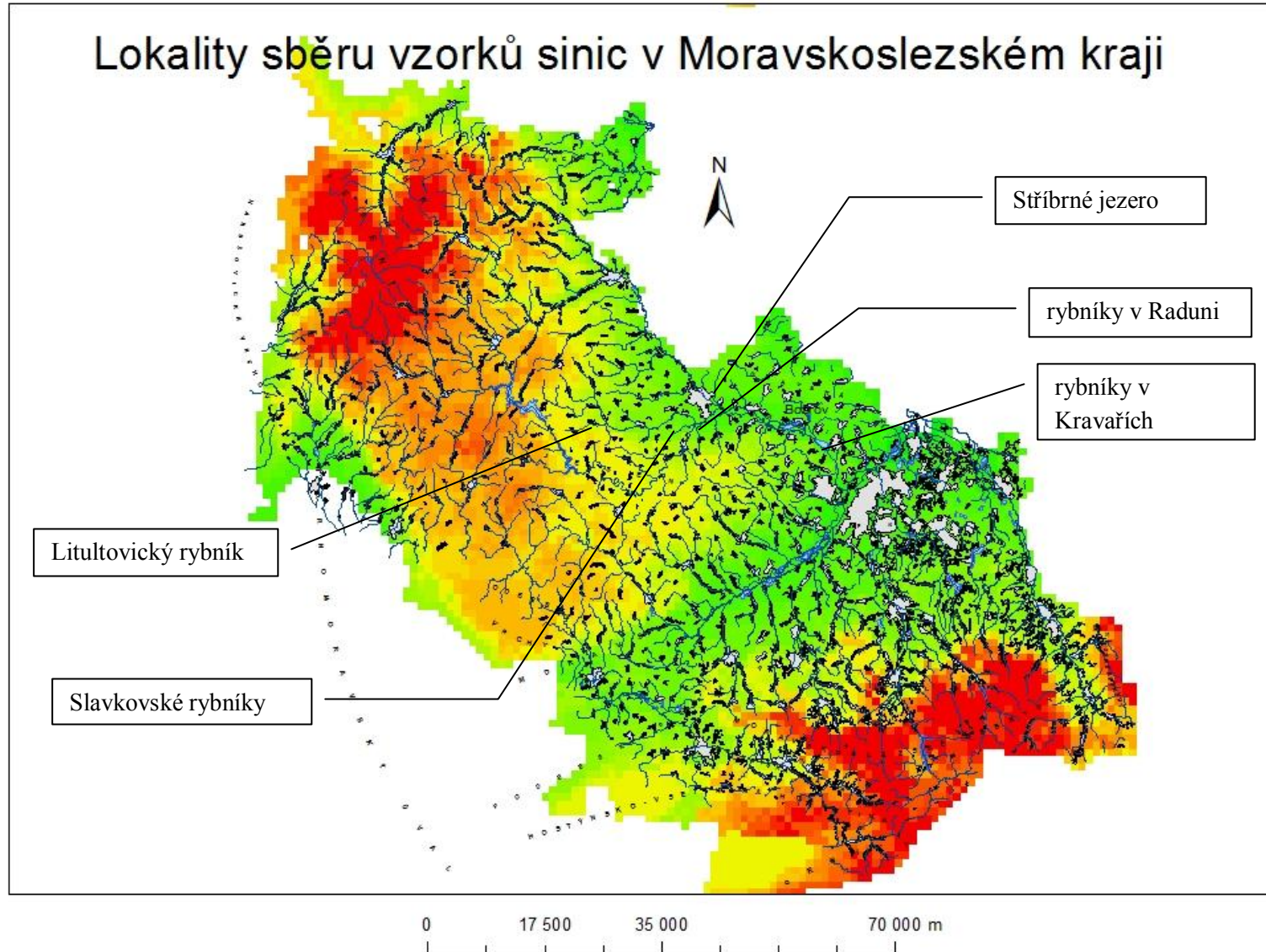
Fyzicko-geografická charakteristika okresu Olomouc

Území okresu Olomouc spadá převážně do geomorfologické jednotky Hornomoravský úval. Ten reprezentuje dílčí součást moravských předpolí vzniklých v důsledku poklesu před flyšovými příkrovy Západních Karpat. Soudobá podoba se tak začala formovat v období přelomu druhohor/třetihor v důsledku Alpínsko- himálajského vrásnění. Konečný vzhled však získávala krajina působením exogenních činitelů. Převážnou roli sehrává i dodnes řeka Morava, při jejímž toku lze detekovat početné meandry, říční nivy a další rozmanité geomorfologické tvary. Za zmínku stojí rovněž Mladečské jeskyně vzniklé dlouhodobým rozpouštěním prvohorních vápenců. Četné přítoky Moravy tak jímají vysoce mineralizovanou vodu. Ze severozápadu se tyčí nad okolním reliéfem pohoří Hrubý Jeseník. Pochody spjaté s jeho vznikem sahají do období karbonu, kde započalo tzv. hercynské vrásnění. V důsledku horotvorného procesu a nižší plasticity tamních hornin došlo vzápětí k vzniku početných zlomů, které posléze vedly k vulkanické činnosti. Konečný vzhled Hrubého Jeseníku a přilehlého okolí je dán mrazovým zvětráváním, jež dává vzniknout mrazovým srubům, kamenným mořím a početným kryoplanačním terasám.

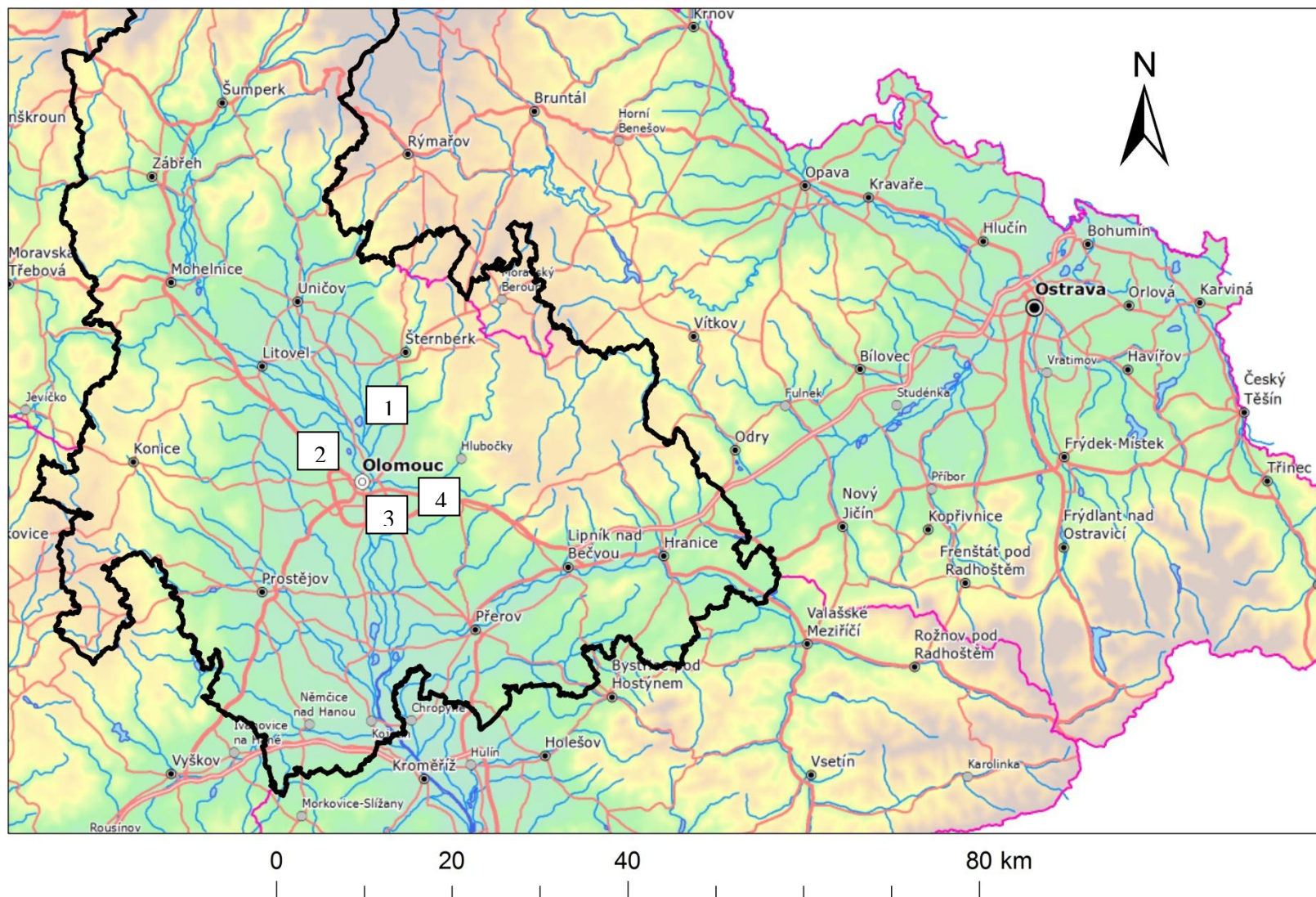
Okresem prochází významná rozvodnice ohraničující úmoří Baltského a Černého moře. Řeka Morava pramenící poblíž nedalekého Kralického Sněžníku spolu se svými hojnými přítoky odvádí veškerou povrchovou vodu do evropského veletoku Dunaj, zatímco Odra se v sousedním Polsku vlévá do Baltského moře. Při jižním úbočí Kralického Sněžníku se rozprostírá žleb, kterým stékají místní bystřiny a dávají tak vzniknout hornímu toku Moravy, po soutoku s Moravskou Sázavou pak vzniká mohutně silící meandrující tok. Celý tok řeky Moravy činí 353 km. Na území okresu Olomouc lze detekovat kolem 100 rybníků, povětšinou nižší výměry a mělkých hloubek, jejichž celková plocha činí přibližně 1 km². Zpravidla jde o rezervoáry vod pro účely rekreační, zásobní, retenční a hospodářské.

Klimatologicky spadá území okresu Olomouce do mírně teplé oblasti dle Quita. Průměrná roční teplota dosahuje 12°C, červencová se pohybuje kolem 19°C a lednová kolem -2°C. Vzhledem k převažujícímu charakteru reliéfu patří většina území k oblastem srážkově podprůměrným až průměrným, roční úhrny nepřekračují hodnotu 500 mm vodního sloupce. Ve srovnání s okresem Opava vykazuje však území delší trvání slunečního svitu pohybující se mezi 1 600 a 1700 hodinami ročně.

Lokality sběru vzorků sinic v Moravskoslezském kraji



LOKALITY SBĚRU VZORKŮ SINIC V OLOMOUCKÉM KRAJI



Legenda

- 1 Chomoutov
- 2 Poděbrady
- 3 Požárnický rybník
- 4 Holice

6 Výsledky

Studie navazuje na bakalářskou práci, v rámci níž jsem v období 2012-2013 provedl na sledovaném území okresu Opava a Olomouc základní floristický průzkum. V průběhu monitoringu ve sledovaném období 2013-2014 se mi podařilo izolovat a kultivovat celkem 9 kmenů sinic. V kultivovaném materiálu dominovaly vláknité sinice řádu Oscillatoriales prakticky ve všech vzorcích. Nejhojnější zástupci příslušeli rodům *Pseudanabaena*, *Geitlerinema*, *Phormidium* a *Leptolyngbya*. Kromě výše uvedených sinic se na sebraných vzorcích submerzních makrofyt vyskytovali další zástupci, zejména drobných vláknitých a kokálních sinic, které se mi nepodařilo úspěšně kultivovat a převést do laboratorních kultur. Při práci s kulturami jsem využil kultivace na tekutém a tuhém mediu, kde jsem soustavně sledoval celkovou morfoloickou variabilitu.

Morfologická charakteristika izolovaných kmenů

Kmen 1: *Geitlerinema pseudacutissimum*, (Obrázek 1, Tabulka 1)

Jednotlivá vlákna, výjimečně v malých shlucích, nevětvená, nezužovaná ke koncům nebo jen nepatrně se zužující, na povrchu obvykle bez slizové pochvy (výjimečně s nezřetelným rozplývavým slizem), šířka 1,8-2 μm . Buňky kubické až mírně cylindrické, nezaškrcované s patrnými oranžovými granulemi karotenových zrn v blízkostech buněčných přehrádek. Apikální buňky zakulacené nebo kónické. Vlákna motilní (kývání, rotace). Kultura tvoří sytě zelené povlaky na dně kultivačních nádob. Původ: rybník Slavkov, na rákosu obecném.

Tabulka 1: morfoloická charakteristika *Geitlerinema pseudacutissimum*

šířka buněk - průměr	šířka buněk- minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk- minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
1,99 \pm 0,04	1,8	2	1,93 \pm 0,13	1,5	2	zakulacená	-	-	+

Kmen **2** *Geitlerinema pseudacutissimum*, (Obrázek 2, Tabulka 2)

Jednotlivá vlákna, výjimečně v malých shlucích, nevětvená, nezužovaná ke koncům nebo jen nepatrně se zužující, na povrchu obvykle bez slizové pochvy (výjimečně s nezřetelným rozplývavým slizem), šířka 1,9-2,2 µm. Buňky kubické až mírně cylindrické, nezaškrcované s patrnými oranžovými granulemi karotenových zrn v blízkostech buněčných přehrádek. Apikální buňky zakulacené nebo kónické. Vlákna motilní (kývání, rotace). Kultura tvoří sytě zelené povlaky na dně kultivačních nádob. Původ: rybník Olomouc-Chomoutov, na rákosu obecném.

Tabulka 2: morfologická charakteristika *Geitlerinema pseudacutissimum*

šířka buněk - průměr	šířka buněk - minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk - minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
2 ± 0,04	1,9	2,2	1,96 ± 0,11	1,6	2,2	zakulacená	-	-	+

Kmen **3** *Leptolyngbya cf. boryana*, (Obrázek 3, Tabulka 3)

Jednotlivá vlákna tvoří nápadné hustě propletené shluky chuchvalcovitého vzhledu, občasně nepravě větvená. Na povrchu obvykle tenká bezbarvá slizová pochva. Šířka vláken 1,3-2 µm, silné zaškrčení jednotlivých buněk. Buňky přibližně kulovité, granulace chybí. Apikální buňky vždy zakulacené. Kultura tvoří sytě zelené povlaky na dně kultivačních nádob. Vlákna stacionární. Původ: rybník Olomouc – Poděbrady.

Tabulka 3: morfologická charakteristika *Leptolyngbya cf. boryana*

šířka buněk - průměr	šířka buněk - minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk - minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
1,55 ± 0,08	1,5	1,9	1,57 ± 0,24	1	2	zakulacená	+	-	-

Kmen **4** *Phormidium cf. tergestinum*, (Obrázek 4, Tabulka 4)

Vlákna v hustě vzlínavých propletených shlucích, nevětvená, na koncích nezúžená. Povrch vláken bez slizové pochvy, pokryt výrazným rozplývavým slizem, šířka 2-6,5 µm. Vlákna variabilní délky, tloušťky a barvy, obvykle rovná, případně jemně zkroucená. Buňky cylindrické, širší než delší, mírně zaškrčené, homogenní obsah, občasně nepravidelná granulace. Apikální buňky zakulacené až polokulovité. Vlákna motilní (kývání, rotace). Kultura formuje sytě zelené vazké povlaky při dně kultivačních nádob. Místo nálezu: Litultovice – lentická voda obrostlá rákosem obecným

Tabulka 4: morfologická charakteristika *Phormidium cf. tergestinum*

šířka buněk - průměr	šířka buněk- minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk- minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
2 ± 0	2	2	4,22 ± 0,85	2	6	zašpičatělá	+	-	+

Kmen **5** *Pseudanabaena galeata*, (Obrázek 5, Tabulka 5)

Vlákna solitérní, nebo v jemných, poléhavých shlucích tvořící světle zelené až olivově zelené krusty. Vlákna rovná, případně jemně zvlněná, rozličně propletená, někdy pravidelně uspořádaná v souvislých provazcích, vzácněji šroubovitě stočená. Jednotlivá vlákna tvořena menším počtem (zpravidla méně než 50) silně zaškrčených buněk, šířka 0,8 – 2,4 µm, na koncích zakulacená. Buňky cylindrické až kulovité, s terminálními aerotopy při buněčných přehrádkách. Vlákna mobilní (kývání, rotace). Původ: Kravaře ve Slezsku, eutrofní lentická voda v listnatém lese

Tabulka 5: morfologická charakteristika *Pseudanabaena galeata*

šířka buněk - průměr	šířka buněk- minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk- minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
2 ± 0	2	2	3,64 ± 0,59	2,2	5	zakulacená	+	-	+

Kmen **6 *Phormidium cf. tergestinum***, (Obrázek 6, Tabulka 6)

Vlákna v hustě vzlínavých propletených shlucích, nevětvená, na koncích nezúžená. Povrch vláken bez slizové pochvy, pokryt výrazným rozplývavým slizem, šířka 2-5 µm. Vlákna variabilní délky, tloušťky a barvy, obvykle rovná, případně jemně zkroucená. Buňky cylindrické, širší než delší, mírně zaškrčené, homogenní obsah, občasně nepravidelná granulace. Apikální buňky zakulacené až polokulovité. Vlákna mobilní (kývání, rotace). Kultura formuje sytě zelené vazké povlaky při dně kultivačních nádob. Místo nálezu: Raduň, lentická voda v listnatém lese

Tabulka 6: morfologická charakteristika *Phormidium cf. tergestinum*

šířka buněk - průměr	šířka buněk - minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk - minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
4,29 ± 0,55	3	5	4,1 ± 0,59	3	5	zašpičatělá	+	-	+

Kmen **7 *Geitlerinema pseudacutissimum***, (Obrázek 7, Tabulka 7)

Jednotlivá vlákna, výjimečně v malých shlucích, nevětvená, nezužovaná ke koncům nebo jen nepatrně se zužující, na povrchu obvykle bez slizové pochvy (výjimečně s nezřetelným rozplývavým slizem), šířka 1-2 µm. Buňky kubické až mírně cylindrické, nezaškrcované s patrnými oranžovými granulemi karotenových zrn v blízkostech buněčných přehrádek. Apikální buňky zakulacené nebo kónické. Vlákna motilní (kývání, rotace). Kultura tvoří sytě zelené povlaky na dně kultivačních nádob. Původ: Olomouc- Požárnický rybník (rezervoár stojaté vody obrostlý rákosem obecným)

Tabulka 7: morfologická charakteristika *Geitlerinema pseudacutissimum*

šířka buněk - průměr	šířka buněk - minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk - minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
1,7 ± 0,26	1	2	1,6 ± 0,38	1,2	3	zakulacená	+	-	+

Kmen **8** *Pseudanabaena galeata*, (Obrázek 8, Tabulka 8)

Vlákná solitérní, nebo v jemných, poléhavých shlucích tvořící světle zelené až olivově zelené krusty. Vlákna rovná, případně jemně zvlněná, rozličně propletená, někdy pravidelně uspořádaná v souvislých provazcích, vzácněji šroubovitě stočená. Jednotlivá vlákna tvořena menším počtem (zpravidla méně než 50) silně zaškrcených buněk, šířka 1,2 – 2 µm, na koncích zakulacená. Buňky cylindrické až kulovité, s terminálními aerotopy při buněčných přehrádkách. Vlákna mobilní (kývání, rotace). Původ: sádrovcový lom, Stříbrné jezero, Opava

Tabulka 8: morfologická charakteristika *Pseudanabaena galeata*

šířka buněk - průměr	šířka buněk - minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk - minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
1,89 ± 0,2	1,2	2	3,49 ± 0,65	2,5	5	zakulacená	+	-	+

Kmen **9** *Pseudanabaena galeata*, (Obrázek 9, Tabulka 9)

Vlákná solitérní, nebo v jemných, poléhavých shlucích tvořící světle zelené až olivově zelené krusty. Vlákna rovná, případně jemně zvlněná, rozličně propletená, někdy pravidelně uspořádaná v souvislých provazcích, vzácněji šroubovitě stočená. Jednotlivá vlákna tvořena menším počtem (zpravidla méně než 50) silně zaškrcených buněk, šířka 0,8 – 2,4 µm, na koncích zakulacená. Buňky cylindrické až kulovité, s terminálními aerotopy při buněčných přehrádkách. Vlákna mobilní (kývání, rotace). Původ: eutrofní lentická voda, Olomouc- Holice, listnatý les

Tabulka 9: morfologická charakteristika *Pseudanabaena galeata*

šířka buněk - průměr	šířka buněk - minimum	šířka buněk - maximum	délka buněk - průměr	délka buněk - minimum	délka buněk - maximum	apikální buňky	konstrikce buněk	větvení vláken	motilita
1,9 ± 0,1	1,8	2	4,43 ± 0,52	3,7	5,5	zakulacená	+	-	+

Tabulka 10: Souhrnná morfologická charakteristika vyizolovaných kmenů

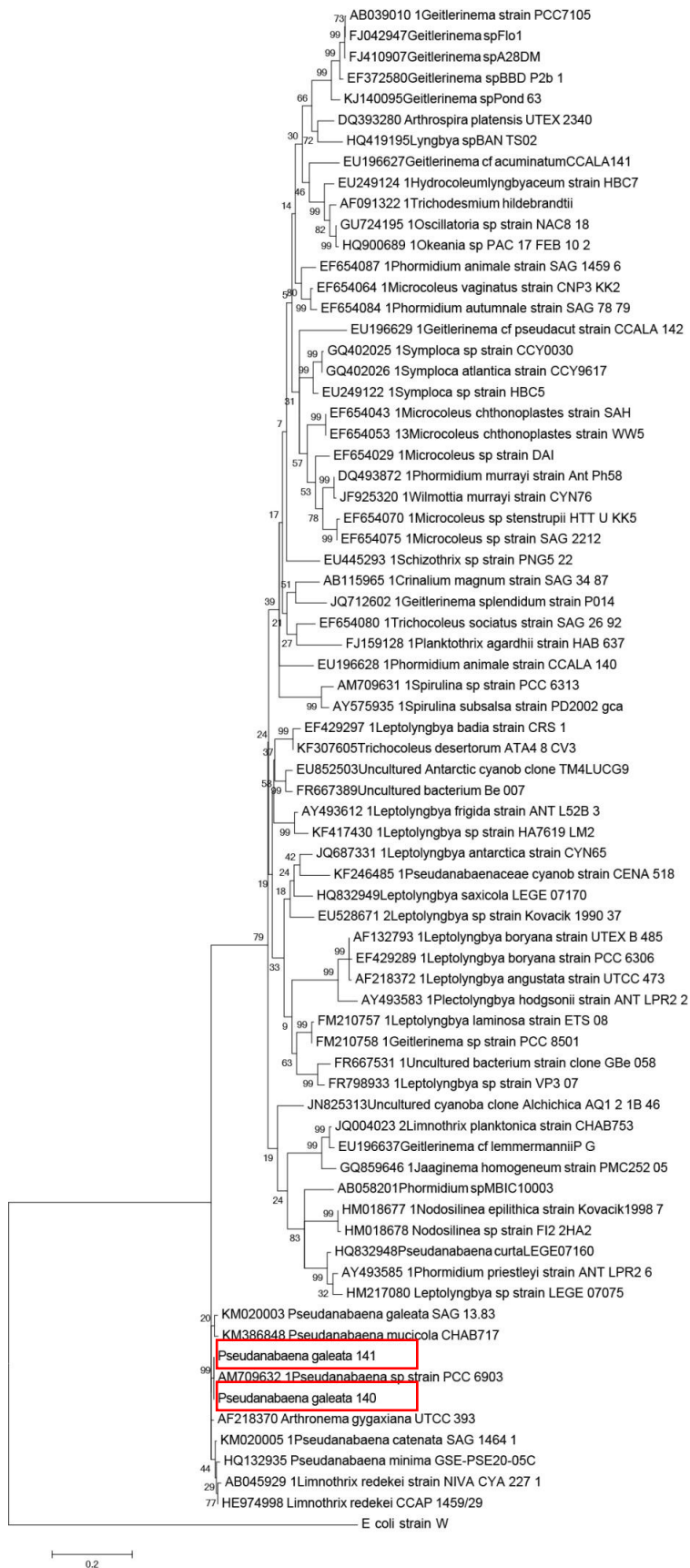
Z tabulky níže uvedené zřetelně vyplývá, že konstriktce – tedy zaškrcení buněk není adekvátním rozlišovacím znakem mezi vybranými rody *Oscillatoriales*. Obdobně se lze vyjádřit k větvení vláken. Rovněž motilita není vhodným kritériem pro určování do rodu, což ilustrují výsledky níže uvedené, druhy jednotlivých rodů se totiž nápadně v tomto ohledu liší. Přítomnost granul je však běžně užívána jako mezidruhové kritérium, např. pro rozlišování některých druhů rodu *Pseudanabaena*.

Souhrnně lze konstatovat, že vypovídající hodnota morfologických atributů hodnocených samostatně je nulová, nicméně komplexní morfologické hodnocení vybraných kultur většinou postačuje ke správnému určení až na úroveň druhu. Nejběžněji hodnocenými znaky jsou: délka a šířka buněk, tvarově zakončení apikálních buněk, míra konstriktce vláken, větvení vláken, přítomnost a uspořádání granul a mobilita. Získané výsledky odpovídají charakteristikám uvedeným v klíči dle Anagnostidis a Komárek (1985).

	tvar apikální buňky	konstriktce buněk	větvení vlákna	granula	motilita
<i>Geitlerinema pseudacutissimum</i>	zakulacená	+	-	+	+
<i>Geitlerinema pseudacutissimum</i>	zakulacená	+	-	+	+
<i>Leptolyngbya cf. boryana</i>	zakulacená	+	-	+	-
<i>Phormidium cf. terestinum</i>	zašpičatělá	(+)	-	-	-
<i>Pseudanabaena galeata</i>	zarovnaná	+	-	-	+
<i>Phormidium cf. tergestinum</i>	zašpičatělá	+	-	+	+
<i>Geitlerinema pseudacutissimum</i>	zakulacená	+	-	-	+
<i>Pseudanabaena galeata</i>	zakulacená	+	-	-	(+)
<i>Pseudanabaena galeata</i>	zakulacená	+	-	+	+

Molekulární analýza kmenů *Pseudanabaena galeata* 140 a 141 na základě 16S rRNA genu

Z celkového počtu 9 izolovaných sinic byly pro molekulární analýzu vhodné pouze dva. Zbylé izoláty vykazovaly částečné kontaminace jinými sinicemi nebo řasami, proto nebyly zařazeny pro molekulární analýzu. Z časových důvodů nebylo možné zbylé kultury opětovně purifikovat, proto jsem se zaměřil na molekulární analýzu dvou kmenů *Pseudanabaena galeata* 140 a 141, izolovaných ze stojatých vod v Kravařích a Opavě. Analýzou 16S rRNA genu (metoda Maximum likelihood) jsem zjistil, že oba studované kmeny *Ps. galeata* tvoří velmi dobře definovaný klastř s kmenem *Pseudanabaena sp.* PCC 6903 (bootstrap 99%). Na druhou stranu kmen *Ps. galeata* SAG 13.83 vykazuje mírnou odlišnost od mých izolátů a podobnost s *Ps. mucicola* CHAB717, *Ps. catenata* a *Ps. minima* tvoří další samostatnou větev, do které náleží zástupci kmenů *Limnothrix reckei*. Další zástupci čeledi Pseudanabaenaceae jako jsou *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Jaaginema* nebo *Nodosilinea* tvoří poměrně významně odlišný zvláštní klastř.



Obrázek číslo 1: Fylogenetický strom kmenů Oscillatoriales sestavený na základě analýzy 16S rRNA oblasti použitím maximum likelihood

7 Diskuze

V současnosti je preferována polyfázická klasifikace sinic zahrnující morfologii, ultrastrukturu, ekofyziologii, biochemii a molekulárních charakteristiky (Anagnostidis K, Komárek J. 1985, 2006). Na základě molekulárních analýz bylo totiž jasně prokázáno, že většina morfologických charakteristik není vhodná pro jejich determinaci, jedinými částečně relevantními znaky jsou velikost a tvar buněk, popř. vláken, které se však mohou lišit v závislosti na měnících se podmínkách prostředí (např. Hašler et al. 2003). Studium devíti kmenů z vybraných lokalit Opavska jsem zjistil jak morfologické, tak molekulární odlišnosti od popsanych druhů sinic (např. Komárek a Anagnostidis 2005, NCBI – National Center for Biotechnology Information).

Zástupci rodu *Pseudanabaena* a jim podobné typy představují rovněž běžné sinice stojatých vod České republiky, lze je však nalézt prakticky po celém světě, např. v Mexiku (Ramírez, 2010), v Bulharsku (Teneva, 2009), nebo v jihovýchodní Asii (Dvořák et al. 2015) či v Japonsku (Kakimoto, 2013). S pokroky v molekulárních technikách se zvyšuje počet nově popsanych druhů (např. Kling et al. 2012). *Pseudanabaena* je druhově poměrně bohatý rod, protože nelze zcela přesně specifikovat morfologické atributy, což vede k nejasným interpretacím hranic druhu.

Pseudanabaena galeata byla ustanovena jako nový druh některých dříve klasifikovaných zástupců *Pseudanabaena catenata* Lauterborn odlišující se přítomností terminálních aerotopů (Böcher, 1949). Vlákna obvykle rostou soliterně, případně tvoří nenápadné kolonie pod vodní hladinou. Izolovaná vlákna však nabývala odlišných barevných kvalit, než jaké jsou uvedené v Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota (Anagnostidis a Komárek, 2005), namísto světle modrozelené byla vlákna zbarvena do hnědošedé nebo sytě zelené. Možnou příčinou může být dlouhodobá kultivace, nebo příslušnost kmene k odlišnému ekotypu. Vlákna byla jemně zvlňená, někdy nápadně zkroucená. Metrické parametry kmenů rovněž odpovídaly rozmezím uváděným v determinačním klíči, šířka vláken od 0,8 - 2,4 μm , délka buněk 2-7 μm (Anagnostidis a Komárek, 2005). Vlákna byla povětšinou tvořena menším počtem silně zaškrcených buněk, zřídka jejich počet překročil 20, což odpovídá údajům v publikaci. Tvar buněk se shodoval s popisem – cylindrické, protáhlé, apikální buňka nápadně zakulacená. Motilita vláken rovněž pozorována.

Pseudanabaena galeata obývá sladké vody. Druh vykazuje širokou distribuci a v České republice je běžným. Nalezen v Arktidě: Svalbard (Matula et al. 2007), v Evropě: Velká Británie (John, Whitton & Brook 2011), Německo (Täuscher 2011), Rumunsko (Carau

2002, Caraus 2012), Španělsko (Aboal, Prefasi & Asencio 1996). Rovněž detekován v Severní Americe: Oklahoma (Kirkwood & Henley 2006) a Jižní Americe: Brazílie (Ferragut et al. 2005, Crossetti & Bicudo 2008, Werner 2010).

Pro rekonstrukci vnitrodruhových fylogenetických vztahů rodu *Pseudanabaena* byly detailně sekvenovány a analyzovány 16S a 23S rRNA geny. Gen 23S detekuje větší polymorfismus než gen 16S, vykazující nižší variabilitu. Z užití 16S genu jako molekulárního markeru vyplývá klastr zahrnující zástupce *Pseudanabanea/Limnothrix* s 99 % podporou (Zwart et al., 2005; Willame et al., 2006). Nicméně *Pseudanabaena* vykazuje poměrně vysoký stupeň heterogenity uvnitř rodu. Zdá se, že se ve skutečnosti jedná o několik geneticky odlišných linií. Důkazem je nedávný popis nového rodu *Pinocchia* (Dvořák et al. 2015). Nesrovnalosti ve fylogenetických analýzách lze přičíst několika faktorům. Za prvé je to chybná determinace druhu. Fylogenetické analýzy mnohdy využívají dostupné sekvence z GenBan, u kterých není známa přesná identita druhu. Typickým problémem jsou sekvence ze starých kmenových kultur, které byly izolovány a popsány podle dřívějších taxonomických znaků, ale zjevně odpovídají jiným druhům. S ohledem na špatnou dokumentaci přírodní populace a změny morfologie během dlouhodobé kultivace nelze tyto druhy pak přesně charakterizovat, což se projevuje jako odchylky ve fylogenetické analýze. Některým druhům polyfyletického rodu *Pseudanabaena* je pak geneticky podobný druh *Arthronema gygaxiana* (Nishizawa, 2010). Na základě molekulárních výsledků (Wiliame, 2006) lze rovněž polemizovat o blízké příbuznosti s některými druhy rodu *Oscillatoria*.

Pro sestavení fylogramu obsahující mnou izolované kmeny *Ps. galeata* 140 a *Ps. galeata* 141 byla použita komparativní Maximum likelihood analýza sekvence 16S rRNA. Z tohoto rozboru vyplynulo, že oba studované kmeny reprezentují identický druh společně s kmenem PCC 6903, již dříve izolovaným z brakické vody v Coos Bay v Oregonu (USA).

Fylogeneticky nejbližší zkoumaným kmenům stojí *Ps. galaeata* SAG 13.83, prvně izolovaná Geitlerem v bažinách v Lunz am See (Dolní Rakousy, 1982). Daný kmen tvoří společně s *Ps. mucicola* CHAB717 nalezeného v Číně samostatný cluster.

Výše uvedené tak potvrzuje vysokou genetickou heterogenitu uvnitř polyfyletického rodu *Pseudanabaena*, jež se zástupci rodu *Limnothrix* tvoří zvláštní klastř separátní od dalších zástupců čeledi Pseudanabaenaceae. Celá tato větev má signifikantní podporu.

Geitlerinema je široce rozšířený rod spadající pod čeleď Pseudanabaceae, běžně se vyskytující v rozličných vodních habitech, charakterizovaný nápadnou motilitou, buňkami s šířkou nižší než 4 mikrometry a obligátní absencí slizové pochvy, fylogeneticky příbuzným je rod *Limnothrix* (Anagnostidis, 2001). Získané kmeny *Geitlerinema pseudacutissimum* (dříve jmenované jako

Oscillatoria pseudacutissimum (1956), později jako *Phormidium pseudacutissimum* (1988)) z rybníků Slavkov, Olomouc-Chomoutov a Litultovice se mezi sebou morfologicky výrazně nelišily. Obdobně, jak je uvedeno v determinačním klíči Anagnostidis a Komárek (2005), vlákna nabývala světle – zelenomodrých zbarvení. Mírně se však odchylovala šířka vláken, téměř vždy převyšovala proklamovanou hodnotu 1,8 μm . Motilita odpovídala popisu, stejně jako mírná konstriktce. Vlákna na koncích zúžená, poměr délky a šířky buněk se taktéž shodoval s patřičnou literaturou. Vnitřní obsah buněk silně granulovaný, zvláště v blízkosti příčně orientovaných buněčných stěn. Metrické atributy se daleko více shodovaly se závěry vyplývající z průzkumu Lake Monbino (Hašler et al., 2012), kde šíře vláken nabývala 1,5-2 μm .

Geitlerinema pseudacutissimum je ekologicky nevyhraněný druh. Anagnostidis a Komárek (2005) se sice uvádí, že obývá výhradně sladkovodní habitáty, nicméně toxikologické studie zmiňují *G. pseudacutissimum* v souvislosti s mořskou vodou. Lze tak uvažovat o daleko širším rozšíření a problematičtějším vymezení druhu než jak je uváděno ve starších publikacích, toto zjištění tak jen utvrzuje nutnou taxonomickou revizi.

Nezbytnost taxonomické revize vyplývá taktéž z molekulárního postavení některých zástupců rodu *Geitlerinema* v rámci řádu Oscillatoriales. Studie zkoumající fylogenezi rodu jednoznačně dospěly k závěru, že *Geitlerinema* představuje polyfyletický taxon (Willame et al. 2006, Bittencourt-oliveria et al. 2007). Na základě důkladné maximum likelihood analýzy genu 16S bylo signifikantně potvrzeno seskupování druhů *Geitlerinema* a *Limnothrix* do společných clusterů (Perkerson et al, 2010). Molekulární výzkumy rovněž ukázaly, že navrhovaná morfologie konců vláken není adekvátním rozlišovacím znakem mezi těmito rody (Willame et al. 2006). Rovněž korektní určování rodu ztěžuje fakt, že tři obligátně determinační znaky (absence slizové pochvy, šířka vláken do 4 μm a motilita) podléhají fenotypové plasticitě a mají enormní přesah do dalších rodů, např.: *Jaaginema*, *Pseudanabaena*, *Leptolyngbya*. Nejasnosti jsou nejen na rodové, ale taktéž na druhové úrovni. Ani morfologická, ani molekulární data například prokazatelně neopodstatňují rozdíl mezi *G. amphibium* a *G. unigranatum*. (Oliveira et al, 2009).

Běžný a ekologicky významný rod *Leptolyngbya* je hojně rozšířen napříč téměř všemi ekosystémy planety Země. Ačkoliv spousta morfotypů rodu *Leptolyngbya* dominuje mikrobiálním společenstvům, samotné znalosti o ní jsou značně omezené. Rod jímá řadu druhů, geneticky velmi variabilních, které dříve spadaly do rodů jako *Lynngbya*, *Phormidium*, či *Plectonema*. Kmen *Leptolyngbya* cf. *boryana* (dříve *Plectonema boryanum*) nalezený v lokalitě Olomouc – Poděbrady vykazoval morfologické atributy povětšinou shodující se

s popisem druhu v Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota (*Anagnostidis* a Komárek, 2005). Vlákna tvořila husté povlaky při okraji kultivačních zkumavek, byla jemně zakřivená, občasně nepravě se větvcí, pokryta bezbarvým rozplývavým slizovým povlakem. Popisu se nevymykala ani šíře vláken pohybující se mezi 1,5-1,9 μm odpovídající uvedeným 1,3-2 μm . Výrazná konstriktce a absence granulovaných buněčných přepážek byla na jednotlivých vláknech rovněž patrná. Buňky izodiametrického tvaru, ty v místech nepravého větvení však delší než širší, apikální buňky nápadně zakulaceny. Morfometrické vlastnosti izolovaného kmene se rovněž shodovaly s těmi uvedenými ve studii Moro et al. (2010). Buňky kmenů získané z termálních bahnitých biotopů nabývaly rozdílných rozměrů (1,2-3 μm dlouhé buňky, 0,8 – 1 μm široké buňky). Ostatní morfologické vlastnosti se však shodovaly, což svědčí o vysoké fenotypové plasticitě velikosti buněk, případně o proměnlivosti znaku v rámci jednotlivých ekotypů druhu. *Leptolyngbya* cf. *boryana* pravděpodobně vykazuje vysokou vnitrodruhovou diverzifikaci a s tímto související vysoký počet ekotypů. Vyskytuje se totiž nejen v čistých sladkovodních habitech v rámci perifytonu, nýbrž též ve výše deklarovaných termálních a minerálních pramenech.

Rod je součástí molekulárně definované skupiny „LPP group B“, do něhož spadají další rody s dosud nevyjasněným fylogenetickým postavením. Opětně tedy rod reprezentuje několik na sobě pravděpodobně nezávislých vývojových linií, jedná se tedy o taxon polyfyletický. *Leptolyngbya* tak tvoří společně se zástupci rodů *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema* řadu klastrů s různě vysokou hodnotou podpory, což dokládají četné studie (Moro et al, 2010). Vnitrodruhová systematika rodu je rovněž značně komplikovaná, morfologie samotná neposkytuje relevantní rozlišující kritéria. Fylogenetické analýzy například odhalily v polyfyletické skupině *Leptolyngbye* rod nový *Nodosilinea*. (Perkerson et al. 2011). Z mých dat vyplývá, že stále existují komplikované a dosud nedořešené příbuzenské vztahy s dalšími rody řádu Oscillatoriales, například *Plectolyngbya*, *Geitlerinema*, nebo *Phormidium*.

Rod *Phormidium* reprezentuje jeden z nejhojněji se vyskytujících rodů sinic na Zemi. Lze tak poměrně úspěšně konfrontovat vlastní závěry s těmi již dříve zveřejněnými v četných studiích. Mnou izolovaná vlákna rodu *Phormidium* cf. *tergestinum* byla tvořena buňkami o šířce 4-6 μm , což odpovídá hodnotám uveřejněným v Modern approach to the classification systém of cyanophytes (*Anagnostidis* a Komárek, 1985), kde je mezi dalšími charakteristikami uvedený rozsah šířky vláken od 4-10 μm . Obdobné údaje jsou uveřejněna v četných publikacích zabývajících se morfologickou variabilitou sinic (Palinska et al., 2006, Hašler et al., 2012). Ostatní morfologické charakteristiky popsané ve výše uvedené monografii (*Anagnostidis* a Komárek, 1985) s menšími odlišnostmi odpovídaly získaným

kmenům: buňky nabývaly cylindrického tvaru, vlákna byla jemně zvlněná s nevýraznou konstrikcí opatřená jemným slizovým povlakem. Motilita nebyla vždy při kultivaci v laboratorních podmínkách detekována. Nepravé větvení stejně jako přítomnost aerotopů nebyla pozorována. Vzhledem k obrovské variabilitě tvaru apikální buňky, které nabývají vlákna *Phormidium*, je tento znak začleněn mezi směrodatné určovací morfologické prvky. *Phormidium cf. tergestinum* je druh prvně popsáný v Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales (Komárek a Anagnostidis, 1988). Tento taxon je ekologicky ne zcelavyhraněný, nalezen byl totiž jak v bahnitých habitech, tak v biotopech s čistou nezávadnou vodou. Lze se tak domnívat, že druh zahrnuje velký počet ekotypů.

Na základě zkoumání 16S rRNA byl odhalen polyfyletický charakter vláken rodu *Phormidium* (Lee and Bae, 2001). K podobným závěrům došel i Litvaitis et al. (2002), když odhalil seskupování *Phormidium a Leptolyngbya* do společných clusterů, obdobně jako jeho předchůdci (Turner et al., 1997; Ishida et al. 2001; Lee and Bae 2001; Litvaitis 2002; Ceschi-Berrini et al. 2004). Rovněž fylogram (viz výsledky) potvrzuje, že vlákna rodu *Phormidium* skutečně pochází z více vývojových linií a z molekulárního hlediska se tak nejedná o rod v pravém slova smyslu. Z výše uvedeného fylogramu je patrné, že *P. priesteleyi* tvoří jeden cluster s *Leptolyngbya sp.* s 32 % podporou, sesterským clusterem tohoto kládu je pak *Pseudanabaena curta* s 99 % podporou. Teprve pak následují v molekulární podobnosti další druhy rodu *Phormidium*. Na základě srovnávání 16S rRNA byla prokázána genetická podobnost rodu *Phormidium* s rodem *Oscillatoria* díky 97 % shodě (Palinska et al., 2006). Při analýze sinic *Phormidium* z Arktidy a Antarktidy vyšla najevo taktéž podobnost s *Planktothricoides raciborskii* s 87 % shodou (Comte, 2007).

Ačkoliv patří sinice mezi přehlížené organismy a patřičná pozornost jim není věnována ani ve výuce biologie na gymnáziích, je nutné zapracovat na osvětě problematiky s nimi spjatými. V současnosti neexistuje adekvátní literární pramen aplikovatelný do výuky na středních školách. Soudobé učebnice pouze nastiňují existenci sinic (Jelínek, 2004), ale nepodávají zdaleka celistvé informace. Je tedy nutné provázat nejnovější poznatky plynoucí ze současných výzkumů a edukační soustavu. První krok by mělo představovat patřičné rozšíření povědomí o sinicích jako o původních ekologických katastrof, posléze navrhuji představit a seznámit studentstvo s větším počtem rodů rostoucím na území České republiky. Završení by pak představovala praktická cvičení a ukázky nativních preparátů nejběžnějších druhů naší flóry. Jako možnou inspiraci jsem pro tyto účely vytvořil návrh pracovního listu (viz příloha číslo 2).

8 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá problematikou morfologické a genetické variability epifytických sinic řádu Oscillatoriales. Studované kmeny pocházející z okresu Opava a Olomouc byly podrobeny morfologické analýze, následně byl vyhotoven statistický rozbor získaných dat. Ta byla posléze konfrontována s cizojazyčnou literaturou. Pro následnou konstrukci fylogenetického stromu byl užít fragment genu 16S rRNA.

Tato práce shrnuje veškeré podstatné poznatky o rodech *Phormidium* a *Pseudanabaena* s ohledem na nejnovějších molekulární data. V rámci úvodních kapitol byly představeny jednotlivé přístupy a systematická vymezení rodů, akcent byl kladen na polyfázický přístup, který se jeví jako neobjektivnější. Rámcově bylo nastíněno soudobé i potencionální využití těchto sinic ve školství.

Praktická část je věnována hydrobiologické šetření zkoumající variabilitu a diverzitu epifytických sinic ve stojatých vodách na Opavsku a Olomoucku. Kmeny získané kultivací z vybraných lokalit byly podrobně morfologicky popsány, jejich parametry statisticky zpracovány a výsledky byly porovnávány s těmi uveřejněnými v obdobných studiích. Rovněž byly pořízeny fotografie kmenů.

Za pomoci UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA) byla izolována genomická DNA kmenů *Pseudanabaena galeata* 140 a *Pseudanabaena galeata* 141. Oblast 16S rRNA sloužila jako molekulární marker pro začlenění kmenů do fylogramu k dalším získaným kmenům. Byl tak potvrzen polyfyletický status rodu *Pseudanabaena*. Na základě vysoké shody v maximum likelihood bootstrap lze konstatovat, že se jedná o ekotypy dříve izolované *Pseudanabaena sp.* PCC 6903.

9 Literatura

- Aakermann, T., Skulberg, O. M. & Liaaen-Jensen, S. (1992): A comparison of the carotenoids of strains of *Oscillatoria* and *Spirulina* (Cyanobacteria). – *Bioch. Syst. Ecol.* 20: 761–769.
- Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I, Distel DL et al. (2004): Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430: 551–554.
- Anagnostidis K, Komarek J (1985): Modern approach to the classification system of cyanophytes, Introduction. *Arch Hydrobiol Suppl, Algol Stud* 38/39:291–302
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes, 2 – Oscillatoriales. – *Algological Studies* 80: 327–472.
- Anagnostidis & Komárek.: *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota*. München: Spektrum, 2005.
- Anderson, D.M. (1995): Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective. In *Harmful Algal Blooms* (Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. & Marcaillou, C., editors), 3±13. Intercept Ltd, Lavoisier
- Asadi (2011): Physiological variability in cyanobacterium *Phormidium* sp. Kützing ISC31 (Oscillatoriales) as response to varied microwave intensities. *African Journal of Agricultural* (6).
- Ballot, A., Dadheech, P.K., Haande, S., Krienitz, L., (2008): Morphological and phylogenetic analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from tropical inland water bodies. *Microb. Ecol.* 55, 608–618
- Banik S, Bandyopadhyay S, Ganguly S (2003): Bioeffects of microwave- A brief review. *Bioresour. Technol.*, 87: 155-159.
- Barbosa, R., E.Silva, N. F. Verani, K. O. Nonaka & O. Rocha. (2006): Toxicity of a cyanobacterial bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tiete River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 163-170.
- Barrios-Llerena ME, Burja AM, Wright PC (2007): Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34:443–456
- Bates, S.S., Leger, C., Keafer, B. & Anderson, D.M. (1993): Discrimination between domoic-acid producing and nontoxic forms of the diatom *Pseudonitzschia pungens* using immunofluorescence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 100: 185±195
- Bergsson G (2005): Antimicrobial polypeptides and lipids as a part of innate defence mechanism of fish and human fetus, M.Sc. dissertation, Karoliska Institute. Stockholm, pp. 77.
- Bhat, V. B.; Madyastha, K. M. (2000): C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 20–25.

- Bolch, C. J., Blackburn, S. I., Neilan, B. A. & Grewe, P. M. (1996): Genetic characterization of strains of Cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions. *J. Phycol.* 32:445
- Bolch, C. J., Orr, P. T., Jones, G. J. & Blackburn, S. I. (1999): Genetic, morphological and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 35:339–55
- Boyer SL, Johansen JR, Flechtner VR (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. *J Phycol* 38:1222–1235
- Burja, A. M., Banaigs, E., Abou-Mansour, J. G., Burgess & P. C. Wright. (2001): Marine cyanobacteria a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57: 9347-9377.
- Burja, A. M.; Banaigs, E. B.; Mansour, A.; Burgess, J. G.; Wright, P. C. (2001): Marine cyanobacteria: a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57, 9347–9377
- Campbell, L. & Carpenter, E. (1987): Characterization of phytoerythrin-containing *Synechococcus* spp. populations by immunofluorescence. *J. Plankton Res.*, 9: 1167±1181
- Cardoso, K. H. M.; Guaratini, T.; Barros, M. P.; Falcão, V. R.; Tonon, A. P.; Lopes, N. P.;
- Campos, S.; Torres, M. A.; Souza, A. O.; Colepicolo, P.; Pinto, E. (2006): Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, doi: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007.
- Carmichael, W. W. (1994): The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78-86.
- Casamatta DA, Johansen JR, Vis ML, Broadwater ST (2005): Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J Phycol* 41:421–438
- Casamatta, D.A., Johansen, J.R., Vis, M.L., Broadwater, S.T. (2005): Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 41, 421–438
- Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A (2001): Subsection III. (Formerly Oscillatoriales Elenkin 1934). In: Garrity GM (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 539–562
- Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A.. (2001): Form-genus XII. *Pseudanabaena* Lauterborn 1916. In: Boone DR, Castenholz RW (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Springer Verlag: Heidelberg, pp 554–557
- Castenholz RW, Waterbury JB (1989): Group I. Cyanobacteria. In: Holt JG (ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 1710–1727

- Castenholz, R.W. (1989): Subsection III. Order Oscillatoriales ; subsection IV. Order Nostocales ; subsection V. Order Stigonematales. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1771±1791, 1794±1799. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Castenholz, R.W. (1992): Species usage, concept and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). *J. Phycol.*, 28: 737±745
- Ceschi-Berrini, C., De Appolonia, F., Dalla Valle, L., Koma' rek, J., Andreoli, C.,(2004): Morphological and molecular characterization of a thermophilic cyanobacterium (Oscillatoriales) from Euganean Thermal Springs (Padua, Italy). *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 113, 73–85.
- Codd, G. A. (2000): Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51-60.
- Cohan FM, Perry EB. (2007): A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr Biol* 17: R373–R386
- Cohan F. M.. (2002): What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* 56: 457–487
- Crosby NT (1991): *Determination of Veterinary Residues in Food*. Ellis Horwood, New York
- Desikachary, T. V. (1959): *Cyanophyta*. Indian Council Agricultural Research. – 686 pp., Reprinted by Academic Press, New York & London
- Drouet F (1968): Revision of the classification of the Oscillatoriaceae. *Monogr Acad Nat Sci Phila* 115:261–281
- Ducker, S. C., Knox, R. B. (1984): Epiphytism at the cellular level with special reference to algal epiphytes. In: Linskens, H. F., Heslop-Harrison, J (eds.) *Cellular interactions*.
- DVOŘÁK, P. et al.: Morphological and molecular studies of *Neosynechococcus sphagnicola*, gen. et sp. nov. (Cyanobacteria, Synechococcales). *Phytotaxa*. 2015, (1).
- Ehrenreich IM, Waterbury JB, Webb EA (2005): Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl Environ Microbiol* 71(1):17401–17413
- Eriksen (2008): Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (2008) 1–14.
- Fergusson, K. M. & Saint, C. P. (2000): Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4145–8.
- Fergusson, K.M., Saint, C.P.,(2000): Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4145–4148.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtshuk, P. Jr. (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:166–70.

- Frémy P (1934): Cyanophycées des côtes d'Europe. Mem de la soc Nation des Sci Nat et Math de Cherbourg 41:1–234
- Frémy, P. (1934): Cyanophycées des côtes d'Europe. – Mem. de la soc. Nation. des Sci. Nat. et Math. de Cherbourg 41: 1–234
- Garcia-Pichel F, Prufert-Bebout L, Muyzer G (1996): Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. Appl Environ Microbiol 62:3284–3291
- Geitler L (1932): Cyanophyceae. In: Kolkwitz R (ed) Rabenhorst's Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, pp 1–1196
- Geitler, L. (1932): Cyanophyceae. – In: Rabenhorst Kryptogamen Flora 14. – 1196 pp., Akademischer Verlag, Leipzig
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ et al. (2005): Re-evaluating prokaryotic species. Nat Rev Microbiol 3: 733–739.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. Y., Barns, S., Lane, D. J. & Pace, N. R. (1988): Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. J. Bacteriol. 170:3584–92.
- Gomont, M. (1892 '1893'): Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées). Deuxième partie. - Lyngbyées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série 7* 16: 91-264, pls 1-7.
- Gomont, M. (1892): Monographie des Oscillariées (Nostocaceae homocystées). – Ann. Sci. Nat. Ser. Bot. 15: 265–368
- Hašler, P.; Pouličková, A.; Vařeková, Š. (2003): Comparative studies on two strains of the genus *Planktothrix* (Cyanophyta, Cyanoprakaryota). – Algological Studies 108: 31–43.
- Haverkamp T, Acinas SG, Doleman M, Stomp M, Huisman J, Stal LJ. (2008): Diversity and phylogeny of Baltic Sea picocyanobacteria inferred from their ITS and phycobiliprotein operons. Environ Microbiol 10: 174–188
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ (1998): Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem., 46: 3590– 3595
- Henson BJ, Hesselbrock SM, Watson LE, Barnum SR (2004): Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria subsections IV and V based on *nifD*. Int J Syst Evol Microbiol 54:493–497
- Henson, B.J., Watson, L.E., Barnum, S.R., (2004): The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *NifD*. J. Mol. Evol. 58, 390–399.

Hirschberg, J. & Chamovitz, D. (1994): Carotenoids in cyanobacteria. In Bryant, D. A. (ed.): The molecular biology of cyanobacteria. – pp. 559– 579, Kluwer, Dordrecht

Huang, B., G. C. Wang, G. K. Zeng & Z. G. Li. (2002): The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 17(1): 35-42.

Ishida T, Watanabe MM, Sugiyama J, Yokota A (2001): Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* 201:79–82

Iteman I, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Herdman M (2000): Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiol* 146:1275–1286

Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N., Herdman, M.,(2000): Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146, 1275–1286.

Ivanikova NV, Popels LC, McKay RML, Bullerjahn GS. (2007): Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Appl Environ Microbiol* 73: 4055–4065

Karsten, U. & Garcia-Pichel, F. (1996): Carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds in members of the genus *Microcoleus* (Cyanobacteria): A chemosystematic study. – System. Appl. Microbiol. 19: 285–294.

Kehoe DM, Gutu A. (2006): Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 127–150.

Kehoe DM, Gutu A. (2006): Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 127–150.

Khan, P. Bhadouria, P.S. Bisen (2005): Nutritional and therapeutic potential of Spirulina, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6 (2005) 373–379.

Kling and Watson (2003): A new planktic species of *Pseudanabaena* (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) from North American large lakes. *Hydrobiologia*.

Komárek J, Anagnostidis K (2005): Cyanoprokaryota, part 2. Oscillatoriales. In: Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M (eds) SüßwasserXora von Mitteleuropa Band 19/2. Gustav Fischer, Jena

Komarek J. (2003): Planktic oscillatoriale cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiologia* 502: 367–382.

Laamanen MJ, Forsström L, Sivonen K (2002): Diversity of *Aphanizomenon flos-aque* (Cyanobacterium) populations along a Baltic Sea salinity gradient. *Appl Environ Microbiol* 68:5296–5303

Laloui W, Palinska KA, Rippka R, Partensky F, Tandeau de Marsac M, Herdman M, Iteman I (2002): Genotyping of axenic and non-axenic isolates of the genus *Prochlorococcus* and the

“marine *Synechococcus* clade” by size, sequence analyses or RFLP of the Internal transcribed Spacer (ITS) of the ribosomal operon. *Microbiol* 148:453–455

Lampe MF, Ballweber LM, Isaacs CE, Patton DL, Stamm WE (1998): Killing of *Chlamydia trachomatis* by novel antimicrobial lipids adapted from compounds in human breast milk. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 1239-1244

Lane, D.J., Field, K.G., Olsen, G.J. & Pace, N.R. (1988): Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. *Methods Enzymol.*, 167: 138±144.

Lee, W. J. & Bae, K. S.(2001): The phylogenetic relationship of several osillatorian cyanobacteria, forming bloom at daecheong reservoirs, based on partial 16S rRNA gene sequences. *J. Microbiol. Biotech.* 1:504–7.

Leflaive, J. & L. Ten-Hage. (2007): Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52: 199-204.

Liaaen–Jensen, S. (1979): Carotenoids – a chemosystematic approach. – *Pure Appl. Chem.* 51: 661–675

Litvaitis, M. K. (2002): A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* 468:135–45.

Liu, Y., Xu L., N. Cheng, L. Lin & C. Zhang. (2000): Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of Applied Phycology* 12: 125-130.

Lyra C, Suomalainen S, Gugger M, Vezie C, Sundman P, Paulin L, Sivonen K (2001): Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:513–526

Maillard JY (2002): Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.*, 92(1): 16-27

Marquardt, J. & Palinska, K.A. (2007): Genotypic and phenotypic variability of *Phormidium*-like cyanobacteria from different habitats and geographical sites. – *Arch. Microbiol.* 187: 397–413

Martin H, Maris P (1995): Antiseptic and antibiotic resistance of 310 Gram-positive strains isolated from udders after use of post-milking teat germicides. *Vet. Res.*, 26: 43-5

Mayer, A. M. S.; Hamann, M. T. (2001):Marine pharmacology

Mendoza, H., Lopez-Rodas, V., Gonzalez-Gil, S., Aguilera, A. & Costas, E. (1995): The use of polyclonal antisera and blocking of antibodies in the identification of marine dinoagellates : species-specific and clone-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 186: 103±115.

Moro: Polyphasic characterization of a thermo tolerant filamentous cyanobacterium isolated from a Euganean thermal muds. 2010, (2).

Moustaka-Gouni, M., E. Vardaka, E. Michaloudi, K. A. Kormas, E. Tryfon, H. Mihalatou, S. Gkelis & T. Lanaras. (2006): Plankton food web structure in a eutrophic polymictic lake with a history of toxic cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography* 51: 715-727.

Nagle, D. G. & V. Paul. (1999): Production of secondary metabolites by filamentous tropical marine cyanobacteria: ecological functions of the compounds. *Journal of Phycology* 35: 1412-1421.

Neilan BA, Jacobs D, Goodman AE (1995): Genetic diversity and phylogeny on toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environm Microbiol* 61:3875–3883

Neilan, B.A. (1996): Detection and identification of cyanobacteria associated with toxic blooms: DNA amplification protocols. *Phycologia*, 35: 147±155

Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000): Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3): 548-572.

Nogueira, I. C. G., A. Lobo-da-Cunha & V. M. Vasconcelos. (2006): Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquatic Toxicology* 80: 194-203

Nogueira, I. C. G., A. Lobo-da-Cunha & V. M. Vasconcelos. (2006): Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquatic Toxicology* 80: 194-203.

Oren A (2004): A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1895–1902

Otsuka S, Suda S, Shibata S, Oyaizu H, Matsumoto S, Watanabe MM (2001): A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:873–879

Ouellette, A. & S. W. Wilhelm. (2003): Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and Environment* 7: 359-366.

Palińska, K.A. & Marquardt, J. (2008): Conformity between molecular and phenotypic results demonstrated on *Phormidium autumnale* isolates (cyanobacteria). – *Arch. Microbiol.* 189: 325–335

Palinska, K.A., Marquardt, J.(2008): Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Arch. Microbiol.* 189, 325–335.

- Papendorf, O.; Köning, G. M.; Wright, A. D.; Hierridin (1998): B. 2,4- Dimethoxy-6-heptadecyl-phenol, secondary metabolites from the cyanobacterium *Phormidium ectocarpi* with antiplasmodial activity. *Phytochemistry*, 49, 2383–2386.
- Perkerson, R.B. III, Johansen, J.R, Kovácik, L., Brand, J., Kastovsky, J. & Casamatta, D.A. (2011). A unique pseudanabaenalean (cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology* 47(6): 1397-1412.
- Pócs T (2009): Cyanobacterial crust types, as strategies for survival in extreme habitats. *Acta Bot. Hung*, 51: 147-178
- Porter, K. G., & R. McDonough. 1984. The energetic cost of response to blue-green algal filaments by cladocerans. *Limnology and Oceanography* 29: 365-369
- Premanandh, J., Priya, B., Teneva, I., Dzhabazov, B., Prabakaran, D., Uma, L.(2006): Molecular characterization of marine cyanobacteria from the Indian subcontinent deduced from sequence analysis of the phycocyanin operon (cpcB-IGS-cpcA) and 16S–23S ITS region. *J. Microbiol.* 44, 607–616.
- Rai S, Garg TK, Singh JB (1999): Physiologic effect of 50-Hz EMF induced nutrient solution on a cyanobacterium, *Nostoc muscorum*. *Electro. Magnetobiol.*, 18: 177-184.
- Rai S, Singh UP, Mishra GD (1994): Effect of Water's microwaves power density memory on fungal spore germination. *Electro.Magnetobiol.*, 13: 247-252.
- Rajaniemi R, Hrouzek P, Kastovska K, Willame R, Rantala A, HoVmann L, Komarek J, Sivonen K (2005): Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* 55:11–26
- Ramírez et al.(2010): Toxic effects of *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) on the cladocerans *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Hidrobiológica*.
- Reshef, V.; Mizrahi, E.; Marezki, T.; Silberstein, C.; Loya, S.; Hizi, A.; Carmelli, S. (1997): New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *J. Nat. Prod.*, 60, 1251–1260
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1–61
- Rippka, R. (1988): Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.*, 167: 28±67
- Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson Z, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW (2003): Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424:1042–1047

- Roset, J., S. Aguayo & M. J. Muñoz-Mejía. (2001): Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología* 18: 65-71.
- Santoyo, S.; Herrero, M.; Señorans, F. J.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E.; Jaime, L. (2006): Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 75–82.
- Sekar, S. & M. Chandramohan. (2007): Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20 (2): 113-136.
- Seo, P., Yokota, A., (2003): The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49, 191–203.
- Shapiro, L.E., Haugen, E., Keller, M., Bidigare, R., Campbell, L. & Guillared, R. (1989): Taxonomic affinities of marine coccoid ultraplankton : a comparison of immunochemical surface antigen cross-reaction and HPLC chloroplast pigment signatures. *J. Phycol.*, 25: 794±797
- Shirahashi, H.; Murakami, N.; Watanabe, M.; Nagatsu, A.; Sakakibara, J.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Iwashima, A. (1993): Isolation and identification of anti-tumor promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem Pharm.*
- Singh SP, Rai S, Rai AK (1994): Athermal physiological effects of microwaves on a cyanobacterium *Nostoc muscorum*: Evidence for EM-memory bits in water. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 32: 175-180.
- Sinha RP, Richter P, Faddoul J (2002): Effects of UV and visible light on cyanobacteria at the cellular level. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: 553-559.
- Six C, Thomas JC, Garczarek L, Ostrowski M, Dufresne A, Blot N et al. (2007): Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. *Genome Biol* 8: R259.
- Skulberg OM (2000): Microalgae as a source of bioactive molecules– experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol* 12:341–348
- Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A. & Skulberg, R.M. (1993): Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water* (Falconer, I.R., editor), 145±165. Academic Press, London
- Soltani N, Khavari-Nejad RA, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi SH, Fernández- Valiente E (2006): Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH values. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 22: 571-576.
- Soni, B.; Kalavadia, B.; Trivedi, U.; Madamwar, D. (2006): Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*, isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochem.* 41, 2017–2023

- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846–849.
- Stam WT, Venema G (1977): The use of DNA–DNA hybridization for determination of the relationship between some blue-green algae (*Cyanophyceae*). *Acta Bot Neerl* 26:327– 342
- Stam, W.T. & Stulp, B.K. (1988): New taxonomic methods: DNA}RNA hybridization. *Methods Enzymol.*, 167: 125±132
- Stomp M, Huisman J, Vros L, Pick FR, Laamanen M, Haverkamp T et al. (2007): Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol Lett* 10: 290–298.
- Stomp M, van Dijk MA, van Overzee HMJ, Wortel M, Sigon CAM, Egas M et al. (2008): The time scale of phenotypic plasticity, and its impact on competition in fluctuating environments. *Am Nat* (in press).
- Teneva, I., Dzhambazov, B., Mladenov, R., Schirmer, K.,(2005): Molecular and phylogenetic characterization of Phormidium species (Cyanoprokaryota) using the cpcB-IGS-cpcA locus. *J. Phycol.* 41, 188–194.
- Terauchi K, Montgomery BL, Grossman AR, Lagarias JC, Kehoe DM. (2004): RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Mol Microbiol* 51: 567–577.
- Thajuddin and G. Subramanian (2005): Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology, *Curr. Sci.* 89, 47–57.
- Thajuddin N, Subramanian G (2005): Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr Sci* 89(1):47–57
- Thajuddin N, Subramanian G (2005): Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr Sci* 89(1):47–57
- Thummajitsakul (2012): Antibacterial activity of crude extracts of cyanobacteria Phormidium and Microcoleus species. *African Journal of Microbiology* (6).
- Toledo, G., Palenik, B., (1997): Synechococcus diversity in the California current as seen by RNA polymerase (rpoC1) gene sequences of isolated strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4298–4303.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., Ohno, T.,(2006): The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 5442–5447.
- Turner S (1997): Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. In: Bhattacharya D (ed) *The origin of the algae and their plastids*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ (2000): Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.*, 174: 233-238

- van Apeldoorn, M. E. , H. P. van Egmond, G. J. A. Speijers. & G. J. I. Bakker.(2007): Review. Toxins in cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 7-60.
- van den Hoek, C. (1978): *Algen : EinfuXhrung in die Phykologie*. George Thieme Verlag, Stuttgart
- Vardaka, E., M. Moustaka-Gouni, C. M. Cook & T. Lanaras. (2005): Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. *Journal of Applied Phycology* 17: 391-401
- Ward, D. M., Bateson, M. M.,Weller, R. & Ruff-Roberts, A. L. (1992): Ribosomal RNA analysis of microorganism s as they occur in nature. *Adv. Microbiol. Ecol.* 12:219–86.
- Watanabe, K., Nelson, J.S., Harayama, S., Kasai, H.,(2001): ICB database: the gyrB database for identification and classification of bacteria. *Nucleic Acids Res.* 29, 344–345
- Waterbury, J.B. & Stanier, R.Y. (1977): Two unicellular cyanobacteria which reproduce by budding. *Arch. Mikrobiol.*, 115: 249±254.
- Whitton, B.A. (1989): Genus I. *Calothrix* Agardh 1824. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1791±1793. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Willame R, Boutte C, Grubisic S, Wilmotte A, Komarek J, Hoffmann L. (2006): Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J Phycol* 42: 1312–1332.
- Willame R, Boutte C, Grubisic S, Wilmotte A, Komarek J, Hoffmann L. (2006): Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J Phycol* 42: 1312–1332.
- Wilmotte A (1994): Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant DA (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer, Dordrecht, pp 1–25
- Wilmotte A, Herdman M (2001): Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: Garrity GM (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 487–493
- Wilmotte, A. & Golubic, S. (1991): Morphological and genetic criteria in the taxonomy of cyanophyta}cyanobacteria. *Algol. Stud.*, 64: 1±24
- Wilmotte, A., Herdman, M., (2001): Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. (Eds.), *Bergey_s Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Springer, New York, pp. 487–493.
- Wilson, K.M., Schembri, M.A., Baker, P.D., Saint, C.P.(2000): Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 332–338.
- Woese, C. R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–71.
- Wood, A.M. & Townsend, D. (1990): DNA polymorphism within the WH7803 serogroup of marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria). *J. Phycol.*, 26: 576±585

Zwart G, Kamst-van Agterveld MP, van der Werff-Staverman I, Hagen F, Hoogveld HL, Gons HJ. (2005): Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ Microbiol* 7: 365–377.

Zwart G, Kamst-van Agterveld MP, van der Werff-Staverman I, Hagen F, Hoogveld HL, Gons HJ. (2005): Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ Microbiol* 7: 365–377.

Příloha číslo 1

Fotografie izolovaných kmenů

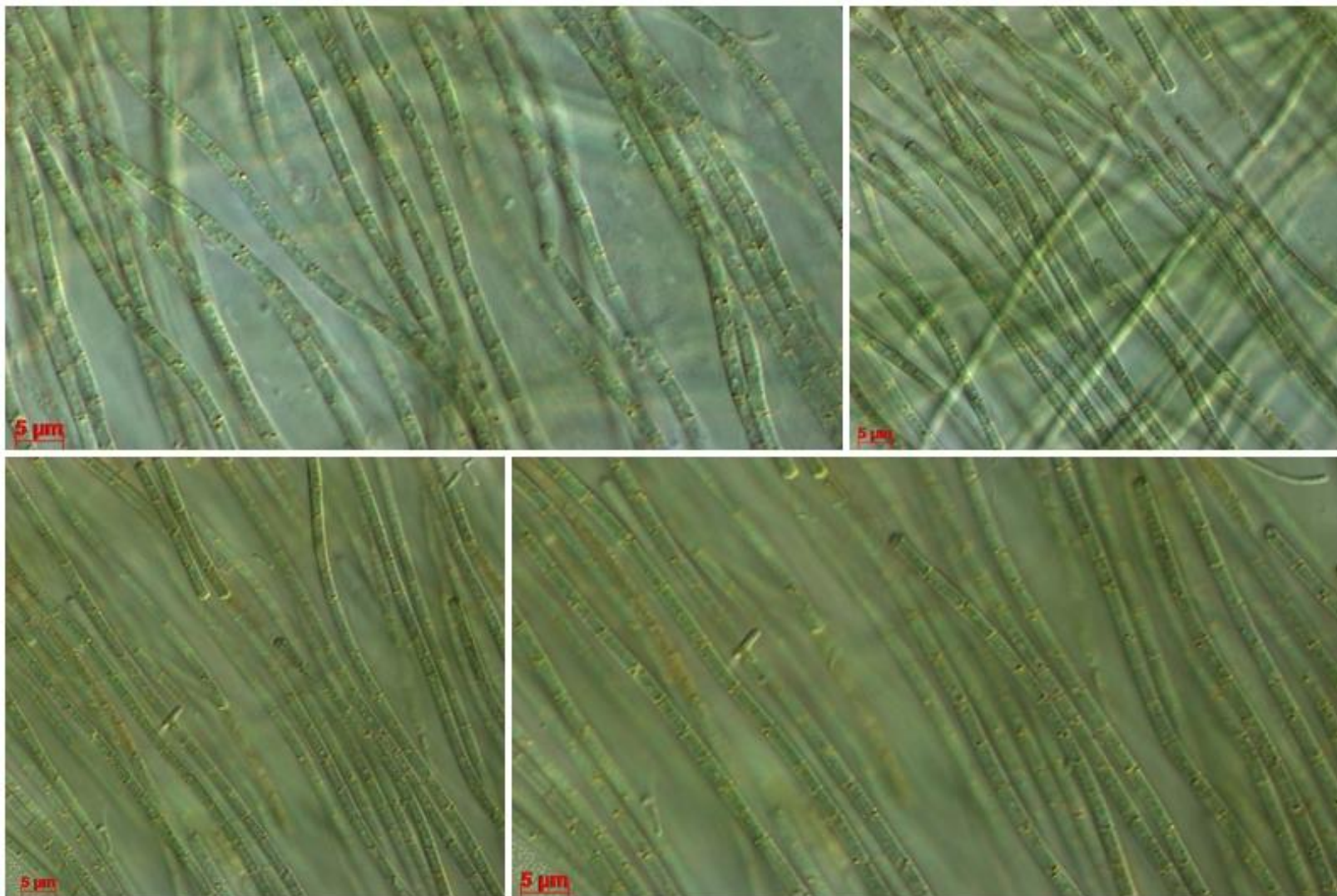


Foto číslo 1: Kmen 1*Geitlerinema pseudacutissimum*, lokalita: Slavkov



Foto číslo 2: Kmen 2 *Geitlerinema pseudacutissimum*, lokalita: Olomouc-Chomoutov

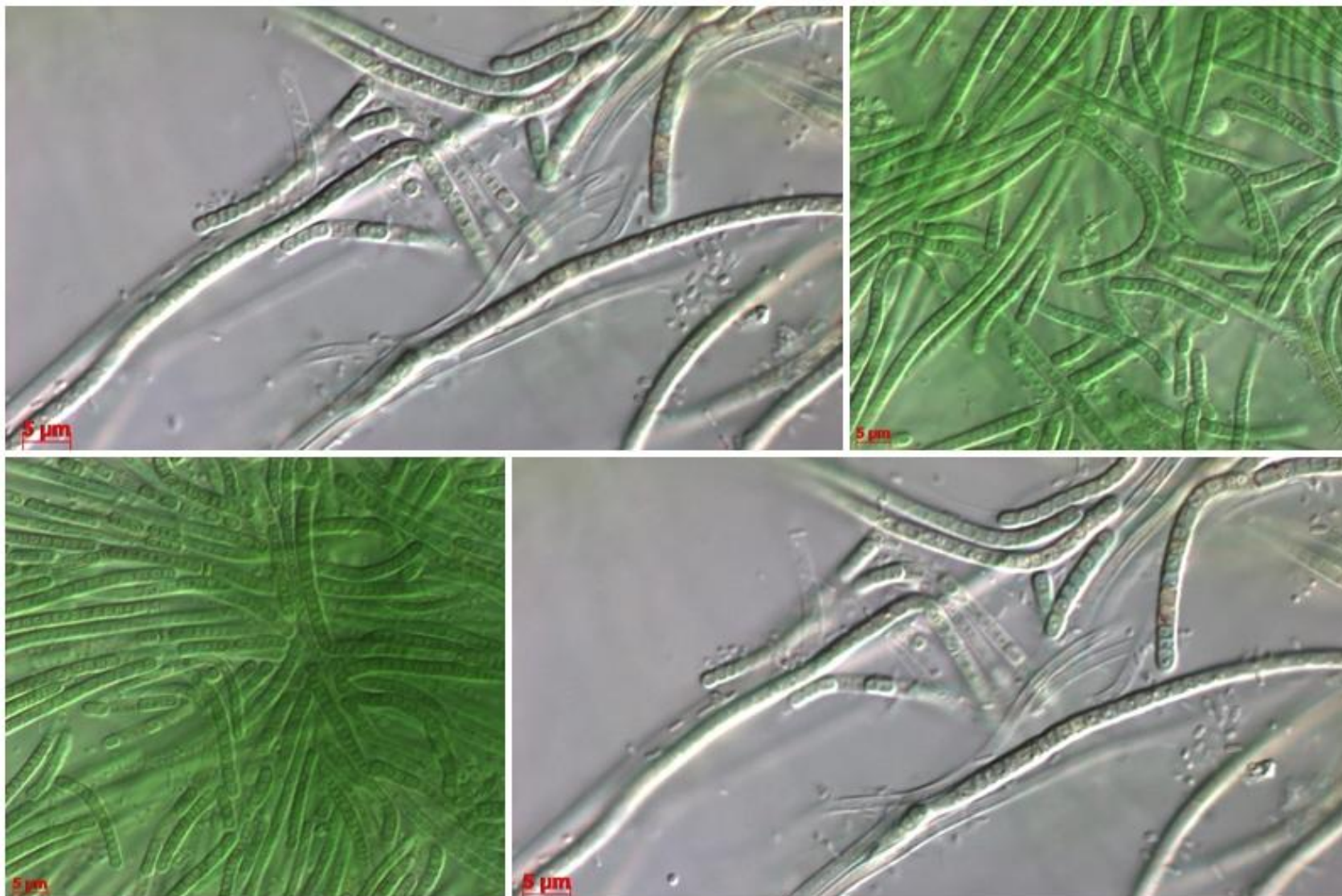


Foto číslo 3: Kmen 3 *Leptolyngbya cf. boryana*, lokalita: Olomouc-Poděbrady

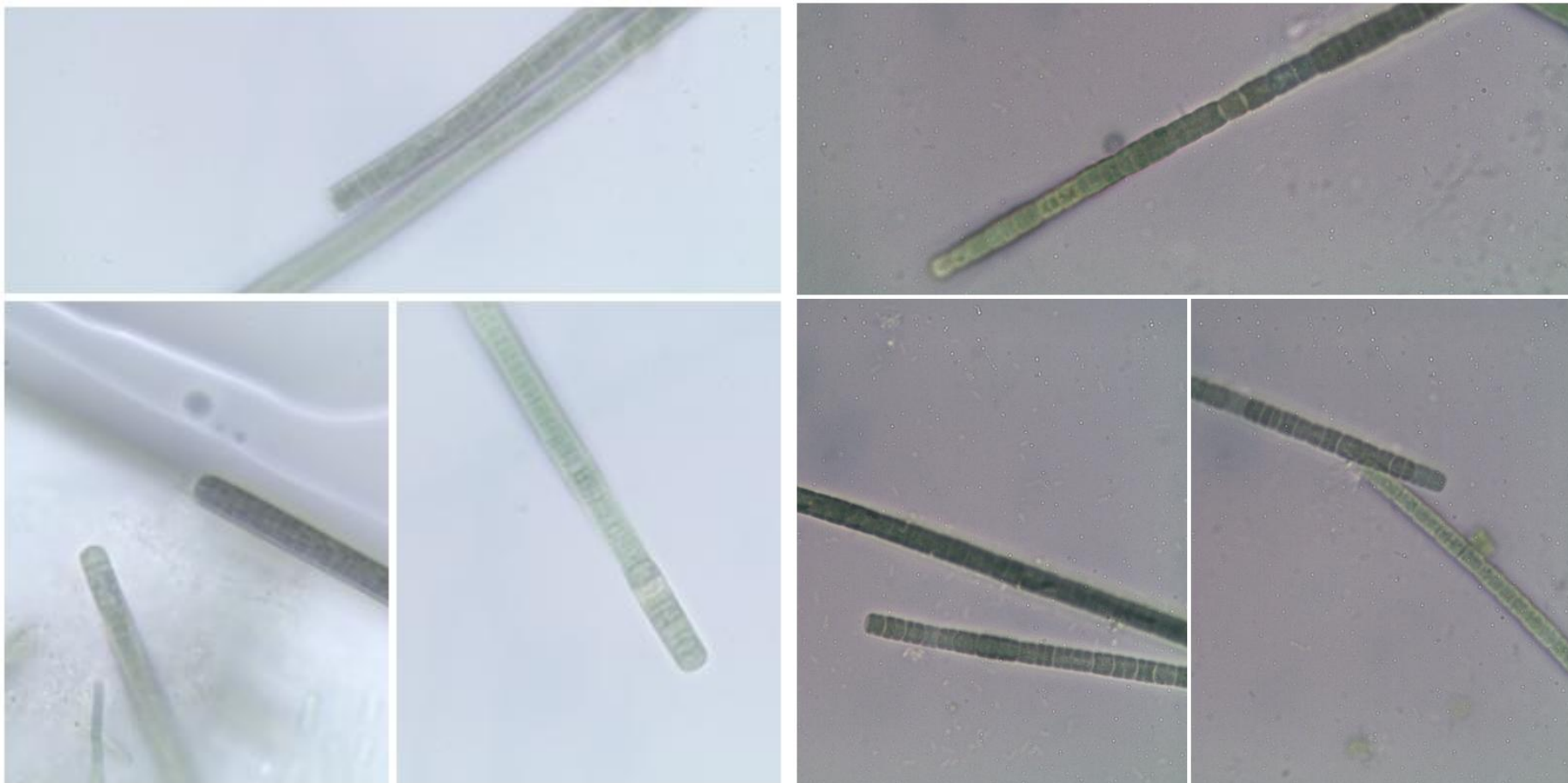


Foto číslo 4: Kmen 4 *Phormidium cf. tergestinum* lokalita: Litultovice

Foto číslo 6: Kmen 6 *Phormidium cf. tergestinum* lokalita: Raduň

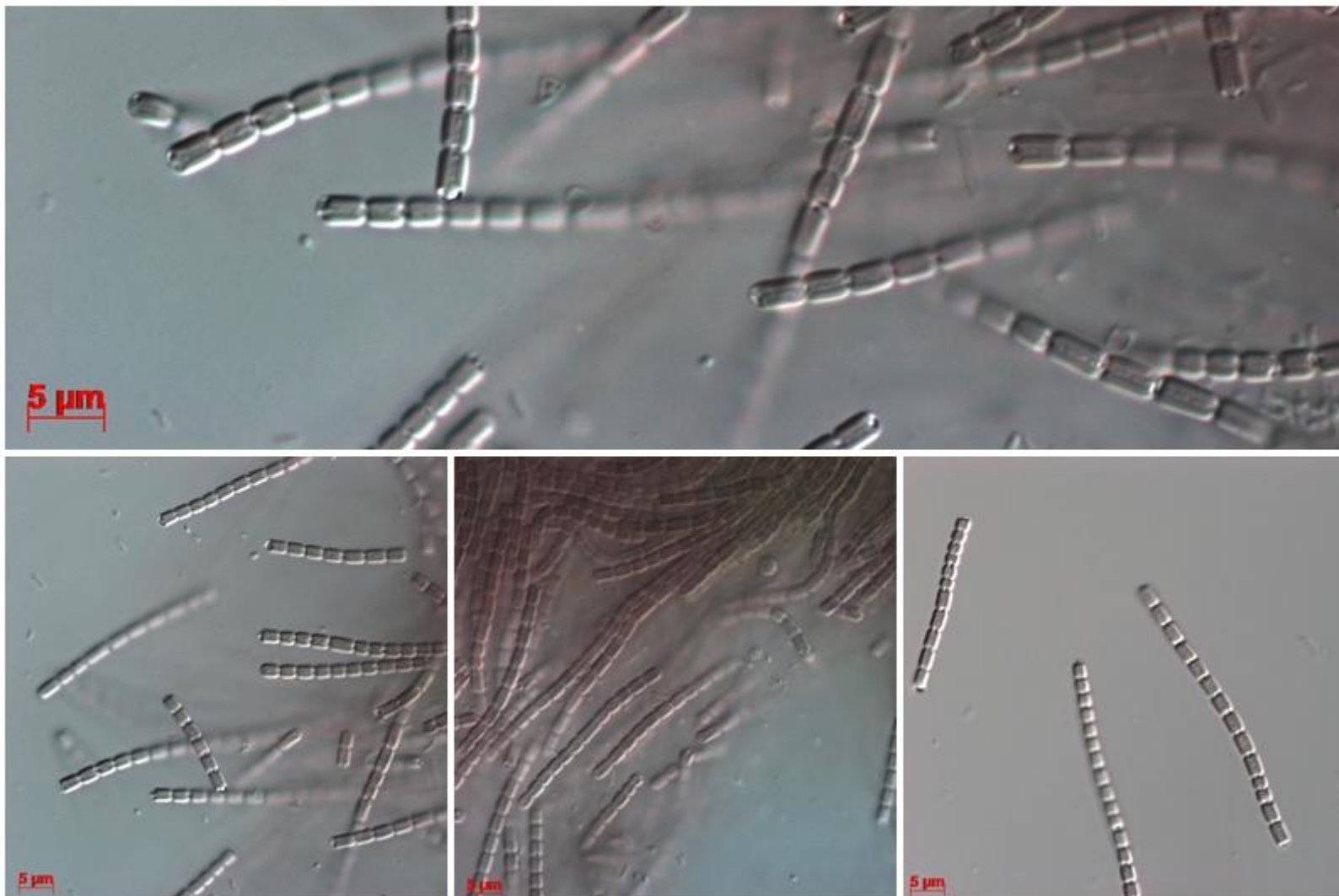


Foto číslo 5: Kmen 5 *Pseudanabaena galeata*, lokalita: Kravaře ve Slezsku

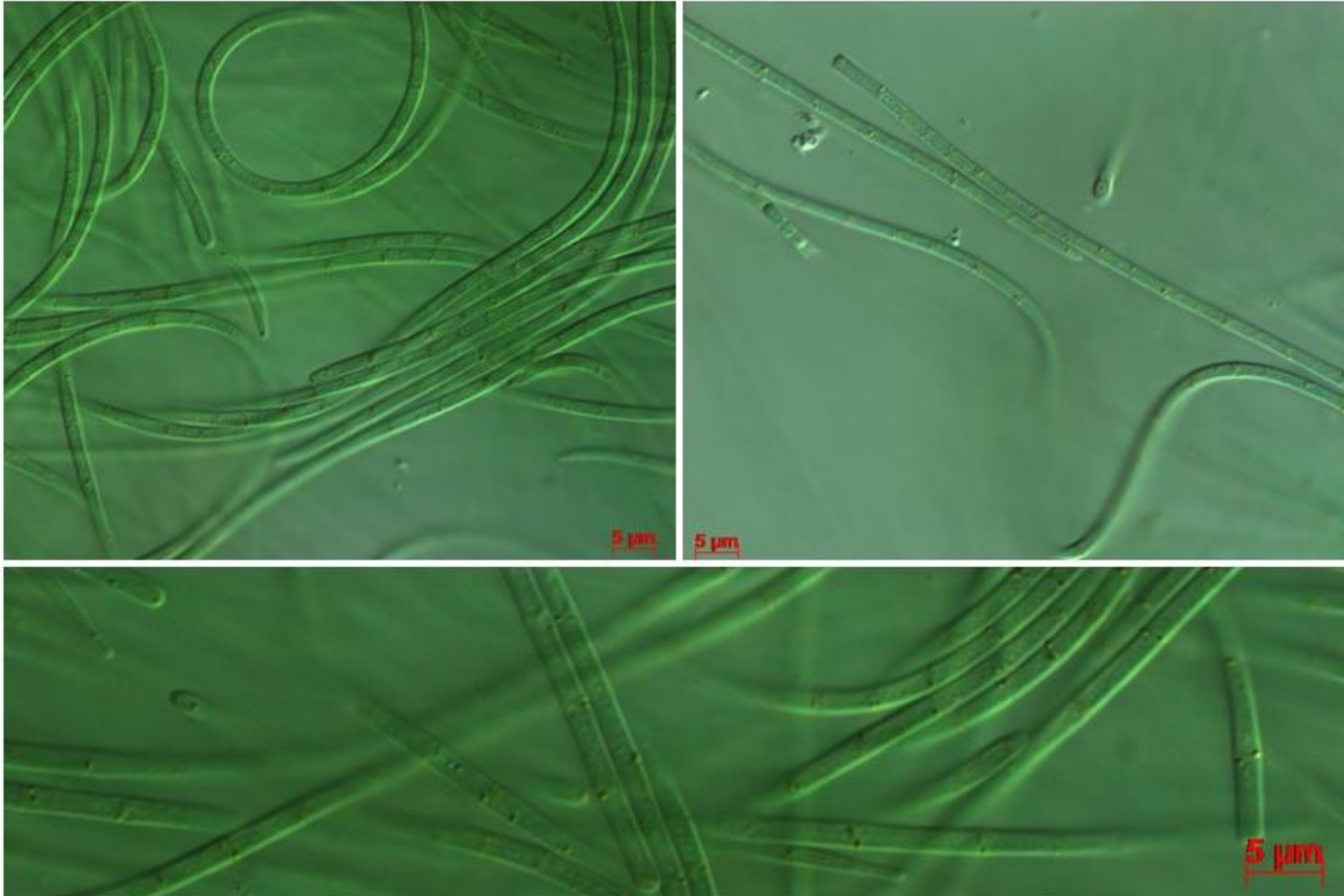


Foto číslo 7: Kmen 7 *Geitlerinema pseudacutissimum*, lokalita: Litultovice

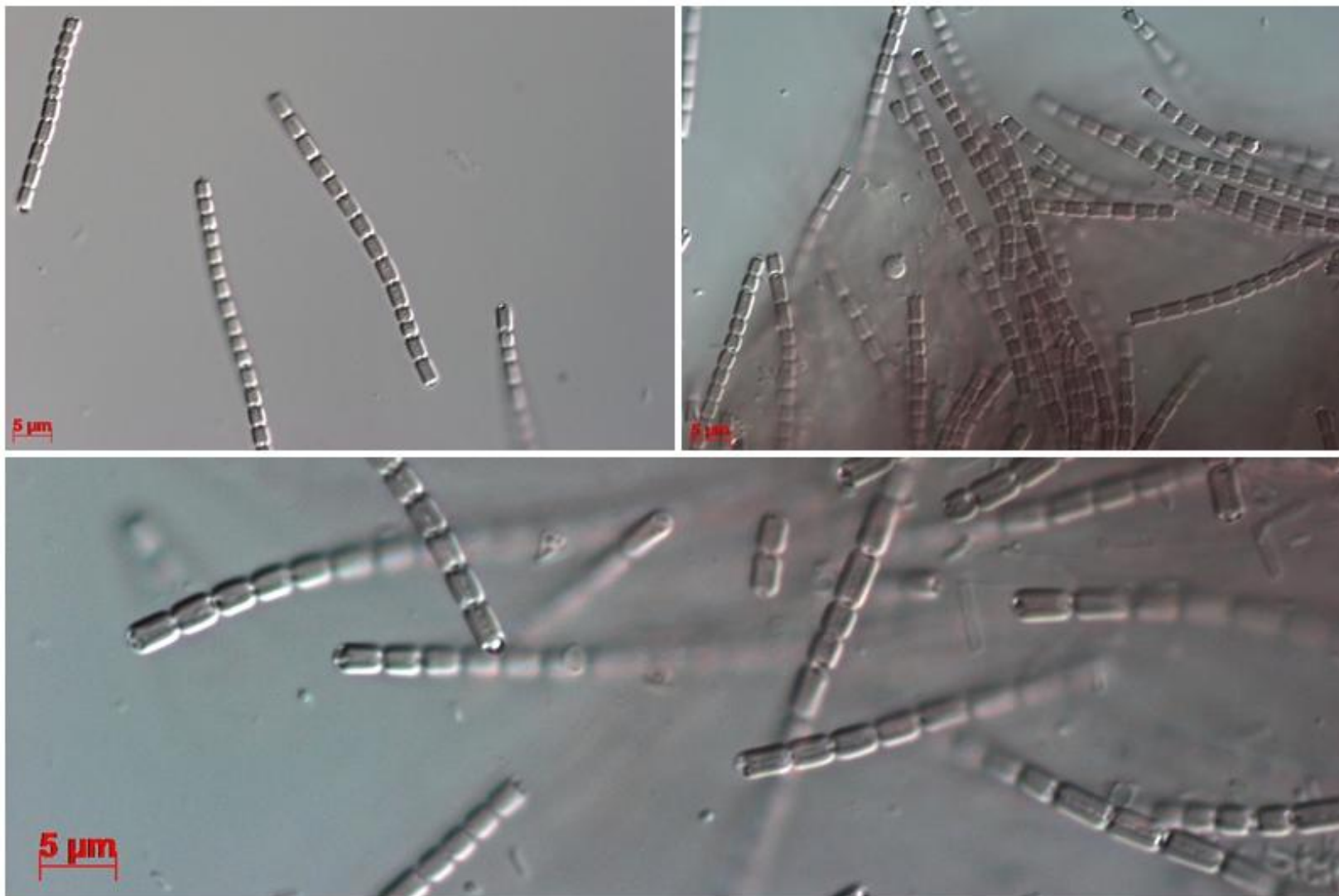


Foto číslo 8: Kmen 8 *Pseudanabaena galeata*, lokalita: Stříbrné jezero, Opava

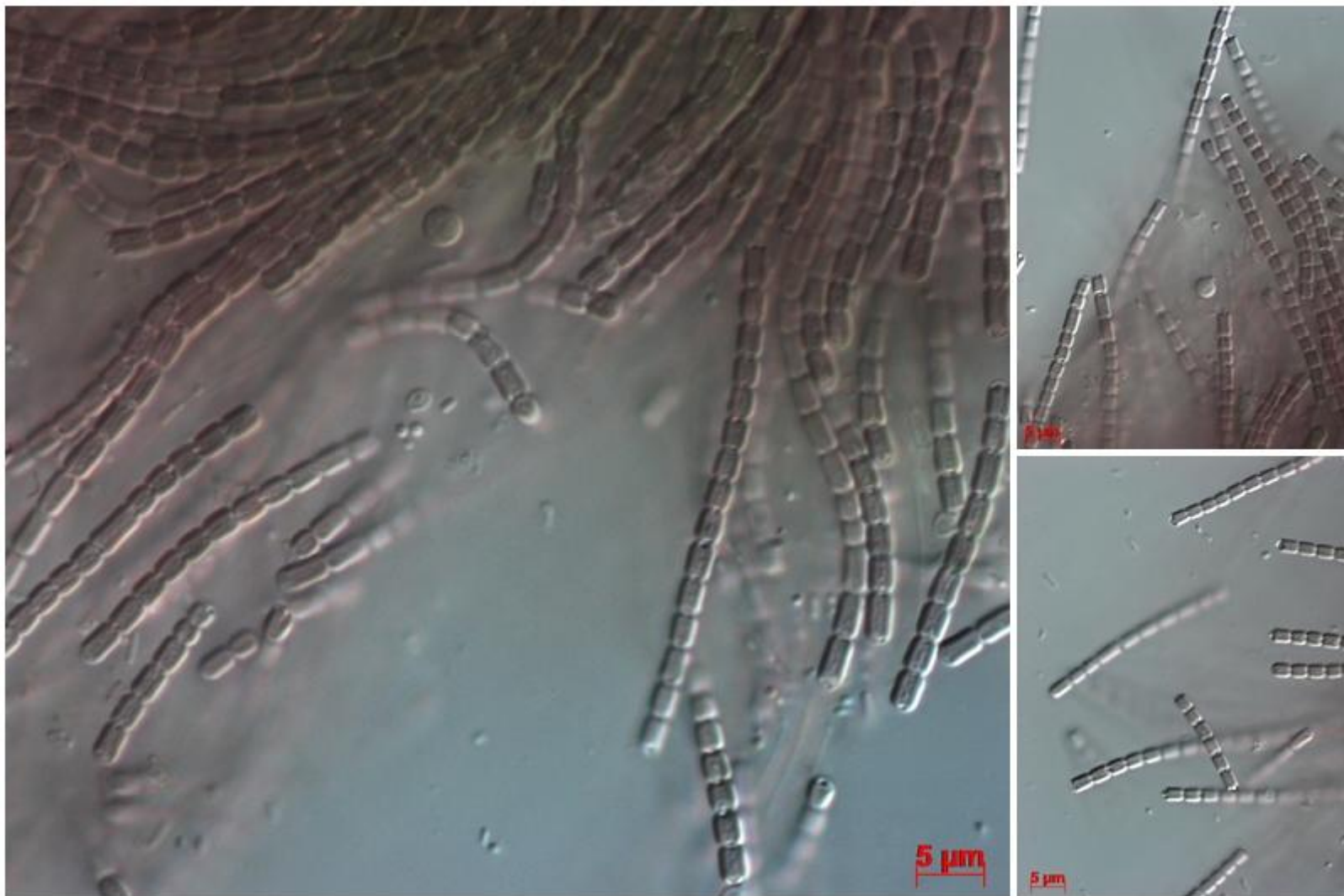


Foto číslo 9: Kmen 9 *Pseudanabaena galeata*, lokalita: Olomouc-Holice

Příloha číslo 2

Pracovní list na téma sinice

PRACOVNÍ LIST

SINICE



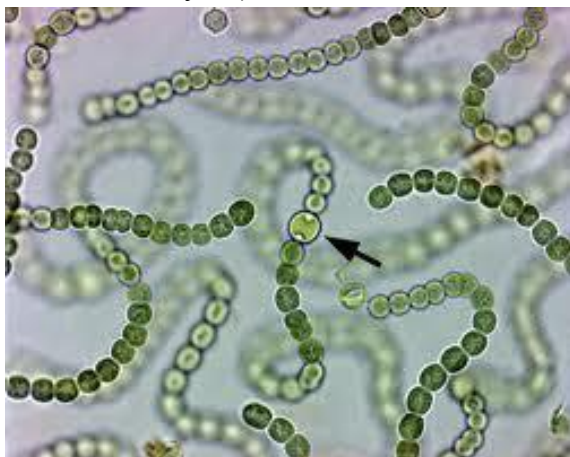
Sinice představují rozmanitou skupiny prokaryotních organismů, o to náročnější je tedy jejich určování. S pomocí tohoto pracovního listu se studenti naučí především rozpoznávat základní rody a to prostřednictvím morfologických charakteristik.

Vláknité sinice

Sinice tvoří rozmanitá vlákna od nejtenčích po ty, jejíž šíře přesahuje desítky mikrometrů. Rovněž je potřeba vnímat tvar a proporce jednotlivých buněk (izodiametrické, oválné, ...), přítomnost či absenci slizové pochvy. S pomocí následujících kroků lze úspěšně určit základní vláknité rody.

Bod 1 Přítomnost či absence heterocytů

Některé vláknité sinice tvoří specializované buňky zvané heterocyty. Jedná se o buňky kulovitého tvaru a homogenního obsahu sloužící k fixaci vzdušného dusíku (dáno přítomností zvláštního enzymu).



A vlákna s heterocyty



B vlákna bez heterocytů


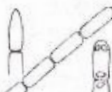






Úkol číslo 1 – V atlase řas a sinic, případně s pomocí internetu vyhledejte následující sinice a podtrhněte ty, které tvoří heterocyty.

Pseudanabaena, Nostoc, Phormidium, Homeotrix, Anabaena, Komvophoron

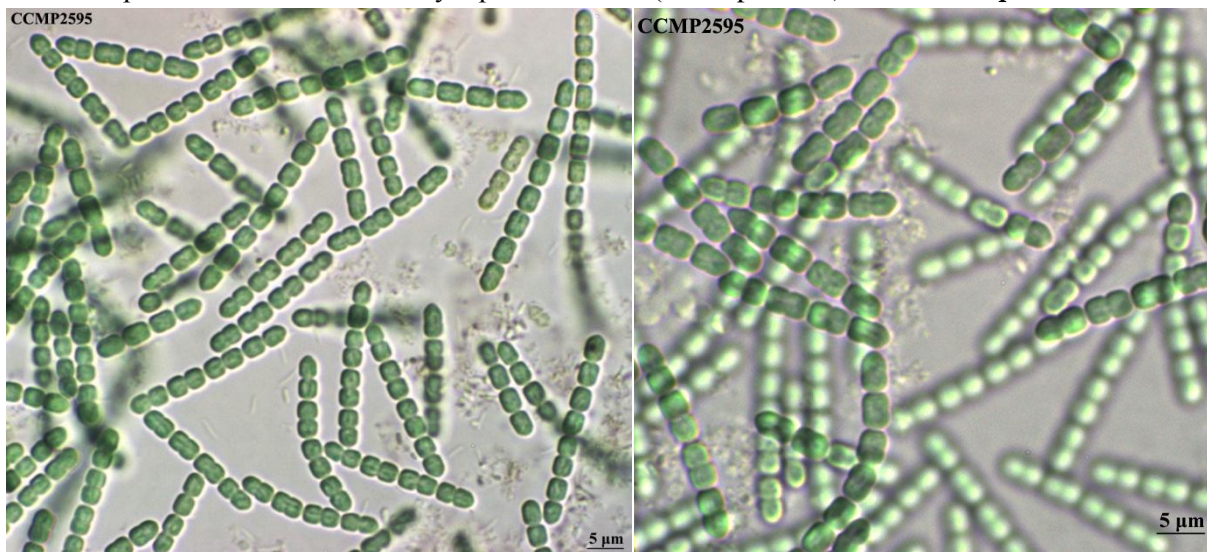
Bod 2 – Habitus vláken

Jedná-li se o vláknité druhy bez heterocytů, pak lze pro určení použít níže uvedenou tabulku. V tabulce je uvedeno 6 základních morfologických skupin.

Family	Habitus	Pohyblivost (buněk)	Pohyblivost (vláken)	Sliz. Pochva	Polarita (buněk)	Polarita (vláken)	počet vláken v sliz. pochvě <small>in a sheath</small>	Nepravé větvení	Celkový vzhled
Borziaceae		(+)	—	—	—	—	—	—	solitary trichomes or fine clusters
Pseudanabaenaceae		((+)) special type or —	((+))	— or (mucilag.) or (fine)	—	—	1	(+) rare in ensheathed trichomes	solitary trichomes, clusters or fine mats
Schizotrichaceae		—	+	+ (closed)	—	+	1 (rarely) or more	+	clusters, fascicles, mats, crusts
Phormidiaceae		+	+	— or +	—	—	1 or ((more))	— or ((+))	solitary trichomes, mats or strata
Oscillatoriaceae		((-)) or ((+))	+	(+) or ((+))	—	—	1 or ((more))	(+) or ((+))	(solitary), mats, strata
Homoeotrichaceae		—	(+)	+	+	+	1	(+) or +	solitary filaments, fascicles, clusters

Skupina 1 Borziaceae

Skupina sinic s izodiametrickými buňkami, vlákna nepohyblivá, nejsou obalena slizovou pochvou, rovněž nedisponují odlišnými póly. Zpravidla jsou tyto sinice samostatně žijící, nebo ve shlucích v menším počtu. Vlákna tvořena malým počtem buněk (4-10 zpravidla). **Rod *Komvophoron***

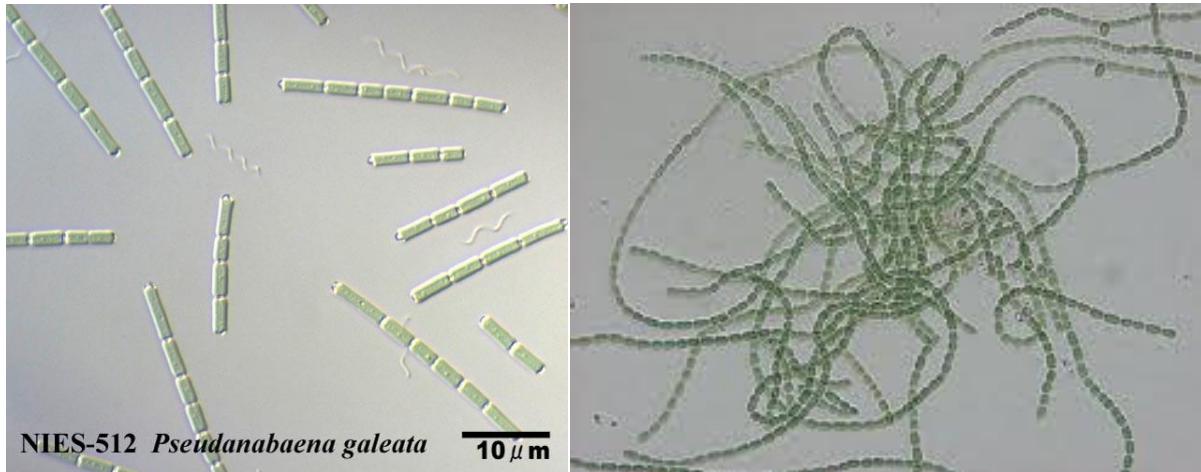


Skupina 2 Pseudanabaenaceae

Nejrozmanitější skupina sinic u nás, zástupci nabývají rozličných tvarů a rozměrů. Buňky zpravidla delší než širší, některé druhy však disponují buňkami izodiametrickými. Šíře vláken zpravidla nepřesahuje 4 mikrometry.

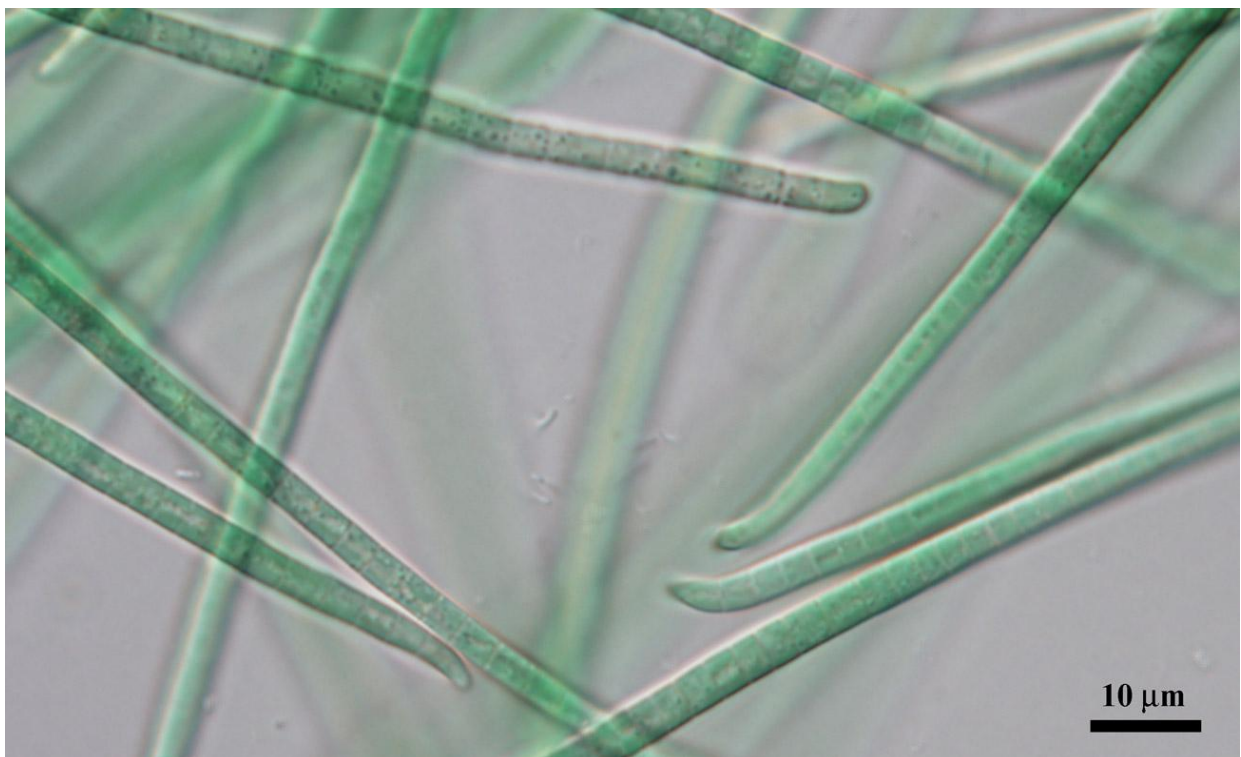
Rod *Pseudanabaena*

Zástupci tohoto rodu tvoří vlákna tvořená několika buňkami (8-16 nejčastěji), buňky delší než širší, vlákna pohyblivá, drobná, podoba s rodem *Komvophoron*, výrazné zaškrcování buněk. Poměrně hojná v ČR.



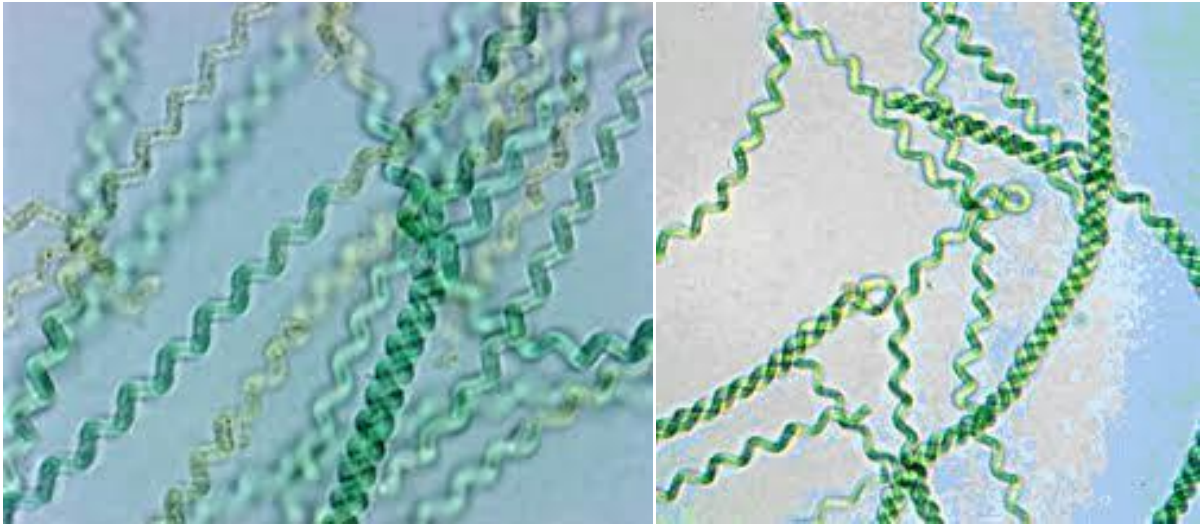
Rod *Jaaginema*, *Geitlerinema*

Rody charakterizuje natolik nevýrazná konstriktce, že odlišit od sebe jednotlivé buňky bez imerze je prakticky nemožné! Zpravidla se jedná o shluk velkého množství propletených vláken, variabilně zakončených. Buňky opět prodloužené do délky. Rody se od sebe liší mobilitou- *Jaaginema* je nepohyblivá, *Geitlerinema* pohyblivá. Šíře vláken obvykle opět nepřesahuje 5 mikrometrů.



Rod *Spirulina*

Velice nápadnou a výraznou, nezaměnitelnou sinicí je *Spirulina*. Jedná se o zástupce se spirálovitě zatočeným vláknem. Sinice má značný potenciál v biotechnologiích, vyrábí se z ní komerční produkt *Spirulina* (Zástupci, ze kterých se dnes výživový preparát SPIRULINA připravuje, jsou řazeni do rodu *Arthrospira*. Nicméně dříve byli řazeni do *Spirulina*).



Rod *Leptolyngbya*

Izodiametrické buňky, někdy „čtverečkovité“, jindy připomínající navlečené korálky, vlákna velice jemná, ještě jemnější, než-li *Jaaginema* a *Geitlerinema*. Často se právě s těmito zaměňuje, rozdíl je však v přítomnosti slizové pochvy, která se u tohoto rodu velmi často vyskytuje!





Úkol číslo 2: Na základě výše uvedených informací se pokus doplnit do tohoto výňatku z určovacího klíče jednotlivé rody. Jedná se o rody fylogeneticky příbuzné.

1 a Vlákna přibližně solitérní, rovná, zpravidla ne příliš dlouhá, častá přítomnost plynových váčků, buňky cylindrické, výrazná konstriktce.....
1 b Vlákna jemnější, vždy bez plynových váčků, zpravidla ve větším množství (tvoří povlaky).....2
2 a Vlákna vždy nepohyblivá
2 b Vlákna pohyblivá



Úkol číslo 3: Spoj stručnou charakteristiku ke správnému rodu

Spirálovitě zatočené vlákno	<i>Pseudanabaena</i>
Nepohyblivé vlákno obdobné Geitlerinema	<i>Spirulina</i>
Izodiametrické buňky bez slizové pochvy	<i>Komvophoron</i>
Výrazná konstriktce, nápadná podoba Komvophoron	<i>Jaaginema</i>

Skupina 3 Schizotrichaceae

Skupina sinic disponující slizovou pochvou obalující více než jedno vlákno. Poměrně vzácné typy v našich zeměpisných šířkách. **Rod *Schizotrix***



Skupina 4 Phormideaceae

Skupina pohyblivých širších vláken (od 4 mikrometrů) s často přítomnou slizovou pochvou. Buňky vláken jsou izodiametrické až širší než delší.

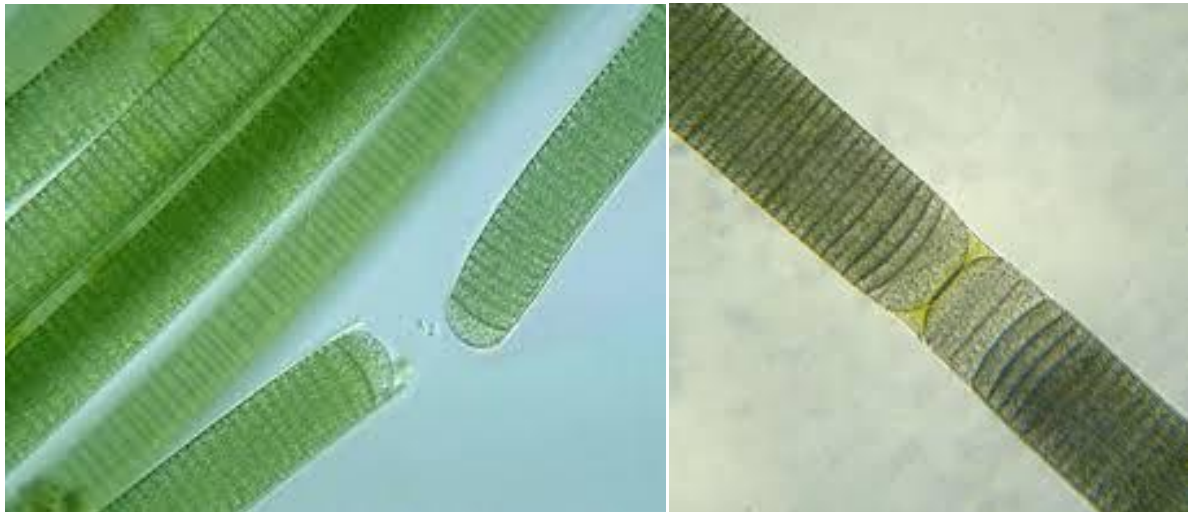
Rod *Phormidium*

Vlákná tvořena cylindrickými buňkami, konce variabilně zakrouceny, vysoká mobilita vláken, často, ne vždy tvoří slizovou pochvou, nikdy nejsou pozorovány aerotopy. Lze zaměnit s rodem *Oscillatoria* (Drkalka).



Skupina 5 Oscillatoriaceae

Zpravidla ještě širší vlákná než *Phormidium*, poměr mezi délkou a šířkou je daleko vyšší než u předchozí skupiny, vlákná připomínají sloupek tvořený naskládanými mincemi. Slizová pochva není přítomna, vlákná jsou pohyblivá, nepřehlédnutelná. **Rod *Oscillatoria***.

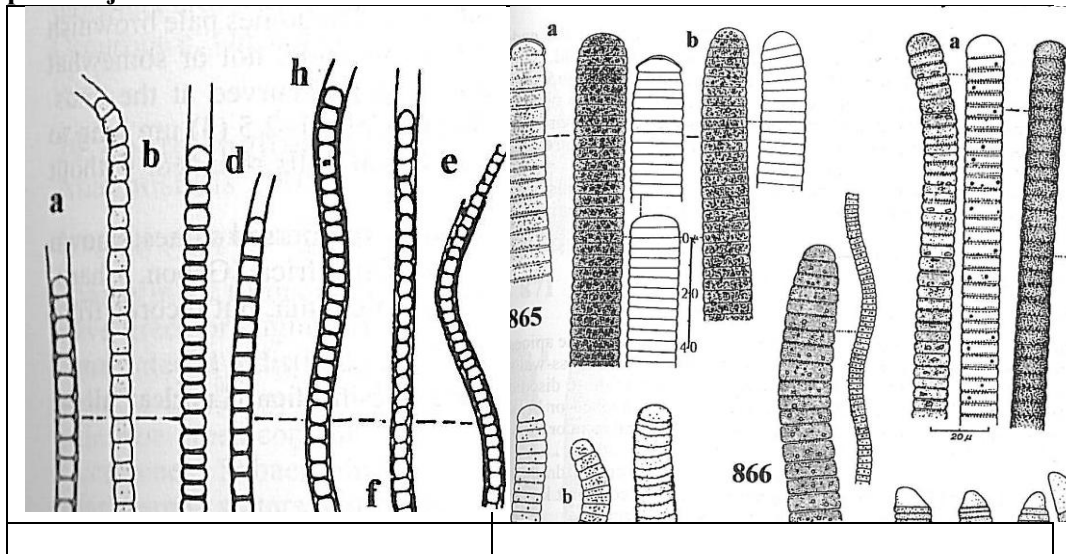


Skupina 6 Homeotrichaceae

Skupina s polarizovanými vlákny, horní pól zpravidla zašpičatělý, spodní konec přitisklý k podkladu. Zpravidla jemná vlákna, nepohyblivá, propojena se substrátem. **Rod *Homeotrix***.



Úkol číslo 4: Pokus se určit jednotlivé sinice na základě morfologických obrázků pocházejících z klíče.





Úkol číslo 5: Na základě obrázku přiřad' jednotlivá šíře náležícím daným vyobrazeným měřítkům, platná pro znázorněná vlákna. Výběr: 10 mikrometrů, 20 mikrometrů.

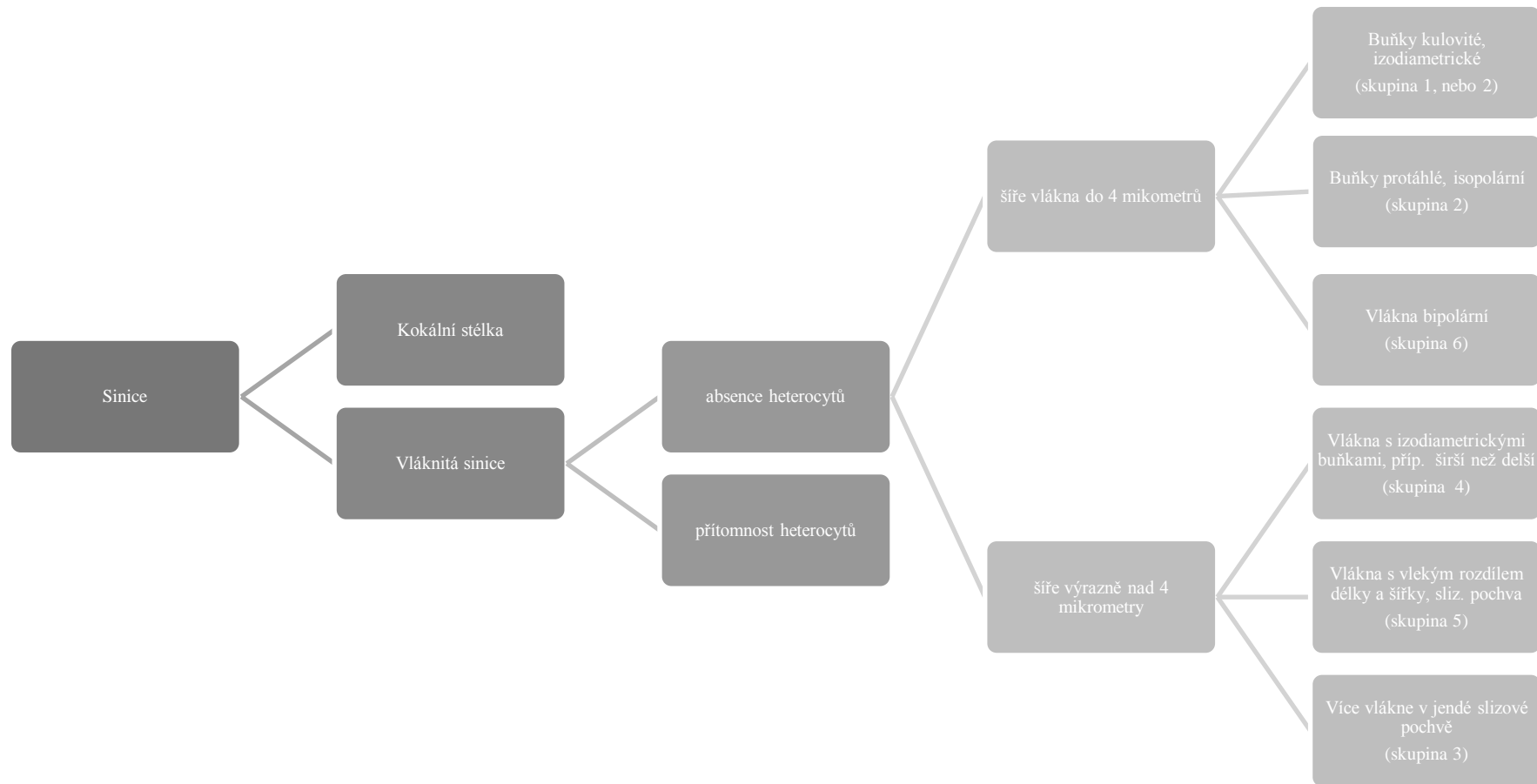
<p><i>Oscillatoria, Leptolyngbya</i></p>	<p><i>Phormidium</i></p>
<p><i>Pseudanabaena</i></p>	<p><i>Pseudanabaena</i></p>



Úkol číslo 6: Urči, zda jsou výroky pravdivé, či nikoliv. Nepravdivé uveď na pravou míru.

- Vlákna *Phormidií* jsou vždy opatřena slizovou pochvou, na rozdíl od *Oscillatorií*, která ji nemá. Ano x Ne
- U *Pseudanabaeny* lze spatřit slizovou pochvu, vlákna jsou zpravidla mobilní, mají výraznou konstriktci, lze zaměnit s *Komvophoronem*. Ano x Ne
- Buňky *Leptolyngbye* jsou nápadně protaženy, někdy mohou nabývat izodiametrického charakteru. Nicméně svou šíří jsou nezaměnitelné s *Oscillatorií*. Ano x Ne
- Leptolyngbya, Pseudanabaena* a *Komvophoron* disponují izopolárními vlákny. Ano x Ne

Myšlenková mapa určování sinic





Úkol číslo 7: Pokus se porovnat často lehce zaměnitelné rody – rozhodni, které vlákna náleží jaké sinici.

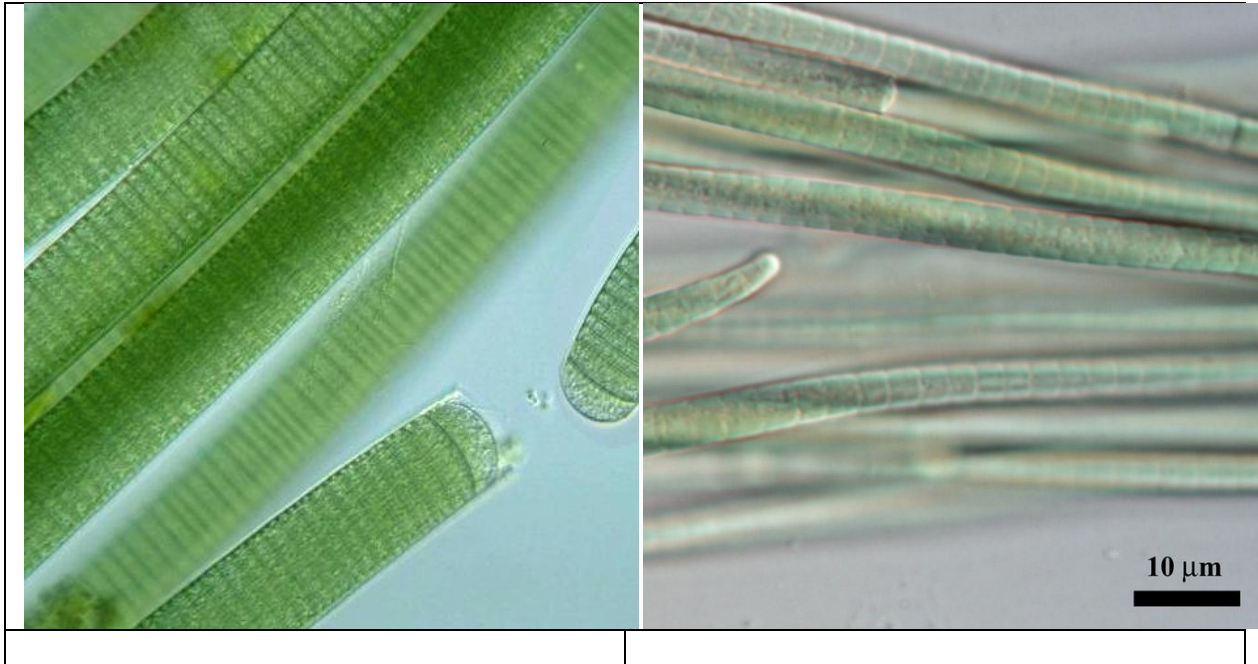
Komvopohoron vs. Pseudanabaena



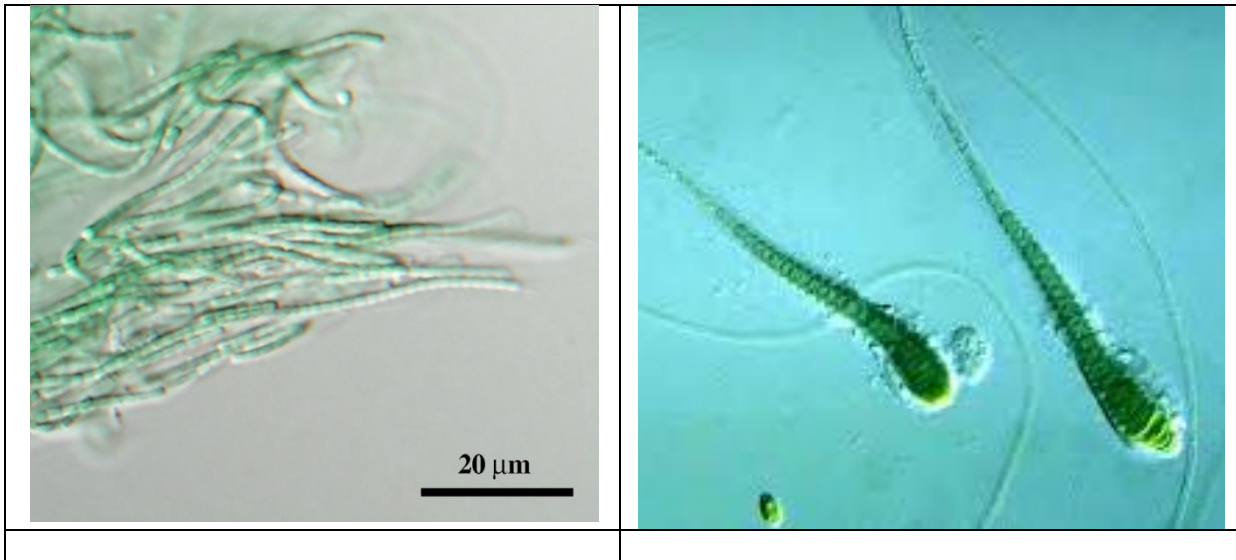
Geiliterinema vs. Leptolyngbya



Oscillatoria vs. Phormidium



Leptolyngbya vs. Homeotrix

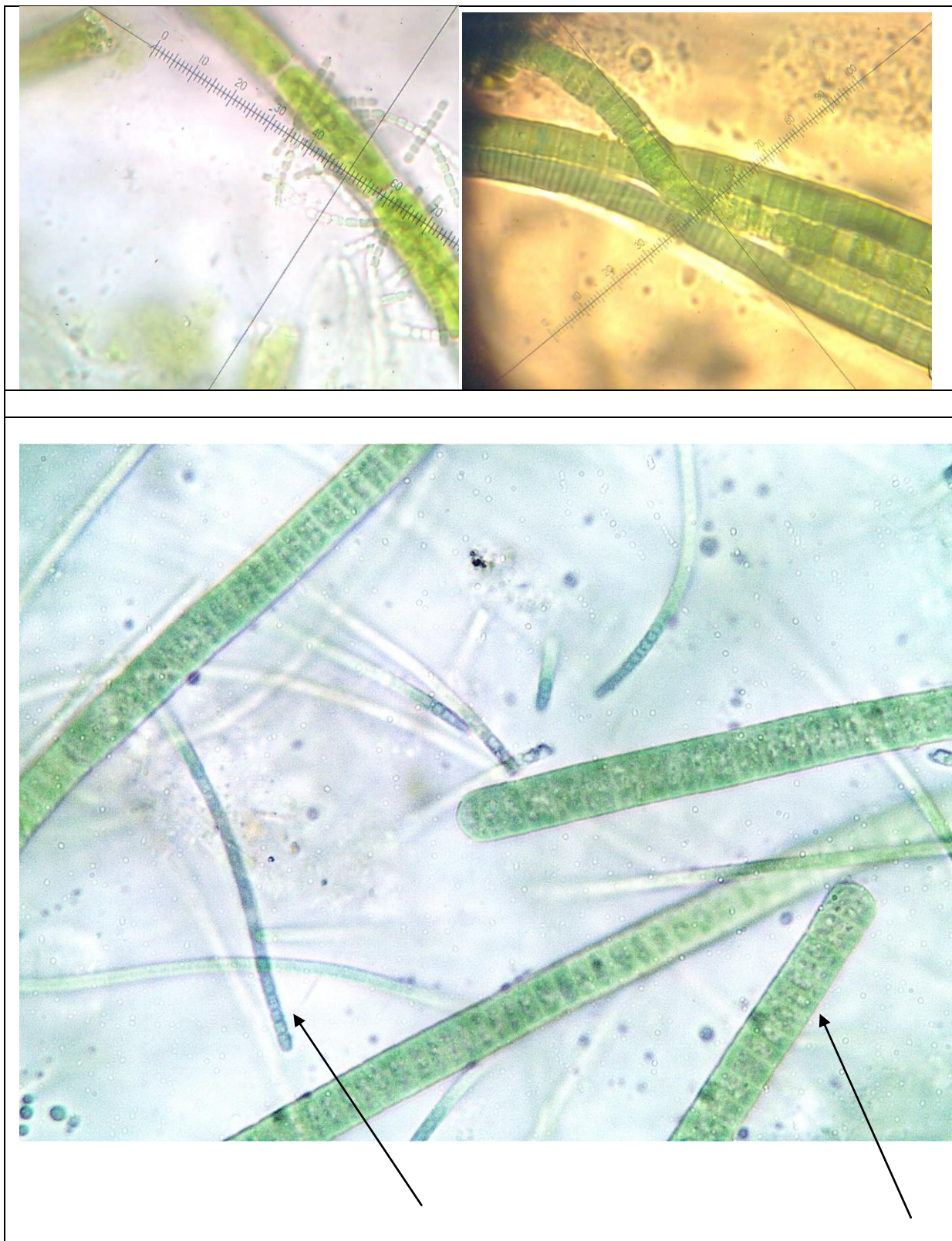


Úloha číslo 8: Doplně na základě morfologických charakteristik dané informace o vybraných rodech, k ověření užij klíč k určování sinic.

	Slizová pochva (ano x ne)	Polarita vlákn	Přítomnost heterocytů	Motilita
<i>Phormidium</i>				
<i>Leptolyngbya</i>				
<i>Pseudanabaena</i>				

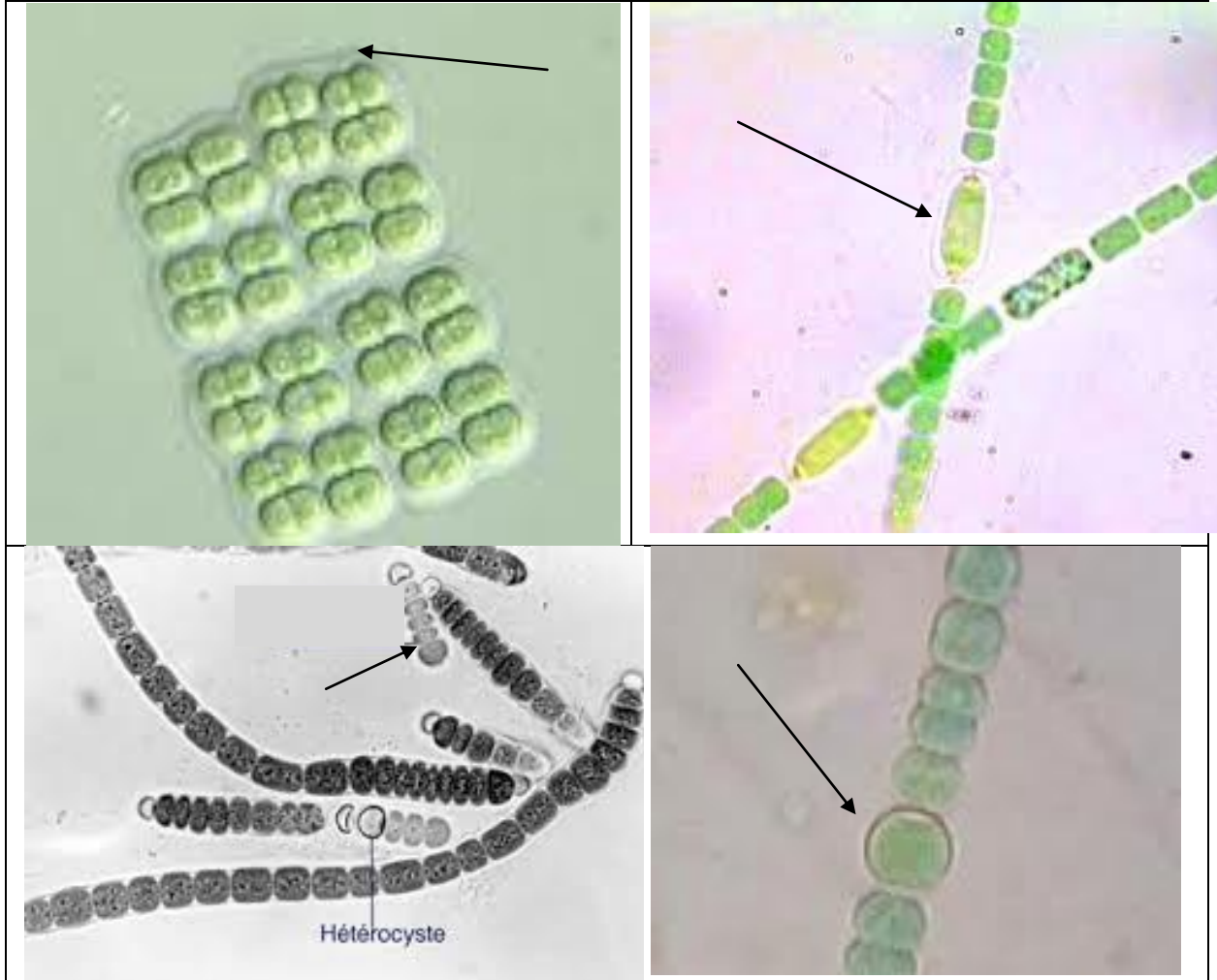


Úloha číslo 9: Pokus se na základě níže uvedených fotografií popsat jednotlivá zachycená společenstva. Pomohou ti znázorněné šípky.

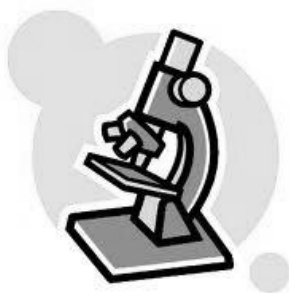




Úkol číslo 10: Vytvoř dvojice, kdy je název determinačního znaku spojen se svým obrazem. Prvky: hormogonie, slizová pochva, akineta, heterocyt

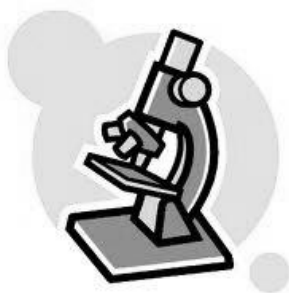


Blok úloh A Seznámení sinic



Praktické cvičení číslo 1: Detekce sinic

Úkolem tohoto cvičení je zjistit, zda se v tekoucích, či stojatých vodách v okolí bydliště nacházejí sinice. K testu postačí plastová láhev, do níž nabereme vodu z příslušného vodního tělesa a po dobu 20 minut vystavíme slunečnímu záření. Pokud se po uplynuté době objeví na hladině zelený proužek, zhotovíme nativní preparát a ujistíme se tak, zda je vody skutečně kontaminovaná.



Praktické cvičení číslo 2: Vodní květ

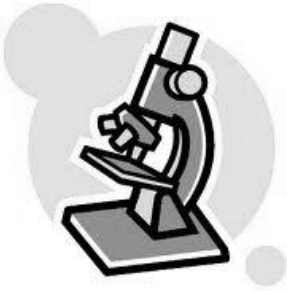
V tomto úkolu lze demonstrovat ekologický kontext některých (škodlivých) sinic. Žáci budou muset v okolí nalézt lenticovou vodu postiženou vodním květem. Z odebraného vzorku pak lze zhotovit preparát a určit sinice, které jsou za tento jev zodpovědné. Po dobu dvou týdnů je pak nutné sledovat, co se s květem bude dít a vše fotograficky zdokumentovat.



Vodní květ

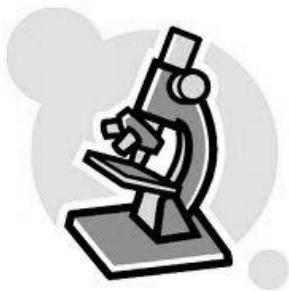
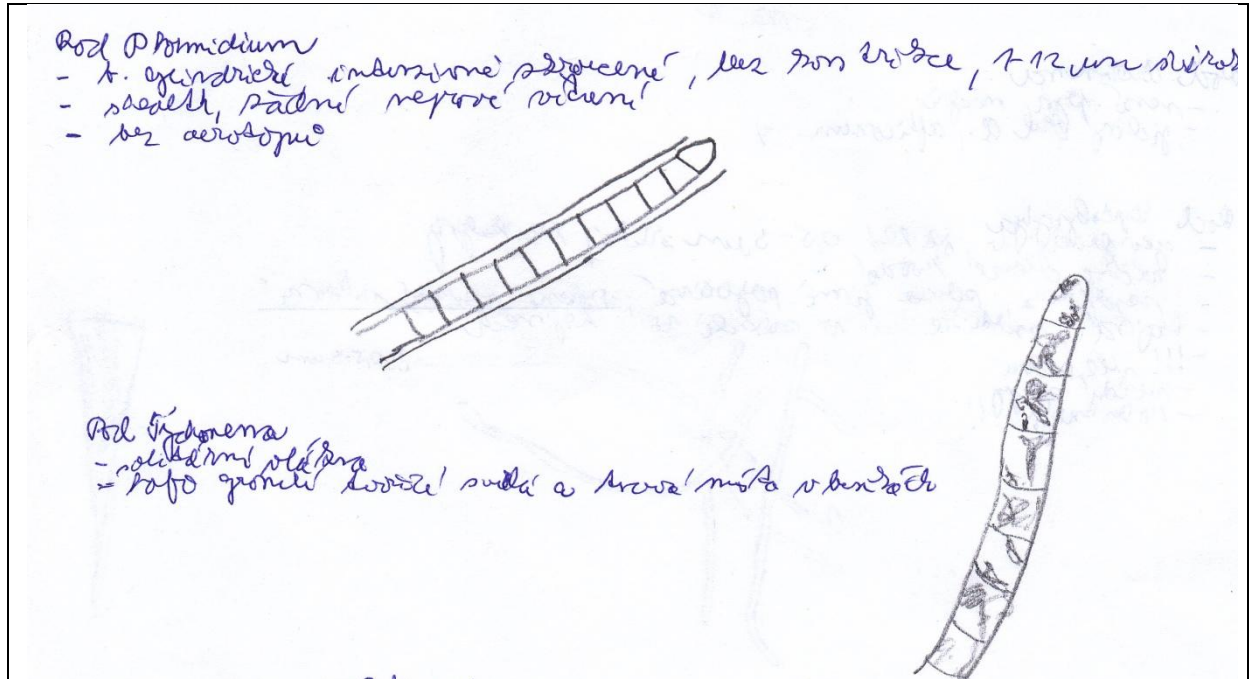
Jednoděložná krytosemenná rostlina

Blok úloh B Determinace sinic



Praktické cvičení číslo 3: Pozorování kultur

Jako nadcházející úkol by studenti měli pozorovat a sledovat rozličné kultury probíraných sinic. Krom samotného určení mají žáci sledovat a do protokolu zapsat proporce buněk, zakreslit zakončení apikálních buněk a další morfologické charakteristiky. Tím si studenti utvrdí nabyté znalosti a pokusí se je využít v praxi.



Praktické cvičení číslo 4: Pozorování reálných vzorků

Po zvládnutí předcházejícího cvičení jsou již studenti schopni rámcové orientace, což jim umožní pozorovat reálné vzorky, které pocházejí ze stojatých vod z okolí jejich bydliště. Úkolem tedy je vyhotovit odpovídající preparát a s pomocí určovací literatury determinovat dominantní sinice v daných společenstvech. Opět je třeba dbát na řádné pořízení protokolu se všemi náležitostmi.