

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Petra Hloušková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Využití molekulárních markerů v taxonomii  
sinic**

**Bakalářská práce**

**Petra Hloušková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

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

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Petra Hašlera, Ph.D. s použitím literatury citované v závěru.

V Olomouci dne 2. května 2011

.....

## SOUHRN

Molekulární marker je určitá vybraná část DNA, která svou kompozicí vypovídá o příbuznosti jedinců, populací, druhů.

Cílem bakalářské práce bylo srovnat možnosti využití metod založených na molekulárních markerech - 16S rRNA a AFLP v taxonomii vybraných sinic rodu *Nodularia* a rodů z řádu Oscillatoriales - *Phormidium*, *Geitlerinema*, *Microcoleus*. Dalším záměrem bylo optimalizovat metodu typu single-cell PCR a navrhnout vhodný postup při získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů.

V rámci rodu *Nodularia* studie srovnává bentické druhy *N. sphaerocarpa* s mořskými a brakickými druhy *N. harveyana* a *N. moravica*. Prokázalo se, že druh *N. harveyana* se odlišuje od ostatních vybraných druhů rodu *Nodularia*. Vzhledem k rozčlenění fylogenetických stromů bylo navrženo překlasifikovat kmen *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6) jako *N. harveyana*. A k přihlídnutí na příbuznost k *N. moravica* přehodnotit kmen *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) na *Nodularia* sp.

Analýzy vybraných kmenů z řádu Oscillatoriales učinily odlišné závěry. Byla potvrzena polyfyletie rodu *Phormidium*. Ze sekvencí oblasti genu 16S rRNA vyvozuje studie příbuznost *Ph. autumnale* a *M. vaginatus*. Pro následné určování fylogenetických vztahů těchto kmenů navrhuje studovat sekundární strukturu segmentu ITS nebo 11 bp dlouhého insertu na 6. smyčce 16S rRNA. Naproti tomu data získaná technikou AFLP přiřazují k seskupení *Phormidium* - *Microcoleus* navíc druhy *G. carotinosum* a *G. pseudoacutissimum* a poukazují tím na značnou heterogenitu rodu *Geitlerinema*. Za jediný dobře definovaný druh studie považuje typový druh *G. splendidum* a pro další studie doporučuje srovnávat druhy rodu *Geitlerinema* s *G. splendidum*.

Metoda single-cell PCR byla upravena opakovaným mrazením vzorků v tekutém dusíku. Některé PCR produkty byly následně osekvenovány a použity pro další fylogenetické studie. Využití této metodiky navíc odstraňuje problémy spojené s kultivací sinic.

Dále byla nalezena optimální metodika pro získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů, která může nalézt taktéž uplatnění v taxonomických studiích sinic. Ze získaných a následně osekvenovaných fragmentů mohou být navrženy primery specifické pro určitý rod nebo druh.

## SUMMARY

Molecular marker is a selected part of DNA, whose composition reflects the relationship among individuals, populations and species.

The thesis aim was to compare the possibilities to use of the methods based on molecular markers - AFLP and 16S rRNA in the taxonomy of selected cyanobacterial genera *Nodularia* and genera of the order Oscillatoriales - *Phormidium*, *Geitlerinema*, *Microcoleus*. A single-cell PCR method was optimised. Method of original sequences based on AFLP fragments was improved.

This study compares the benthic species of *N. sphaerocarpa* with marine and brackish species of *N. harveyana* and *N. moravica*. It was found that the species of *N. harveyana* is clearly differentiated from other selected genera of *Nodularia*. With respect to the position in phylogenetic tree it is proposed to classify the strain *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6) as *N. harveyana*. It is also suggested to label the strain *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) with the respect to the relationship to *N. moravica* and keep it as *Nodularia* sp.

The analyses of selected strains of the order Oscillatoriales made different conclusions. It was confirmed that genus *Phormidium* is polyphyletic. The sequences of the 16S rRNA gene concluded the relationship between *Ph. autumnale* and *M. vaginatus*. The study of the secondary structure of ITS segment or 11 bp long insert at the sixth loop of 16S rRNA will be better for the subsequent determination of phylogenetic relationships of these strains. In contrast, the data of the AFLP technique assigned to the group *Phormidium* - *Microcoleus* the strains of *G. carotinosum* and *G. pseudoacutissimum*. It adverts to the heterogeneity of the genus *Geitlerinema*. *G. splendidum* is only one well-defined species and for further studies it is recommended to compare the species of the genus *Geitlerinema* with *G. splendidum*.

Single-cell PCR was improved by the repeated freezing the samples in the liquid nitrogen. Then PCR products may be sequenced and used for further phylogenetic studies. This method eliminates the problems with the cultivation of cyanobacteria.

It was also found an optimal method for obtaining the original sequence from AFLP fragments, which may find an application in the taxonomy of cyanobacteria as well. It can be designed the primers specific to a particular genus or species based on the sequences of obtained fragments.

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D. za to, že mi umožnil pracovat na tomto zajímavém projektu i za jeho cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi RNDr. Miloslavu Kitnerovi, Ph.D. za vstřícný přístup při mých návštěvách laboratoře. Mgr. Petru Dvořákovi za podnětné rady. Také celému kolektivu Laboratoře molekulárních a proteinových markerů za přátelský přístup. V neposlední řadě nesmím opomenout svou rodinu, jež mi vytvořila skvělé podmínky při studiu a tvorbě práce.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>10</b>
3.1	CHARAKTERISTIKA SINIC.....	10
3.1.1	<i>Stavba buněk a specializované struktury .....</i>	<i>10</i>
3.1.2	<i>Rozmnožování.....</i>	<i>13</i>
3.1.3	<i>Ekologie sinic.....</i>	<i>13</i>
3.1.4	<i>Význam sinic.....</i>	<i>14</i>
3.2	TAXONOMIE SINIC.....	14
3.2.1	<i>Vybrané rody sinic.....</i>	<i>16</i>
3.3	MOLEKULÁRNÍ STUDIE SINIC.....	19
3.3.1	<i>Izolace DNA u sinic .....</i>	<i>20</i>
3.3.2	<i>PCR.....</i>	<i>20</i>
3.3.3	<i>Molekulární markery sinic.....</i>	<i>21</i>
3.3.4	<i>Molekulární metody.....</i>	<i>21</i>
3.4	FYLOGENEZE A EVOLUCE SINIC .....	23
3.4.1	<i>Sekvenování .....</i>	<i>24</i>
3.4.2	<i>Fylogenetické studie sinic.....</i>	<i>24</i>
3.4.3	<i>Vzdálenostní metody.....</i>	<i>25</i>
3.4.4	<i>Znakové metody.....</i>	<i>25</i>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>26</b>
4.1	MATERIÁL .....	26
4.2	EXTRAKCE DNA.....	29
4.3	AFLP .....	30
4.4	EXTRAKCE DNA Z AFLP FRAGMENTŮ .....	34
4.5	16S RRNA .....	36
4.6	SINGLE CELL PCR .....	37
4.7	TVORBA FYLOGENETICKÝCH STROMŮ.....	38
4.8	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	39
4.9	POUŽITÉ ROZTOKY .....	40
4.10	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>43</b>
5.1	FYLOGENETICKÉ STUDIE SINIC.....	43
5.1.1	<i>Fylogenetická studie sinic rodu Nodularia .....</i>	<i>43</i>
5.1.2	<i>Fylogenetická studie sinic rodů z řádu Oscillatoriales .....</i>	<i>47</i>
5.2	SINGLE CELL PCR .....	50
5.3	REAMPLIFIKACE AFLP FRAGMENTŮ .....	51
<b>6</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>64</b>

# 1 ÚVOD

V současné době se v taxonomii sinic uplatňuje tzv. polyfázový výzkum, kombinující morfologické, molekulární charakteristiky a znalosti ekologie druhů s cílem revidovat systém sinic. Napříč genetickou informací těchto mikroorganismů se nachází celá řada konzervativních úseků, která v průběhu evoluce podléhala četným změnám. Moderní molekulární metody jsou tyto rozdíly schopny detekovat a na základě nich konstruovat fylogenetické stromy a odhalovat vzájemné vztahy sinic. Takové úseky nazýváme molekulární markery.

Práce je zaměřena na taxonomii vybraných sinic rodu *Nodularia* a rodů z řádu Oscillatoriales (*Phormidium*, *Geitlerinema* a *Microcoleus*) z pohledu dvou metod založených na molekulárních markerech – 16S rRNA a AFLP. Dále hledá vhodný způsob získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů a snaží se optimalizovat metodu typu single-cell PCR.



## 2 CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na vývoj systematiky sinic
2. Optimalizace metodiky izolace DNA z kmenů sinic v příruční sbírce Katedry botaniky
3. Srovnání možnosti využití sekvence 16S rRNA a metody AFLP v systematice vybraných druhů sinic
4. Navržení vhodného postupu při získávání originálních sekvencí u vybraných druhů sinic z AFLP fragmentů
5. Optimalizace metody typu single-cell PCR u vybraných druhů sinic

## 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 3.1 CHARAKTERISTIKA SINIC

Sinice, neboli cyanobakterie, patří do skupiny gram-negativních eubakterií. Jejich morfologická variabilita je poměrně široká. Evolučně se jedná o velmi staré organismy, které se na Zemi objevily před 3,2 miliardami let a v průběhu svého vývoje se adaptovaly na většinu biotopů. Nacházejí je od rovníku až po území permafrostu. S jejich vývojem je spojen vznik kyslíkové atmosféry (KALINA and VÁŇA, 2005). Jsou známy také jako producenti široké škály sekundárních metabolitů, z nichž některé vykazují prokazatelně toxicitu (APELDOORN *et al.*, 2007).

Jejich stélky jsou jednobuněčné nebo vláknité, v obou případech mohou žít jednotlivě nebo tvořit kolonie, u některých druhů obalené slizem, který bývá intenzivně pigmentován karotenoidy.

Sinice ochotně vstupují do symbiotických interakcí. Nejvýznamnější je endosymbióza, která dala vzniku chloroplastům fotoautotrofních rostlin (KALINA *et al.*, 1995, 2005).

Není znám přesný počet taxonů, ale odhaduje se, že existuje minimálně 200 rodů a několik tisíc druhů sinic (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 1986, 1989; ANAGNOSTIDIS and KOMÁREK, 1988, 1990; KAŠTOVSKÝ *et al.*, 2003).

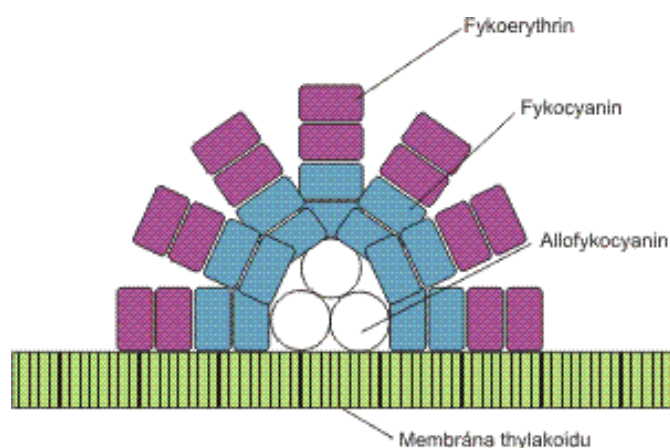
#### 3.1.1 Stavba buněk a specializované struktury

Buňky sinic mají pevnou buněčnou stěnu složenou z peptidoglykanů mureinu a kyseliny diaminopimelové, které znemožňují barvení protoplastu podle K. GRAMMA. Představují ji čtyři vrstvy, přičemž mezi dvěma z nich byla u některých sinic nalezena vrstva klouzavých mikrofibril, umožňujících charakteristický drkavý pohyb.

Pod povrchem buněčné stěny se nachází plazmatická membrána, plnící různé funkce jako je aktivní transport iontů, exkrece látek, zahajuje oddělování dceřiných protoplastů při dělení buněk a je sídlem dýchacích enzymů (KALINA *et al.*, 1995, 2005; CASTENOHOLZ, 2001).

Při pozorování živé buňky pod světelným mikroskopem lze rozlišit dvě oblasti, nápadněji zbarvenou chromatoplazmu a světlejší centroplazmu (KALINA and VÁŇA, 2005). Chromatoplazma obsahuje ploché váčky - tylakoidy, ve kterých probíhá fotosyntéza. Jejich uspořádání je patrně fylogeneticky významné. Membrána tylakoidu je složena z chlorofylu a,  $\alpha$ - i  $\beta$ - karotenů a z xanthofylů (echinenonu, myxoxanthofylu, zeaxanthinu) (KAŠTOVSKÝ *et al.*, 2003). Povrch tylakoidů pokrývají polokulovité

fykobilizomy (obr. 1), jež tvoří doplňkovou světloběrnou anténu fotosyntetického aparátu sinic. Základ fykobilizomu tvoří modrá allofykocyaninová dřeň, na níž nasedají krátké řetězky molekul červeného fykoerythrinu a modrého fykocyaninu. Poměr těchto dvou pigmentů určuje vlastní barvu buňky sinicové, která se mění podle složení světla a vlivem výživy. Tuto schopnost označujeme jako chromatická adaptace. Umožňuje sinicím žít při přezáření, nedostatku světla, při častých změnách intenzity ozáření.



**Obr. 1 - Struktura fykobilizomu (PANKRATZ and BOWEN 1963)**

Ve světlejší středové oblasti, centroplazmě, se nachází cytoplazma. V ní je umístěna velká kruhová molekula DNA, která je uspořádaná v četných smyčkách připevněných k plazmatické membráně pomocí RNA a bílkovin. DNA není oddělena od ostatní protoplazmy žádnou jadernou membránou a je bez histoproteinů. V buňce může být i několik molekul DNA, což závisí na stupni ploidie, která je u sinic poměrně běžným jevem.

V cytoplazmě sinic nalezneme též plasmidy, malé kruhové molekuly DNA, uplatňující se při rekombinačním procesu (SEMARI, 2010). Další složkou cytoplazmy jsou ribozomy, které se sestávají z malé a velké podjednotky, z nichž malá obsahuje 16S rRNA, zatímco velká 23S rRNA.

V buňce jsou přítomny také karboxyzómy, což jsou drobná tělíška ve tvaru mnohostěnu, často pozorovatelná v transmisním elektronovém mikroskopu. Obsahují enzym Rubisco, důležitý v temnostní fázi fotosyntézy.

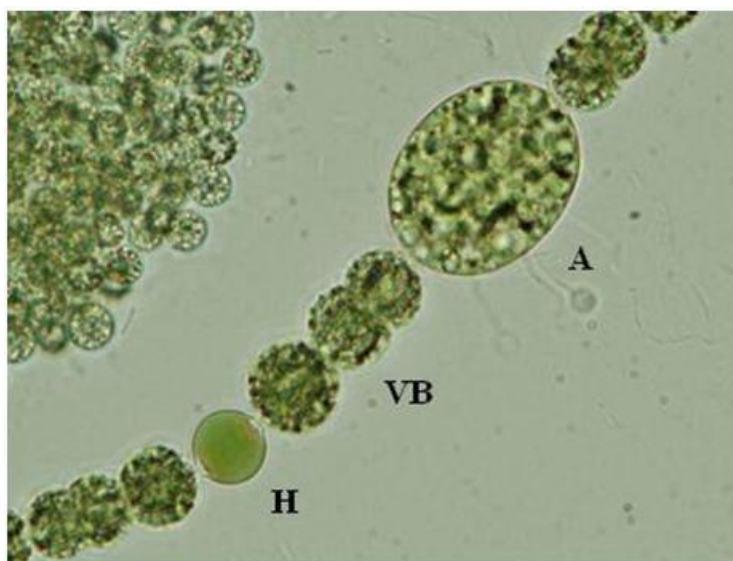
Zásobními látkami sinic jsou sinicový škrob, cyanofycinová zrnka a polyfosfátová granula (KALINA and VÁŇA, 2005).

Sinice mají několik struktur, které jsou specifické právě jen pro ně (KAŠTOVSKÝ *et al.*, 2003). Jsou to:

**AEROTOPY**- válcovité struktury ve tvaru mnohostěnu. Glykoproteinová stěna aerotopu je propustná pro všechny plyny rozpuštěné ve vodě, které jej také vyplňují. Jejich úkolem je snižovat specifickou hmotnost buňky a umožňovat sinicím vznášet se ve vodním sloupci. Jsou též jedinou známou plynem vyplněnou strukturou v živých buňkách. Sinicová buňka obsahuje až 10 000 aerotopů, jež vydrží tlak až 1000 Pa, kdy praskají (OLIVER and GANF, 1999; KALINA and VÁŇA, 2005).

**HETEROCYTY** – tlustostěnné buňky se silným slizovým obalem velikostí větší nebo srovnatelné s vegetativní buňkou. Jejich obsah se jeví jako homogenní, fotosystém I v nich však funguje. Vznikají metamorfózou z vegetativních buněk, a to především v podmínkách dusíkového hladovění. Komunikace se sousedními vegetativními buňkami probíhá pomocí pórů. Zajišťují především fixaci vzdušného dusíku, při které dochází ke štěpení molekuly dusíku za pomoci enzymu nitrogenázy v anaerobních podmínkách a následné syntéze amonného iontu, ten je dále vázán v glutamin a v této formě transportován do sousedních buněk (WOLK, 1982; KAŠTOVSKÝ *et al.*, 2003; KALINA and VÁŇA, 2005).

**AKINETY (ARTROSPORY)** - tlustostěnné reprodukční jednotky produkované některými sinicemi, sloužící k přežití nepříznivých podmínek. Je známo, že akinety rodu *Nostoc* se dochovaly životaschopné usušené v herbáři po dobu 86 let. Vznikají z jedné nebo více vegetativních buněk. Bývají větší než heterocyty a vegetativní buňky. Poznáme je většinou podle jejich hrubě zrnitého obsahu (NICHOLS and ADAMS, 1982; KAŠTOVSKÝ *et al.*, 2003).



**Obr. 2 - Heterocyt a akineta** (foto HAŠLER, *Anabaena planctonica*). A – akineta, H – heterocyt, VB – vegetativní buňka

### 3.1.2 Rozmnožování

Sinice se rozmnožují pouze nepohlavním způsobem. Jde o dělení buněk, začínající tvorbou příčné přehrádky, která vrůstá po celém obvodu buňky ve směru od obvodu do nitra buňky. U některých rodů jako je *Synechococcus* se buňka rozdělí jednoduše na dvě dceřiné. U jiných probíhá dělení ve dvou (*Merismopedia*) nebo třech na sebe kolmých rovinách jako se děje u rodu *Chroococcus*. Rod *Chamaesiphon* se rozmnožuje exosporami – beocyty. Ty vznikají na volném konci kyjovité buňky, která opačným koncem přisedá na pevný podklad. Beocyty jsou drobné, kulovité a uvolňují se po protržení apikální části buněčné stěny a postupně dorůstají. Vlákňité sinice se množí hormogoniemi, jsou to několikabuněčné části vlákna, která se oddělují od mateřského a dorůstají – *Phormidium* (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 1986; ANAGNOSTIDIS and KOMÁREK, 1988).

V posledních letech byla u jednobuněčných sinic prokázána genetická rekombinace pomocí vnesení malé plazmidové molekuly DNA (SEMARY, 2010). Zatím ovšem pouze v laboratorních podmínkách, ale předpokládá se, že podobně to bude fungovat i v přírodě. Pak bychom touto cestou mohli vysvětlit četné morfologické a fyziologické variability sinic (KALINA and VÁŇA, 2005).

### 3.1.3 Ekologie sinic

Sinice obývají nejrozmanitější biotopy na Zemi. Vyskytují se nejen ve vodních nádržích ve formě vodního květu, ale také ve vzduchu, v půdě, na vlhkých skalách, v rašeliništích, v moři nebo dokonce na ledovcích (ŠVEJNOHOVÁ and MARŠÁLEK, 2005). Mají schopnost přežít v extrémních podmínkách jako jsou pouště, místa s vulkanickou aktivitou, kde je vysoká koncentrace rozpuštěných solí a nízké pH. V příliš kyselém prostředí nerostou. Největší druhové bohatosti dosahují sinice v alkalických oblastech. Sinice rodu *Leptolyngbya* roste při pH až 13,5, což je nejnižší hodnota, při které je ještě možný život (KALINA and VÁŇA, 2005).

Často také vstupují do provázaných symbiotických vztahů s jinými organismy. Nejznámější je symbióza s lišejníky, játrovkami, hlevíky, kapradinami a nahosemennými rostlinami.

S přemnožením sinic ve vodách je úzce spojena eutrofizace. K eutrofizaci dochází přirozeně, ale ve většině případů se o ni velice významně zasazuje činnost člověka, vycházející z vypouštění odpadních vod do vodních toků, s používáním umělých hnojiv na polích, což má za následek tvorbu vodního květu (BARTRAM *et al.*, 1999). Vodní květ definujeme jako přemnoženou biomasu sinic, kterou můžeme

sledovat na hladině pouhým okem. Může mít formu vloček, jehliček nebo souvislých povlaků. Jeho vznik podmiňuje řada faktorů. Jedná se o vysokou koncentraci nutričních prvků, zejména dusíku a fosforu, sluneční záření, vysokou teplotu, pH, znečištění, obsah solí, přítomnost oxidu uhličitého a samozřejmě výhodnější pro jejich tvorbu je stojatá nebo mírně tekoucí voda (DUY *et al.*, 2000). Při takových, pro sinice příznivých, podmínkách pozorujeme na hladině zelenou pěnu, shluky bentosu a části rostlin. Tyto rozkládající se organické zbytky způsobují vyčerpání rozpuštěného kyslíku ve vodě, což má za následek úhyn ryb nebo hromadění sekundárních metabolitů sinic, z nichž velké spektrum tvoří toxické látky, cyanotoxiny. Voda je pak nevyužitelná v jakémkoli smyslu (BARTRAM *et al.*, 1999). Cyanotoxiny představují problém především v otázce pitné vody. Bohužel se těchto látek nelze zbavit běžnými způsoby jako je filtrace, sedimentace, flokulace nebo desinfekce chlorem (APELDOORN *et al.*, 2007). A vzhledem k vysoké adaptabilitě sinic je velice obtížné se vodního květu zbavit (KALINA and VÁŇA, 2005).

### **3.1.4 Význam sinic**

Z řady hledisek můžeme sinice považovat za perspektivní skupinu organismů. Pro svoji schopnost vázat vzdušný dusík se hojně využívají k pěstování rýže, kde nahrazují umělá hnojiva. Uplatňují se také při zrání léčivých bahen. Jsou též hodnotným zdrojem bílkovin. V mnohých státech se pěstuje *Spirulina* jako doplněk stravy pro svou lehkou stravitelnost, obsah karotenu a vitamínu B<sub>12</sub>. Její konzumní množství však musí být omezeno, ukázalo se, že může způsobit hyperalergenní reakce. Sinice jsou zdrojem fykobiliproteinů, zejména modrého fykocyaninu, jenž se používá jako netoxické barvivo a přirozený fluorochrom při sledování metabolických procesů. Výsledkem činnosti sinic vznikly stromatolity a travertin (KALINA *et al.*, 1995, 2005).

## **3.2 TAXONOMIE SINIC**

Molekulární metody vnesly do taxonomie sinic nové pohledy na utváření jejich systému. Tím prvním je teze, že by se morfologická charakteristika měla shodovat s fylogenetickým postavením. Problém spočívá v tom, že mnoho osekvenovaných kmenů bylo nesprávně pojmenováno. Je tedy nutné sjednotit nomenklaturu a zrekonstruovat fylogenetické stromy.

Byla nalezena velká genetická diversita u morfologicky jednoduchých vláknitých sinic a Chroococcales. Některé morfologické rozlišovací znaky (přítomnost pochvy, pravé a nepravé větvení) se ukázaly nekompatibilní s molekulárním

výzkumem. Usuzuje se, že tyto znaky jsou pravděpodobně pouze ekotypickým rysem konkrétních kmenů (KOMÁREK, 2009). Naproti tomu se v některých znacích jako je pozice tylakoidů v membráně, typ dělení nebo struktura buněčné stěny shodovaly (TURRICCHIA *et al.*, 2009).

Celá řada druhů byla popsána na základě jednoho nebo dvou morfologických znaků. Snahou je vytvořit jakousi hierarchii těchto rysů, tak jak jsou důležité z hlediska genetiky a aplikovat je do systému. Práci stěžuje fakt, že jednotlivé charakteristické znaky mají rozdílnou intenzitu projevu v různých podmínkách prostředí (KOMÁREK, 2009).

Výsledky získané z 16S rRNA se více či méně shodují s tradičním systémem, definovaným na základě fenotypických znaků. V posledních letech se uplatňuje molekulární členění (95% shoda mezi jedinci je interdruhová) kombinované alespoň s jedním autapomorfním cytomorfologickým znakem. Takto definovaný druh pak přísluší k jednomu ekotypu (GARCIA-PICHEL *et al.*, 1998).

Moderní výzkum vede k rozdělení sinic do taxonomických jednotek, které budou charakterizovány, jak morfologicky, tak geneticky. Celý systém je postupně revidován.

Oddělení Cyanophyta obsahuje jedinou třídu Cyanophyceae a ta se na základě morfologie a podle stavby stélek dělí do čtyř hlavních řádů (KALINA and VÁŇA, 2005):

#### **Řád: Chroococcales**

Jednobuněčné sinice s kulovitými, vejčitými nebo elipsoidními buňkami, žijí jednotlivě nebo v koloniích, obklopených homogenním nebo vrstevnatým slizem, buňky se dělí v jedné nebo v několika rovinách, akinety a heterocyty chybí. Řád Chroococcales se rozděluje do 7 čeledí. Mezi významné zástupce patří rod *Aphanocapsa*, *Microcystis*, *Woronichinia* (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 1986, 1998).

#### **Řád: Nostocales**

Vláknité typy sinic. Vlákna přímá nebo nepravě větvená ve slizových, často vrstevnatých a hnědě zbarvených pochvách. Téměř vždy tvoří heterocyty a akinety. Žijí jednotlivě (*Anabaena*) nebo v koloniích (*Nostoc*). Rozmnožují se tvorbou hormogonií. Řád se rozděluje do 4 čeledí. Mezi zástupce řádu patří rody *Nostoc*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 1989).

### **Řád: Oscillatoriales**

Sinice s vláknitou stélkou. Jsou nevětvené, někdy se vyskytuje nepravé větvení, tj. volné spojení vláken pomocí slizových pochev. Netvoří heterocyty ani akinety. Rozmnožují se hormogoniemi (*Phormidium*, *Oscillatoria*). Často lze pozorovat různé způsoby pohybu vláken. Řád se dělí do 6 čeledí. Mezi planktonní zástupce řádu patří rody *Planktothrix*, *Pseudanabaena* (ANAGNOSTIDIS and KOMÁREK, 1988; KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005).

### **Řád: Stigonematales**

Vláknité sinice s pravým větvením, obvykle obklopeny slizem. Vlákna mají jednu nebo více řad buněk. Obsahují heterocyty. Především nárostové druhy na velkých skalách a kmenech stromů. Řád se v současné době dělí na 8 čeledí. Mezi zástupce řádu u nás patří rody *Stigonema*, *Hapalosiphon* (ANAGNOSTIDIS and KOMÁREK, 1990).

## **3.2.1 Vybrané rody sinic**

### ***Geitlerinema***

Sinice náležící do řádu Oscillatoriales. Trichomy nerozvětvené, isopolární, rovné, někdy mírně stočené, zřídka samostatné, bez heterocytů, akinet i pochev. Buňky cylindrické, protáhlé nebo více či méně isodiametrické. Obsah buněk světle modro-zelený, žlutavě zelený, olivově-zelený nebo sytě zelený. Buněčné dělení – příčné kolmo k podélné ose trichomu. Dceřiné buňky dorůstají ± do velikosti mateřské buňky. Rozmnožování i pomocí hormogonií (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005).

### ***Microcoleus***

Sinice z řádu Oscillatoriales. Vlákna ve svazcích, rovná, zřídka mírně zakřivená ve společné slizové pochvě. Buňky obvykle isodiametrické. Buněčné dělení příčné, dceřiné buňky dorůstají do původní velikosti mateřské buňky. Reprodukce též fragmentací trichomu, často pomocí nekrotických buněk nebo tvorbou hormogonií (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005).

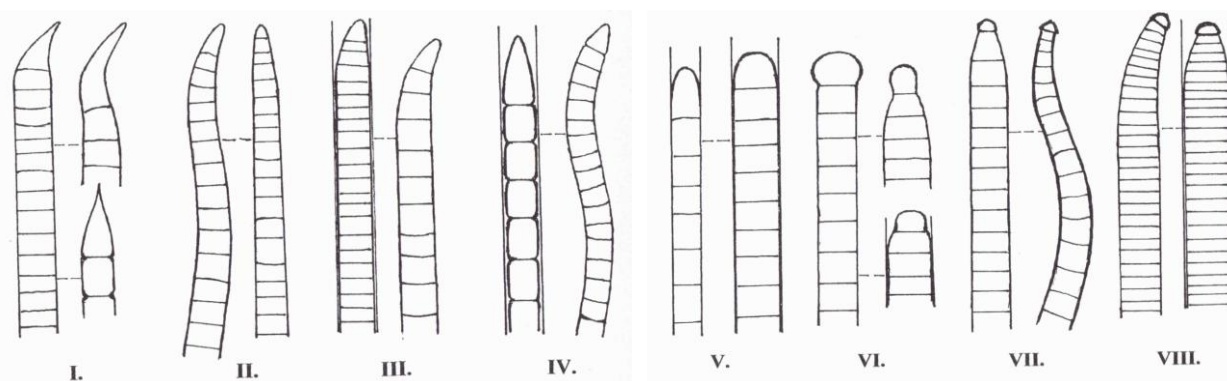
### ***Phormidium***

Je sinice patřící do řádu Oscillatoriales. Vlákna nerozvětvená, rovná nebo zakřivená, zřídka samostatná, bez heterocytů a akinet, po dobu vegetačního růstu nebo za určitých podmínek tvoří pochvy. Buňky cylindrické, více či méně izodiametrické. Obsah buněk modro-zelený, zřídka nahnědlý či nafialovělý. Buněčné příčné dělení kolmo k podélné ose trichomu, dceřiné buňky dorůstají ± do velikosti mateřské buňky.



Rozmnožují se i pomocí hormogonií, rozpadem trichomů nebo často pomocí nekrotických buněk (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005).

*Phormidium* zahrnuje mnoho morfotypů s množstvím přechodných stavů. Pro snadnější identifikaci je rod členěn do 8 skupin (obr. 3; Tab. 1), které jsou rozeznatelné především díky morfologii apikálního konce trichomu (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005).



Obr. 3 - Členění rodu *Phormidium* (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005)

Tabulka 1: Rozdělení sinic rodu *Phormidium* dle morfologie (KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS, 2005)

skupina	trichom	apikální buňky	kalyptra	tlustá buněčná stěna
I.	postupné či krátké zúžení	ostře špičaté, někdy zakřivené	-	-
II.	postupné zužování celého trichomu	zakulacené	-	-
III.	krátké zúžení, časté ohnutí	konicky zúžené nebo cylindrické a zakulacené	-	+
IV.	cylindricky zakončený	konické	-	-
V.	cylindrický po celé délce	široce zakulacené nebo tupé	-	-/+
VI.	na konci krátce zúžený	sférické	+	-
VII.	pozvolné zužování na konci		+	-
VIII.	cylindrický	buňky vždy kratší než širší	+	+

KOMÁREK and ANAGNOSTIDIS (1999) usoudili, že mnoho rodů není kosmopolitních, ale že mají úzce definovaný rozsah rozšíření, což potvrdila i studie *Phormidium retzii*, kterou provedl CASAMATTA *et al.* (2003). STRUNECKÝ *et al.* (2010) při srovnávání fylogenetických vztahů mezi sinicemi rodu *Phormidium* z jižních a ze severních polárních regionů zjistil, že větší genetická shoda je u geograficky příbuznějších než u morfologicky podobnějších. Z rodu *Phormidium* byl na základě molekulárních studií vyčleněn samostatný rod *Phormidesmis*, který se ukázal být příbuznější *Pseudanabaenacea* (KOMÁREK *et al.*, 2009).

## ***Nodularia***

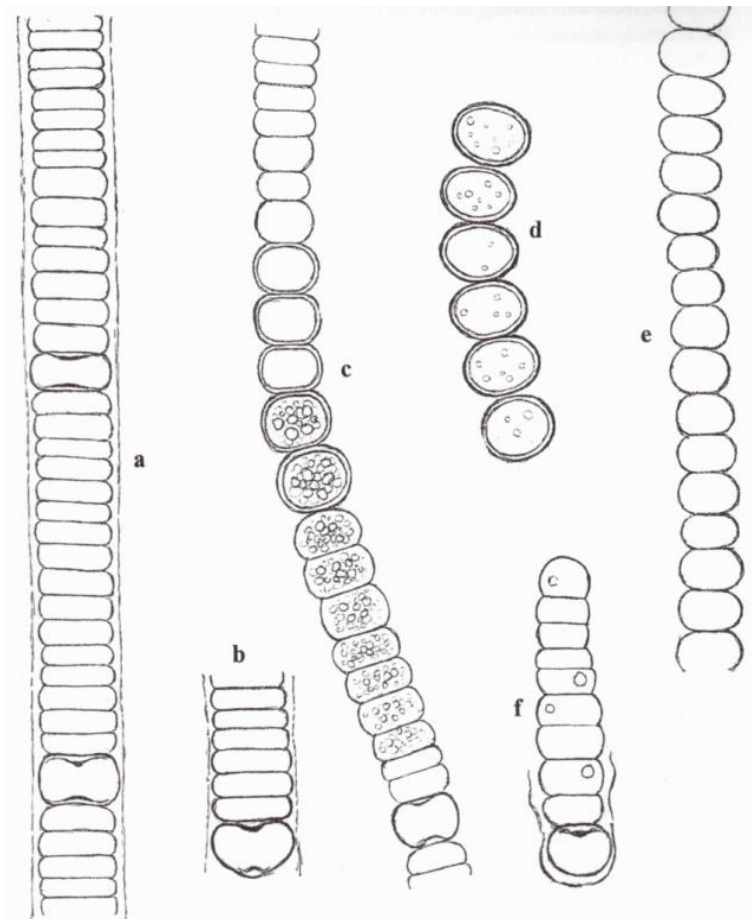
Tuto sinici řadíme do řádu Nostocales. Vlákna samostatná nebo ve shlucích, nevětvená, více či méně přímá, zakřivená, stočená nebo nepravidelně spirálovitě stočená. Buňky oválné, jejich délka nikdy přesahuje šířku, s (planktonní druhy) nebo bez (bentické druhy) aerotopů. Obsah buněk nažloutlý, bledě olivově-zelený nebo modro-zelený. Trichomy s více heterocyty téměř pravidelně vzdálenými od sebe. Akinety oválné či kulovité. Rozmnožování pomocí hormogonií, akinet nebo rozpadem trichomů (KOMÁREK, 1993).

Rod *Nodularia* posuzujeme na základě morfologie buněk vegetativních, akinet a heterocytů (obr. 4), na jejich schopnosti tvořit aerotopy, na produkci toxinu nodularinu a také podle parametrů ultrastrukturálních znaků a z hlediska ekologických charakteristik. Rozdělit jej můžeme do dvou základních skupin (Tab. 2). Na planktonní druhy s aerotopy a na bentické druhy bez aerotopů (KOMÁREK *et al.*, 1993).

**Tabulka 2: Rozdělení sinic rodu *Nodularia* dle morfologické charakteristiky (HINDÁK *et al.*, 2003)**

	<b>morfotyp</b>	<b>velikost buněk (µm)</b>
<b>planktonní (s aerotopy)</b>	<i>spumigena</i>	2 - 4 x 6.8 - 12
	<i>litorea</i>	2 - 4 x 10 - 16
	<i>baltica</i>	1.8 - 4.8 x 4.8 - 7.2
	<i>crassa</i>	1.6 - 5 x 16 - 21
<b>bentické (bez aerotopů)</b>	<i>harveyana</i>	1.5 - 2.5 x 4 - 5
	<i>turicensis</i>	2 - 2.8 x 5 - 6.5
	<i>sphaerocarpa</i>	3.4 - 6 x 5 - 7
	<i>willei</i>	3.8 - 4.5 x 8 - 9.2
	<i>moravica</i>	2 - 4 x 8.5 - 15

Fylogenetické analýzy několika různých genů rodu *Nodularia* se shodují s morfologickými studiemi. Rozdělují rod na dvě skupiny. Planktonní druhy, které se vyznačují svou toxicitou, produkcí nodularinu a tvorbou aerotopů. A bentické druhy, jež nevykazují toxicitu a aerotopy nevytváří. Studia znesnadňuje fakt, že laboratorní kmeny ztrácí schopnost produkovat aerotopy a i další znaky typické pro přírodní kmeny (LEHTIMÄKI *et al.*, 2000; LYRA *et al.*, 2005).



**Obr. 4 - Morfologie rodu *Nodularia* (HINDÁK *et al.*, 2003)**

**a** - část trichomu s heterocyty; **b** - část trichomu s terminálním heterocytem; **c** - část trichomu s akinetami a heterocytem; **d** - **e** - dorůstající řetězce z akinet; **f** - pučící akinety s basálním heterocytem

### **3.3 MOLEKULÁRNÍ STUDIE SINIC**

Aplikace molekulární biologie, bioinformatiky a genomiky do světa mikrobiologie znamenala revoluci v pohledu na studium spletnosti a rozmanitosti mikroorganismů. Krok po kroku s pomocí těchto disciplín provádíme mapování diversity, identifikaci populací, sekvencování DNA a odkrýváme funkce jednotlivých genů. Ukazuje se, že současný taxonomický systém je často fylogeneticky nesprávný. Mnohé sinice skrývají svou genetickou diversitu za morfologickou jednoduchostí a jednotlivé taxonomické jednotky tak vznikají i zanikají. Vstupujeme do éry expanze polyfázního výzkumu, který kombinuje molekulární, bioinformatické, fyziologické, ekologické a geografické techniky ke studiu přírodních populací (GARCIA-PICHEL, 2008).

### 3.3.1 Izolace DNA u sinic

Zatímco se izolace DNA stává pro řadu organismů rutinou, u sinic se z mnoha hledisek musí obecné protokoly (KOWALCHUK *et al.*, 2004; OSBORN and SMITH, 2005) modifikovat podle konkrétního kmene a naleziště. Sinice jsou totiž bohaté na polysacharidy, polyfenoly a další látky, které často interferují s použitými extrakčními činidly a enzymy. U bentických sinic se exopolysacharidy vysráží pomocí chemických aditiv přidaných do extrakčního pufru (NÜBEL *et al.*, 1999). Řada druhů je obklopena silnou extracelulární pochvou, jejíž desintegrace vyžaduje dodatečný fyzický treatment (GARCIA PICHEL *et al.*, 2001). Pozornost je věnována i hospodářsky využitelným druhům, např. optimalizace izolace DNA u rodu *Arthrospira* byla publikována nedávno (MORIN *et al.*, 2010). I nadále se protokoly budou zdokonalovat s cílem získat maximální a kvalitní výtěžek DNA.

### 3.3.2 PCR

S rozvojem PCR se vyřešil problém zisku malého množství nukleových kyselin, jenž by se uplatnil v dalším genetickém testování. Princip reakce spočívá ve vytvoření mnoha kopií templátové DNA *in vitro* pomocí termostabilní DNA polymerázy, primerů a oligonukleotidů za soustavného střídání teplot při jednotlivých krocích - denaturaci, annelingu a extenzi. Tato metoda je dosud jednou z nejpoužívanějších v molekulárním výzkumu a podléhá neustálým modifikacím, inovacím a její aplikace se rozšiřují.

Ke zvýšení přesnosti a citlivosti stanovení se využívá nested PCR (FARNELID *et al.*, 2009). Zahrnuje dvě po sobě následující amplifikační reakce. Templátem první reakce je DNA izolovaná z testovaného vzorku, templátem druhé reakce je produkt reakce první.

V některých případech lze získat požadované výsledky analýzou RNA. Za tímto účelem byla vytvořena PCR spojená s reverzní transkripcí RT-PCR, při níž je pomocí reverzní transkriptázy přepisována templátová mRNA do cDNA, která je poté podrobena PCR. Slouží především ke studiu genové exprese (STEUNOU *et al.*, 2006).

Existuje samozřejmě řada dalších alternativ jako je Real-Time PCR (Q-PCR). Namísto vyizolované DNA se dá použít pro amplifikaci i jednotlivé vlákno či samostatná buňka – single cell PCR (BOYER *et al.*, 2002). Následný rozvoj molekulárních technik byl pravděpodobně nejvíce signifikantní pro dnešní molekulární ekology a má nepostradatelný význam v ucelené studii mikroorganismů.

### 3.3.3 Molekulární markery sinic

Molekulární markery využívá většina technik k výzkumu ekologických a evolučních otázek, aplikovatelných na jedince, populace a společenství (CARVALHO, 1988).

Velká škála genetických markerů nachází uplatnění i při studiu sinic. Existuje několik variant pro jejich výběr. Jednou z nich je najít pro sinice universální geny. Charakteristický je gen kódující fykocyaninový operon (ARZATE-CARDENAS *et al.*, 2010), dalším méně specifickým příkladem je gen *psbA*, kódující protein D1 fotosystému II (ZEIDNER and BÉJA, 2004).

Druhou a zároveň nejběžnější možností je použít zcela universální gen a navrhnout pro sinice specifické PCR primery. V databázích lze najít odlišné sekvence primerů pro různé skupiny organismů, které bezpochyby nejčastěji využívají 16S rRNA a RNA polymerázové geny jako genetické markery. Sada primerů navržená NÜBELEM (1997) pro V3 a V4 regiony 16S rRNA se dá s malými modifikacemi aplikovat na většinu technik. Tyto primery jsou schopné amplifikovat i plastidovou DNA. Nové primerové kombinace byly navrženy i nedávno (DRUGA *et al.*, 2010). Gen kódující gama podjednotku RNA polymerázy (*rpoC1*) lze také využít jako molekulární marker s využitím primerů upravených pro sinice (PALENIK, 1994).

Některé markery nejsou specifické pro sinice, ale nabývají důležitosti, neboť sinice mají velký vliv na životní prostředí jako primární producenti a fixatoři vzdušného dusíku. To je případ zejména nitrogenásového genu *nifH* (SEVERIN *et al.*, 2010).

### 3.3.4 Molekulární metody

**DGGE** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) je metoda, která umožňuje detekovat polymorfismus v malých (200 - 700 bp) genomických restričních fragmentech. Je citlivá na použití, jak rozštěpané izolované DNA, tak i na amplifikované fragmenty generované PCR. Ty jsou dále separovány v polyakrylamidovém gelu na základě odlišné sekvence (DE BRUIN *et al.*, 2003). Například KAARDINAAL *et al.* (2007) studovali rRNA ITS region pomocí DDGE k posouzení genotypických odlišností u *Microcystis* v závislosti na koncentraci mikrocystinů ve vodě.

**T-RFLP** (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) je variantou RFLP, při níž jsou PCR produkty během amplifikace fluorescenčně značeny. Poté probíhá jejich fragmentace restričními enzymy a analýza na automatickém DNA sekvenátoru (KUMARI *et al.*, 2009). Tato metoda byla úspěšně použita i pro planktonní sinice (KIM *et al.*, 2004).

**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů)

Technika AFLP byla vyvinuta holandskou firmou Keygene v roce 1993 a je také touto společností patentově chráněna (Vos *et al.* 1995). Jedná se o restriční analýzu na bázi DNA fingerprintingu, která jedinečně spojuje RFLP a PCR.

AFLP technologie umožňuje analyzovat celkovou genomickou DNA organismů bez předchozí znalosti konkrétní DNA sekvence. Metoda vyniká vysokou mírou opakovatelnosti, má však i mnoho dalších výhod. Dá se zautomatizovat, výsledky jsou dobře reprodukovatelné a spolehlivé. Získané bandy mohou být izolovány, klonovány a sekvenovány. Při použití různých kombinací primerů získáme unikátní sekvence amplifikovaných fragmentů (WEISING *et al.* 2005).

Nevýhodou AFLP je však poměrně vysoká cena, časová náročnost i požadavky na kvalitu DNA a přesné reakční podmínky při restrikci i PCR. Metoda poskytuje také velké množství polymorfních markerů vykazujících kodominanci.

Díky možnosti detekovat variabilitu na nízkých úrovních lze AFLP použít pro studium procesů v populacích, klonů, kultivarů, odlišení blízkých taxonů, při fyto geografických a fylogenetických studiích, k analýze rodičovství apod. (SAVELKOUL *et al.*, 1999; MEUDT and CLARKE, 2007).

Metoda AFLP probíhá ve čtyřech krocích (obr. 5). Při prvním kroku, restrikci, je DNA řetězec štěpen dvěma restričními endonukleázami ve specifických sekvencích tzv. s přesahem, tj. na koncích fragmentů vznikají jednovláknové přesahy několika bází. Používají se restriktázy EcoRI (šestibázový palindrom) a MseI (čtyřbázový palindrom).

V druhém kroku, ligaci, dochází ke komplementárnímu napojení tzv. adaptorů na restriční místa. Adaptory jsou krátké, syntetické úseky DNA o známé sekvenci, které se váží na konce fragmentů vytvořených příslušnou restriční endonukleázou. Spojení adaptorů a konců restričních fragmentů zajišťuje enzym T4 DNA ligasa.

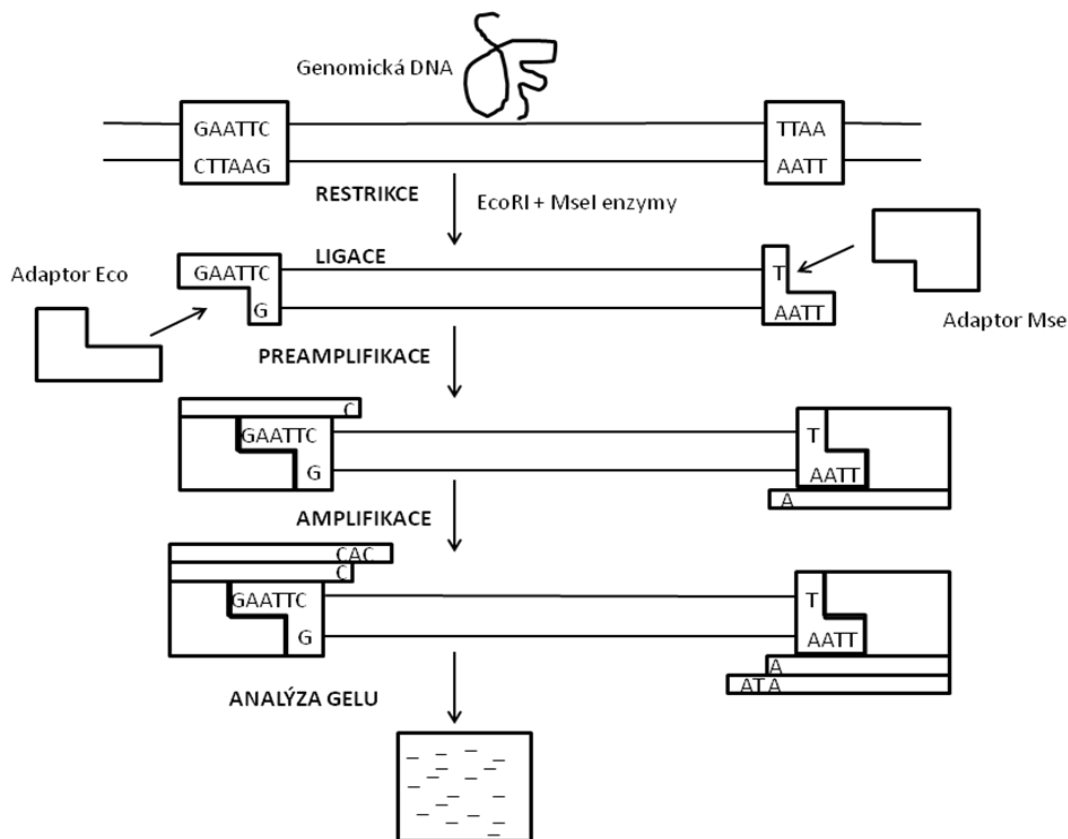
Následuje preselektivní amplifikace, klasická PCR reakce s dvojicí primerů, které mají sekvenci komplementární k sekvenci adaptorů a obsahují jednu selektivní bázi navíc (C pro MseI a A pro EcoRI). Tato selektivní báze způsobí, že vznikne pouze 1/16 restričních fragmentů.

Preselektované fragmenty vstupují do poslední fáze AFLP, selektivní amplifikace, kde jsou použity stejné primery jako u první PCR, ale navíc prodloužené o tři selektivní báze (C + dvě náhodně zvolené báze pro MseI a A + dvě náhodně

zvolené báze pro EcoRI). Tím je počet fragmentů znovu zredukován (HERBSTOVÁ, 2008).

Vyhodnocení lze provést na agaróze, polyakrylamidu, nebo automaticky na sekvenátoru. Výkonnost můžeme mnohonásobně zvýšit, pokud použijeme multi-color fluorescenční systém.

Tato metodika nachází své uplatnění i v algologii. Například byla využita při studiu sinice *Nostoc commune* z Antarktidy (NOVIS and SMISSEN, 2006) či při zkoumání genetické diversity *Microcystis aeruginosa* (OBERHOLSTER *et al.*, 2005).



**Obr. 5 - Schéma průběhu AFLP**

### 3.4 FYLOGENEZE A EVOLUCE SINIC

Tradiční systematické metody, založené na morfologických rysech sinic, nám nic nevyprávějí o evoluci. Nástup sekvenování DNA a srovnávací genomiky umožňuje identifikovat odlišnosti mezi jednotlivými druhy a identifikovat ty rozdíly, které byly během vývoje pro daný druh klíčové. Jsme schopni nejenom zrekonstruovat evoluci celého kmene, ale i vysvětlit jejich genotypickou a metabolickou diversitu, i přestože je jasné, že genetické události jako je horizontální transfer, duplikace genů či genová konverze jsou důležitými evolučními mechanismy (SWINGLEY *et al.*, 2008).

### 3.4.1 Sekvenování

Prvním krokem pro hlubší pochopení evolučních, morfologických a fyziologických charakteristik, kterých každý organismus dosáhl, je poznat sekvence všech genů a jejich expresi v čase (DE BRUIN *et al.*, 2003). Celý genom některých sinic byl již osekvenován. A právě jeho relativně malá velikost dělá ze sinic ideální objekty ke zkoumání evolučních a ekologických otázek. Např. bylo zjištěno, že velikost genomu *Synechocystis* PCC6803 je asi 3,8 mB a představuje 3260 genů. Navíc je tento druh schopen fotosyntézy, jakou známe u vyšších rostlin a je proto vhodným modelovým organismem ke studiu genetiky fotosyntézy (IKEUCHI and TABATA, 2001).

Výhoda sekvenování DNA tkví tedy v tom, že získáme informaci o nejzákladnější struktuře genetického materiálu a relativně lehce i o na této úrovni probíhajících evolučních procesech, které jsme schopni následně začlenit do statistických analýz a evoluci poměrně snadno matematicky modelovat (ZIMA *et al.*, 2004).

### 3.4.2 Fylogenetické studie sinic

K rozlišení fylogenetické příbuznosti konkrétních sinic byla a je většinou používána 16S rRNA. U eubakterií je struktura genu 16S rRNA uspořádaná v komplexu 16S rRNA - (tRNA) - 23S rRNA - 5S rRNA. Počet kopií tohoto komplexu je různý. Jedna kopie pro *G. violaceus* PCC 7421, dvě kopie pro *Microcystis aeruginosa* NIES - 843, čtyři kopie pro *Anabaena* sp. PCC 7120. Předpokládá se, že během evoluce docházelo k duplikaci tohoto úseku (NISHIZAWA *et al.*, 2010).

FOX *et al.* (1992) však zjistili, že tento marker není dostačující k odlišení úzce příbuzných druhů, i přes jejich morfologickou variabilitu. Kompenzací této nedostatečné diversity rRNA je příklon mnoha studií k 16S – 23S rRNA ITS regionu (BROWN *et al.*, 2005). Tento úsek je variabilní, jak v délce, tak v sekvenci. Obsahuje informace zodpovědné za antiterminaci a za skládání rRNA a kóduje dva transferové RNA geny pro leucin a alanin. ITS slouží k odlišování velice blízkých druhů. NICHOLS *et al.* (1982) však publikovali, že u některých sinic se v tomto insertu vyskytují mnohonásobné rRNA operony, což může bránit správné interpretaci daných výsledků. Postupně je jejich přítomnost objevenována u mnoha kmenů (BOYER *et al.*, 2001).

Relativně novou metodou, jak přehledně vyjádřit evoluční a fylogenetické vztahy mezi organismy je konstrukce fylogenetických stromů. Pro jejich tvorbu můžeme zvolit znakovou nebo distanční metodu. Znakové metody pracují se znaky nejrůznější povahy – od složených listů až po přítomnost určité aminokyseliny



v konkrétním genu. Distanční metody nakládají s (ne)podobnostmi (vzdálenostmi) jednotlivých sekvencí (CVRČKOVÁ, 2006).

Předpokladem je samozřejmě fakt, že srovnáváme ortologní sekvence a že existuje homologie mezi jednotlivými nukleotidovými místy. Základem všech fylogenetických analýz je také bezesporu přesné seřazení sekvencí, které je závislé na předběžné znalosti studovaných objektů, což umožňuje učinit kvalifikovaná rozhodnutí. (ZIMA *et al.*, 2004).

### **3.4.3 Vzdálenostní metody**

UPGMA metoda nejprve vyhledá taxy, mezi nimiž je nejmenší rozdíl, ty spojí dvěma větvemi a uzlem - hypotetickým předkem. Tento segment kombinuje do klastru na základě délek větví mezi ostatními druhy do té doby, než nalezne jediný výstup. Je založena na předpokladu, že stromy jsou aditivní a všechny taxy jsou stejně vzdálené od kořene. Jedná se čistě o analýzu fenotypu, vůbec nebere v potaz např. rozdílnou délku evoluce. Tomuto problému se naopak vyhýbá poměrně výpočetně náročná metoda minimální evoluce. Její aproximací je metoda Neighbor-joining. Algoritmus vychází z konstrukce hvězdicovitého „nerozlišeného“ stromu., v němž z jediného centrálního uzlu – multifurkace vycházejí větve ke všem uzlům. Algoritmus postupně spojuje dvojice uzlů tak, aby vždy co možná minimalizoval součet délek větví. Tento princip se opakuje, dokud nezůstane strom obsahující pouze bifurkace (HALL, 2001; CVRČKOVÁ, 2006).

### **3.4.4 Znakové metody**

Maximum parsimony je založena na předpokladu, že nejvíce pravděpodobný strom je ten, který vyžaduje nejmenší počet evolučních změn k vysvětlení pozorovaných dat. Základní podmínkou parsimonie je sdílení společných rysů, které taxy zdědily od svého předka. Nesrovnalosti jsou vysvětlovány reverzí, konvergencí nebo paralelismem. Tato vysvětlení shrnujeme pod pojmem homoplasiie. Lépe je však využít metodu maximum likelihood, která maximalizuje pravděpodobnost pozorovat soubory znaků, které odpovídají vloženým datům. Většinou vygeneruje jen jeden strom, ten nejvíce pravděpodobný. Nevýhodou je však časová náročnost analýzy. Recentní variantou maximum likelihood je Bayesiánská analýza, která vybírá fylogenetické stromy vykazující největší pravděpodobnost z vložených dat podle určitého modelu. Vyprodukuje tak více stromů se zhruba stejnou pravděpodobností rozložení dat. Daná data bychom však vždy měli zpracovat více metodami (HALL, 2001).

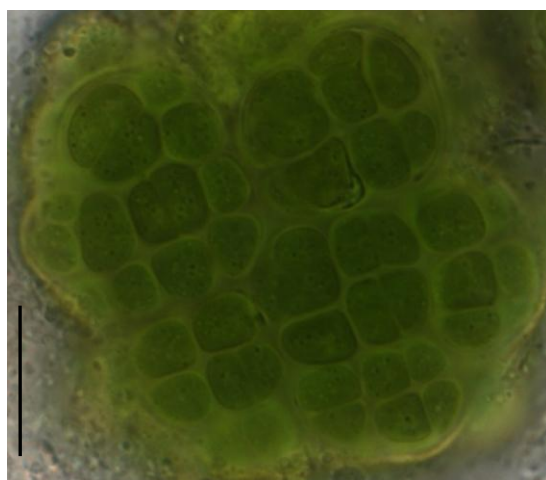
## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

Sinice byly kultivovány při konstatní teplotě 20°C ve fytotronu při světelném režimu světlo/tma 12/12.

**Tabulka 3: Seznam použitých kmenů sinic**

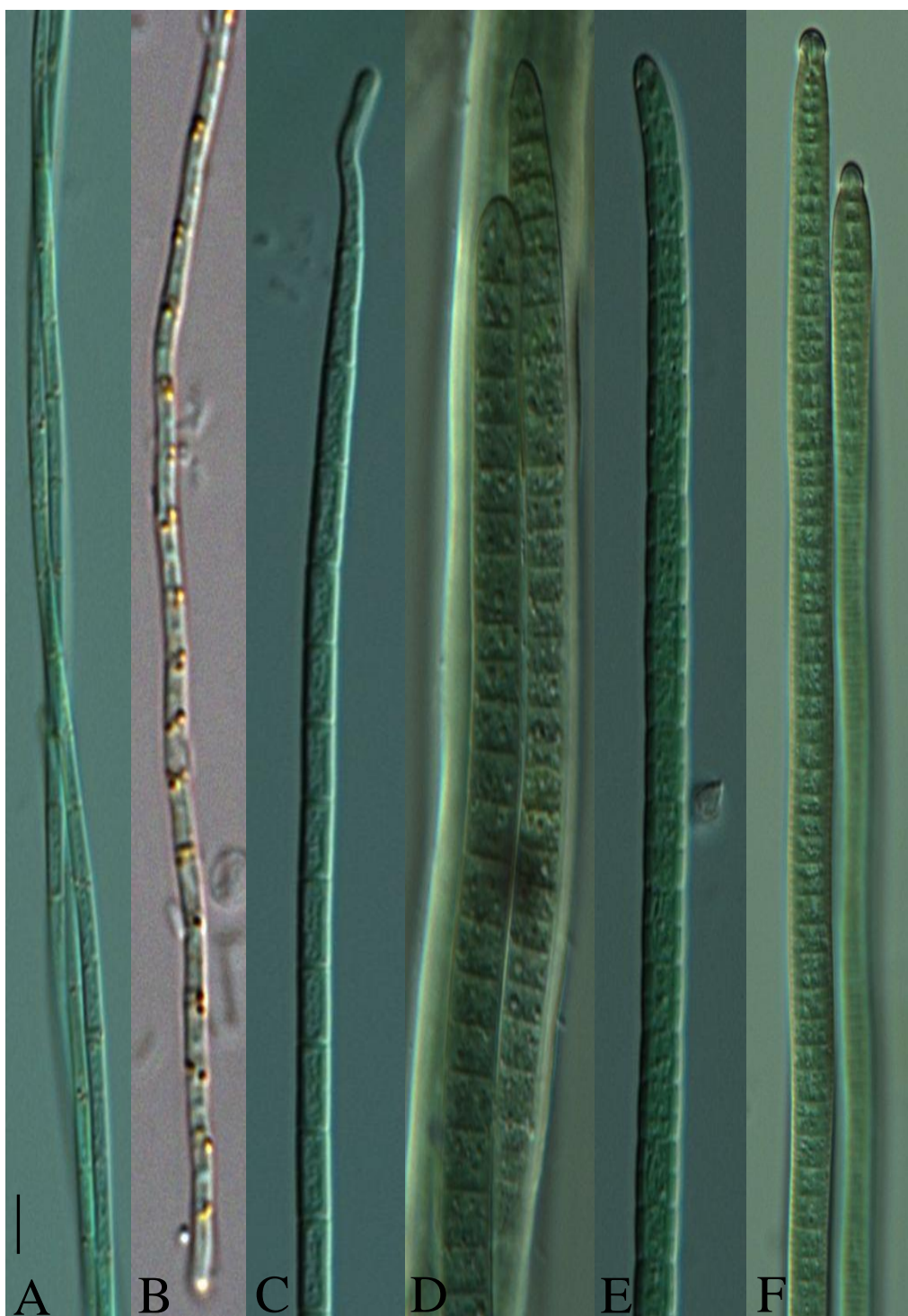
Druh	Kmen
<i>N. harveyana</i>	CCAP 1452/1
<i>N. harveyana</i>	SAG 44.85
<i>N. moravica</i>	Hindák 2000/15
<i>N. sphaerocarpa</i>	Dvořák 2009
<i>N. sphaerocarpa</i>	SAG 50.79
<i>Nodularia</i> sp.,	CCAP 1452/6
<i>G. splendidum</i> 1	Hašler 2007
<i>G. splendidum</i> 2	Hašler 2007
<i>G. pseudoacutissimum</i>	Hašler 2007
<i>G. caroninosum</i>	Hašler 2007
<i>M. vaginatus</i> 1	Hašler 2007
<i>M. vaginatus</i> 4	Hašler 2007
<i>Ph. formosum</i> 1	Hašler 2007
<i>Ph. formosum</i> 2	Hašler 2007
<i>Ph. formosum</i> 3	Hašler 2007
<i>Ph. formosum</i> 4	Hašler 2007
<i>Ph. autumnale</i> 1	Hašler 2007
<i>Ph. autumnale</i> 3	Hašler 2007
<i>A. divina</i>	Hindák 2000
<i>A. divina</i>	Hindák 2000



**Obr. 6 - Fotografie použitých druhů sinic I. - pro reamplifikaci AFLP fragmentů (Foto: HAŠLER) - *Asterocapsa divina*, měřítko 10 μm**



**Obr. 7 - Fotografie použitých druhů sinic II. – kmeny *Nodularia* pro fylogenetické a taxonomické analýzy (Foto: HAŠLER)**  
**A** – *N. sphaerocarpa* (Dvořák 2009), **B** – *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79),  
**C** – *N. harveyana* (SAG 44.85), **D** - *N. harveyana* (CCAP 1452/1),  
**E** – *N. moravica* (Hindák 2000/15), **F**- *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6),  
měřítko 10 μm



**Obr. 8 - Fotografie použitých druhů sinic III. – kmeny z řádu Oscillatoriales pro fylogenetické a taxonomické analýzy (Foto: HAŠLER)**

**A - *Geitlerinema pseudoacutissimum*, B – *Geitlerinema caroninosum*,  
 C – *Geitlerinema splendidum*, D - *Microcoleus vaginatus*,  
 E – *Phormidium formosum*, F- *Phormidium autumnale*, měřítko 10 μm**

## 4.2 *Extrakce DNA*

Pro extrakci DNA byla modifikována metodika DOYLE AND DOYLE (1990)

- 1) 100 mg čerstvého materiálu se naváží do 2ml eppendorfek. Po přidání skleněných kuliček se materiál drtí 5 minut pomocí mlýnku Retsch Mixer Mill 200 při 30 otáčkách za sekundu.
- 2) K rozdrčenému materiálu se v digestoři přidá 700  $\mu$ l roztoku CTAB s merkaptoetanolem (na 1  $\mu$ l 2  $\mu$ l merkaptoetanolu) a zkumavky se inkubují 30 minut při 60°C a 1400 rpm na termomixeru. V prvních minutách inkubace se ke vzorkům přidá PVP.
- 3) Poté se přidá 500  $\mu$ l směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1), zkumavky se převrátí 2-3krát, 5 minut se inkubují při pokojové teplotě a následně se centrifugují 6 minut při 13 400 g.
- 4) Supernatant se opatrně přenese do nových zkumavek a smíchá s 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu. Zkumavky se 2-3krát převrátí a po 30 minut uchovají v -20°C. Následně se centrifugují 15 minut při 13 400 g a 4°C.
- 5) Supernatant se slije do kádinky, pelet se rozpustí v 400  $\mu$ l vychlazeného 96% etanolu a ponechá inkubovat 15 minut na termobloku při 37°C a 1200 rpm.
- 6) Poté se centrifuguje 3 minuty při 13 400 g, supernatant se slije do kádinky a pelet se rozpustí v 200  $\mu$ l vychlazeného 70% etanolu a ponechá 5 minut při pokojové teplotě.
- 7) Dále se opětovně centrifuguje 3 minuty při 13 400 g a supernatant opět slije do kádinky a pelet se nechá vyschnout při 37°C na termobloku do doby než jde pelet oddělit od stěny.
- 8) Vysušený pelet se rozpustí v 200  $\mu$ l TE pufru a ponechá 30 minut na termobloku při 37°C a 600 rpm.
- 9) Následně se vzorek krátce centrifuguje.
- 10) Vyizolovaná DNA se uchová při -20°C a následně v -80°C.

### 4.3 AFLP

Metodika dle KITNER *et al.* (2008).

#### A) Restrikce

##### Pro jeden vzorek

Deionizovaná voda	12,81 µl
EcoRI buffer	2,00 µl
EcoRI enzym	0,07 µl
MseI enzym	0,12 µl
DNA	5,00 µl

---

Celkový objem **20,00 µl**

Směs inkubujeme 2 hodiny 30 minut při 37°C.

#### B) Ligace

##### Pro jeden vzorek

Deionizovaná voda	3,00 µl
Ligase buffer	0,50 µl
EcoRI adapter	0,50 µl
MseI adapter	0,50 µl
Ligase enzym	0,50 µl
DNA po restrikci	5,00 µl

---

Celkový objem **10,00 µl**

Směs inkubujeme 3 hodiny při 37°C.

#### C) Preamplifikace

##### Pro jeden vzorek

Deionizovaná voda	11,85 µl
Buffer	4,50 µl
dNTP	0,50 µl
EcoA primer	0,50 µl
MseI primer	0,50 µl
go Taq polymerase	0,15 µl
Ligase cocktail	2,00 µl

---

Celkový objem **20,00 µl**

**Tabulka 4: Podmínky preamplifikace AFLP**

Aktivace goTaq polymerázy	94°C 3 min
Amplifikace – 20 cyklů	
Denaturace	94°C 30 s
Annealing	56°C 1 min
Extenze	72°C 1:45 min
Konečná extenze	72°C 5 min

## D) Amplifikace

### Pro jeden vzorek

Deionizovaná voda	3,74 µl
Buffer	2,00 µl
dNTP	0,20 µl
EcoA primer	1,00 µl
MseI primer	1,00 µl
go Taq polymerase	0,06 µl
7x ředěný preamplifikát	2,00 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>10,00 µl</b>

**Tabulka 5: Podmínky amplifikace AFLP**

Aktivace goTaq polymerázy	94°C	3:30 min
Amplifikace – 16 cyklů		
Denaturace	94°C	30 s
Annealing	60°C	30 s
Extenze	72°C	1 min
Amplifikace – 1 cyklus		
Denaturace	94°C	30 s
Annealing	56°C	30 s
Extenze	72°C	1 min
Konečná extenze	72°C	1 min

**Tabulka 6: Sekvence používaných primerů metodou AFLP**

Sekvence primeru EcoRI	Sekvence primeru MseI
AGC	CAAC
AGC	CAAT
AGC	CGAT
ACC	CAAC
ACC	CAAT
ACC	CGAT
ACT	CGAC
ACG	CAAC
ACG	CCT
ATC	CGAT
ACA	CGAT

### Zpracování PCR produktů

- 1) Obě skla se důkladně omyjí vodou, velké sklo i saponátem a vydrhnou kartáčkem, poté se opláchnou deionizovanou vodou a osuší papírovým ručníkem.
- 2) Velké sklo se ošetří na ploše, která se bude dotýkat gelu, 3krát deionizovanou vodou a otre se papírovým ručníkem. V digestoři se na něj nanese 1 ml kyseliny



octové a 3  $\mu\text{l}$  silanu a rozetřou se papírovým ručníkem. Sklo se ponechá 5 minut stát. Poté se otře 4krát 96% etanolem a pokaždé osuší papírovým ručníkem.

- 3) Malé sklo se ošetří na ploše, která se bude dotýkat gelu, 96% etanolem a poté přípravkem pro odpuzování vody Rain-X, ten se rozetře papírovým ubrouskem a nechá 5 minut schnout.
- 4) Na ošetřenou plochu do krajů velkého skla se umístí spacersy a na ně se položí menší sklo ošetřenou plochou dolů. V místě spacerů se skla na každé straně sepnou klipsy.
- 5) Gel se připraví smísením 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu, 467  $\mu\text{l}$  10% roztoku peroxidisíranu amonného a 46,7  $\mu\text{l}$  N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu. Roztok se dobře promíchá, nasaje do injekční stříkačky a pomalu se vypouští mezi skla, zároveň se na sklo druhou rukou poklepává, aby se předešlo vzniku bublin v gelu.
- 6) Když je vyplněn celý prostor mezi skly gelem, vsune se mezi skla v místě, kde se plnil tento prostor gelem, hřebínek rovnou stranou asi 1 cm hluboko. V místě hřebínku se skla sepnou klipsy a gel se nechá hodinu polymerizovat.
- 7) Po utužení gelu se odstraní všechny klipsy a skla se důkladně omyjí od všech zbytků polyakrylamidu, osuší papírovým ručníkem a pevně upevní pomocí šroubovacích úchytů do elektroforetické komůrky hranou s hřebínekem nahoru a kratším sklem k hliníkové desce.
- 8) Katodový i anodový prostor se zalije 0,5x TBE pufrem, opatrně se vytáhne hřebínek a vzniklá mezera mezi skly se dobře vyčistí proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor se uzavře, nasadí elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu se jako limitní faktor nastaví hodnota výkonu 75 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 2200 V / 120 mA). Za těchto podmínek se nechá gel předehřát asi 30 minut.
- 9) Pět minut před nanesením vzorků se vzorky vzniklé smísením 1 objemového dílu PCR produktu a 1/2 dílu nanášecího pufru vloží na 4 minuty do termobloku vytemperovaného na 95 °C. Poté se ihned vloží do ledu, aby se zabránilo renaturaci.
- 10) Během denaturace se vypne zdroj stejnosměrného elektrického proudu, otevře katodový prostor a znovu dobře vyčistí proudem pufru z injekční stříkačky



mezera pro hřebínek od zbytků polyakrylamidu. Do této mezery mezi skla se vsune hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu.

- 11) Poté se nanáší po 4  $\mu$ l jednotlivé denaturované vzorky pipetou do mezer mezi zoubky hřebínku. Na všechny vzorky se používají stejné špičky, které se mezi nanášením rozdílných vzorků pročistí nasáváním a vypuštěním pufru z katodového prostoru pipetou. Po napipetování všech vzorků se katodový prostor uzavře a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu se jako limitní faktor nastaví hodnota výkonu 65 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 2200 V / 120 mA).
- 12) Čas separace vzorků závisí na délkách rozdělovaných PCR produktů. Orientačně je možné se řídit pomocí barviv v nanášecím pufru, jimiž jsou bromfenolová a xylenová modř, která ukazují průběh elektroforézy. Obvyklá doba separace vzorků je 1,5 až 2 hodiny.
- 13) Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků se vypne zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojí obě elektrody a pufr se nechá z katodové části přetéct do sběrného prostoru, povolí se šrouby úchytů skel a gel se skly se vyjme a položí do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly se opatrně vytáhne hřebínek i oba spacery a skla se od sebe odpáčí čepelí nože, která je obalená vrstvou izolepy, aby se předešlo odštípnutí skla.
- 14) Větší sklo s přilepeným gelem se gelem nahoru uloží do fotomisky, umístí na třepačku a zalije fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku na gel je přibližně 20 minut a orientačně se stanoví dostatečný čas působení vymytím modrého pruhu xylenové modře z gelu do roztoku.
- 15) Fix/stop roztok se slije zpět do baňky a sklo s gelem se promyje 4krát deionizovanou vodou. Pak následuje pěti minutové promytí gelu na třepačce v 1% roztoku  $\text{HNO}_3$ , vylití tohoto roztoku a promytí gelu 4krát deionizovanou vodou.
- 16) Sklo s gelem se umístí na třepačku do 0,1 % roztoku  $\text{AgNO}_3$ , do kterého se těsně před použitím přidá 1,2 ml formaldehydu a tento roztok se nechá na gel působit alespoň 30 minut.
- 17) Na konci doby barvení se připraví fotomiska s deionizovanou vodou a druhá fotomiska s vychlazenou vývojkou.

- 18) Po 30 minutách se sklo s gelem na 5 vteřin ponoří do misky s deionizovanou vodou, nechá okapat a přemístí do fotomisky s vývojkou na třepačce, kde se sleduje vyvíjení hnědočerných proužků PCR produktů.
- 19) Když jsou proužky dostatečně zřetelné a ještě než začne vystupovat tmavé pozadí, se vyvíjení zbarvení zastaví přilítím fix/stop roztoku uchovaného z kroku 15. Roztok se nechá působit na gel zhruba 2 minuty.
- 20) Sklo s gelem se poté ponoří asi na 2 minuty do deionizované vody a nechá sušit 1 hodinu v sušárně při 60 °C. Po vysušení se sklo popíše a vyhodnotí na negatoskopu.

#### **4.4 Extrakce DNA z AFLP fragmentů**

Byly použity dva postupy pro srovnání

##### **UltraClean™15 DNA Purification Kit (Elisabeth Pharmacon) - modifikováno**

- 1) Ostrým skalpelem se vypreparuje požadovaný band a po determinaci jeho váhy se přidá příslušné množství TE pufru (na 0,1 g gelu 100 µl pufru).
- 2) Směs se ponechá inkubovat 30 minut při 50°C, poté se zcentrifuguje 1 minutu při 11 200 g. Následně se přidá roztok Ultra Salt (na 0,1 g gelu 300 µl roztoku), vzorek se resuspenduje vortexováním až do homogenity.
- 3) Dále se přidá 6 µl roztoku Ultra Bind a za občasného převrácení se vzorek inkubuje 5 minut při pokojové teplotě. Po krátké centrifugaci se supernatant odstraní a pelet se resuspenduje v 1 ml Ultra Wash vortexováním po dobu 10 sekund.
- 4) Poté se vzorek krátce zcentrifuguje, supernatant odstraní a vzorek se opětovně krátce centrifuguje. Špičkou se odstraní veškeré stopy roztoku Ultra Wash.
- 5) Pelet se resuspenduje v 12 µl TE pufru, opatrně propipetuje a inkubuje 5 minut při pokojové teplotě.
- 6) Následně se vzorek centrifuguje 1 minutu na 11 200 g a supernatant se přenese do nové zkumavky. Tím je získána genomická DNA, která se použije pro PCR.

##### **D-TUBE™Dialyzers: Mini, midi, maxi, and D-TUBE 96™ (Novagen)**

- 1) D-Tube dialyzer se naplní deionizovanou vodou až po okraj. Po 5 minutách se voda odstraní a napipetuje se 250 µl 0,5x TBE pufru. Do takto připravených tub se vkládají ostrým skalpelem vyřezané požadované bandy.

- 2) Tuba se vloží do přiloženého stojánku a ten do elektroforetické komůrky s 0,5x TBE pufrem tak, aby byly membrány tub kolmo k rovině postupu elektrického proudu. Po zapojení elektrod se nastaví napětí 100 V na dobu 30 minut.
- 3) Poté se vzorky na 2 minuty vystaví reverzní polaritě.
- 4) Obsah D-tuby se propipetuje a přenesení do nové eppendorf. Následně se centrifuguje 1 minutu při maximální rychlosti. Supernatant se přenesení do nové zkumavky a tím je získána genomická DNA, která se použije pro PCR.

Po izolaci genomické DNA z fragmentu se provede PCR se stejnými primerovými kombinacemi, které byly použity při amplifikaci AFLP (Tab. 5). Tyto PCR produkty jsou dále **přečištěny pomocí GenElute PCR Clean-UP Kit (SIGMA)**. A následně je změřena jejich koncentrace pomocí nanodropu ND 1000.

Po následném nanesení na 1,8% agarózový gel jsou bandy slabě detekovatelné. Proto se přistoupí k zaklonování fragmentů DNA do bakterií.

**Zaklonování** bylo provedeno podle protokolu **pGEM<sup>®</sup> -T and pGEM<sup>®</sup> -T easy vectors (Promega)**

- 1) Nejprve se provede ligační reakce. Napipetuje se příslušný mix (viz níže), který necháme hodinu inkubovat při pokojové teplotě.

#### **Pro jeden vzorek**

2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl
pGEM-T Vector (50ng)	1 µl
PCR product (dle koncentrace na 25ng)	x µl
T4 DNA Ligase	1 µl
<hr/>	
Nuclease free water to final volume	<b>10 µl</b>

- 2) Mezitím se připraví misky s LB médiem a ampicilinem, na které se ve sterilním boxu rozetře 40 µl XGAL a 4 µl IPTG
- 3) Ligační směs se krátce zcentrifuguje, propipetuje a 2 µl se přenesou do 1,5ml mikrozkuavky a přidá se 50 µl kompetentních buněk. Směs se lehce promíchá a ponechá 20 minut inkubovat na ledu.
- 4) Poté se mikrozkuavka přenesení na 45 sekund do 42°C teplé vodní lázně a ihned se vloží do ledu.
- 5) Ve sterilním boxu se ke směsi přidá 950 µl SOC média, propipetuje se a nechá inkubovat v termostatu na třepače při 37°C 1,5 hodiny.

- 6) Nakonec se 150  $\mu\text{l}$  této směsi napipetuje na připravené Petriho misky s LB médiem a vše se nechá inkubovat přes noc.
- 7) Druhý den se hodnotí úspěšnost transformace – modro-bílá selekce.
- 8) Úspěšně natransformované kolonie se druhý den přenesou do 2 ml tekutého LB média s ampicilinem a ponechají se v termostatu na třepačce při 37°C.
- 9) Asi po 4 hodinách jsou dostatečně narostlé k izolaci vektorů.

Izolace vektorů byla provedena podle protokolu **QuickLyse Miniprep Kitu (QIAGEN)**. Z izolovaných vektorů byla provedena PCR se stejnými primery.

#### Pro jeden vzorek

Deionizovaná voda	12,3 $\mu\text{l}$
Buffer 5x	5,0 $\mu\text{l}$
dNTP 2 mmol	2,5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	1,0 $\mu\text{l}$
M13 Forward Primer	1,0 $\mu\text{l}$
M13 Reverse Primer	1,0 $\mu\text{l}$
go Taq polymerase	0,2 $\mu\text{l}$
BSA	1,0 $\mu\text{l}$
DNA	1,0 $\mu\text{l}$
<b>Celkový objem</b>	<b>25,0 <math>\mu\text{l}</math></b>

**Tabulka 7: Reakční podmínky PCR**

Aktivace goTaq polymerázy	94°C	4 min
Amplifikace – 35 cyklů		
Denaturace	94°C	2 min
Annealing	56°C	1 min
Extenze	72°C	1 min
Konečná extenze	72°C	4 min

#### 4.5 16S rRNA

Pro amplifikaci byl použit FastStart PCR Master Kit (Roche Applied Science)

#### Pro jeden vzorek

Master mix, 2x	5 $\mu\text{l}$
Forward primer 3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$
Reverse primer 3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$
Deionizovaná voda	2 $\mu\text{l}$
DNA	1 $\mu\text{l}$
<b>Celkový objem</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

**Tabulka 8: Reakční podmínky PCR**

Aktivace goTaq polymerázy	95°C	4 min
Amplifikace – 30 cyklů		
Denaturace	95°C	30 s
Annealing	50°C	30 s
Extenze	72°C	45 s
Konečná extenze	72°C	7 min

#### 4.6 Single cell PCR

Pro amplifikaci byl použit FastStart PCR Master Kit (Roche Applied Science).

Metodika byla modifikována podle BOYER *et al.* (2002).

- 1) Do PCR zkumavky se napipetuje 9  $\mu$ l deionizované vody a vloží se jedno vlákno sinice.
- 2) Zkumavka se zalije tekutým dusíkem a po roztátí se intenzivně vortexuje, tento krok opakujeme 3krát.
- 3) Připraví se reakční směs a probíhá PCR.

##### Pro jeden vzorek

Deionizovaná voda	9,0 $\mu$ l
Forward primer 3 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
Reverse primer 3 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
PCR fast master mix	10,0 $\mu$ l
Vlákno	
<b>Celkový objem</b>	<b>20,0 <math>\mu</math>l</b>

**Tabulka 9: Reakční podmínky PCR**

Aktivace Taq polymerázy	95°C	4 min
Denaturace	95°C	45 s
Annealing	57°C	45 s
Extenze	72°C	2:15 hod
Konečná extenze	72°C	5 min

**Tabulka 10: Sekvence používaných primerů pro 16S rRNA (převzato od NÜBEL *et al.* (1997))**

Název primeru	Sekvence primeru
CYA106F	CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A
CYA359F	GGG GAA TTT TCC GCA ATG GG
CYA781R (a)	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T
CYA781R (b)	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T

**Tabulka 11: Sekvence používaných primerů pro single cell PCR (převzato od NÜBEL *et al.* (1997); BOYER *et al.* (2002))**

Název primeru	Sekvence primeru
Reverse primer	GGG GAA TTT TCC GCA ATG GG
Forward primer	CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC

#### **4.7 Tvorba fylogenetických stromů**

AFLP fragmenty byly hodnoceny vizuálně. Na základě získaných dat (1 = přítomnost, 0 = nepřítomnost bandu) byla v programu MS Excell vytvořena binární matice, jež byla dále použita pro statistické vyhodnocení pomocí programu FreeTree (PAVLÍČEK *et al.*, 1999; metoda UPGMA a NJ, Jaccard similarity coefficient) a konstrukci dendrogramu v programu TreeView (PAGE, 1996). Pro ověření správnosti dendrogramu byla provedena bootstrap analýza (FELSENSTEIN, 1985) pomocí programu FreeTree (1000 replikací).

PCR produkty získané z oblasti 16S rRNA genu byly osekvenovány. Sekvence byly upraveny a poskládány v programu BioEdit (HALL, 1999). Ze získaných dat byl vytvořen programem Clustal W (LARKIN *et al.*, 2007) multiple sequenced alignment. Ten byl dále pomocí programu PAUP\* (SWOFFORD, 2001) zpracován metodou Neighbour-joining a UPGMA.

#### 4.8 Použité chemikálie

- Agaróza, Serva, USA
- Akrylamid, Merck, Germany
- Ampicilin, Sigma, Germany
- Bromfenolová modř, Serva, USA
- $\beta$ -merkaptoetanol, Sigma, Germany
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (10 mmol/l každý, 200  $\mu$ l), C1141, Promega, USA
- Dusičnan stříbrný, Lach:ner, Neratovice
- Ethanol 96% roztok, Lach:ner, Neratovice
- Etidium Bromid, Carl Roth, Germany
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA, Sigma, Germany
- Formaldehyd, Lach:ner, Neratovice
- Formamid, Sigma, Germany
- *go Taq* polymeráza (5U/ $\mu$ l), M3171, Promega, USA
- Hydroxid sodný, Lach:ner, Neratovice
- Chlorid sodný, Lach:ner, Neratovice
- Chloroform, Lach:ner, Neratovice
- IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), Sigma, Germany
- Isoamylalkohol, Lach:ner, Neratovice
- Isopropanol, Lach:ner, Neratovice
- Kyselina boritá, Sigma, Germany
- Kyselina dusičná, Lach:ner, Neratovice
- Kyselina octová, Lach:ner, Neratovice
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan, Serva, USA
- Močovina, Lach:ner, Neratovice
- N,N' – methylenbisakrylamid, Sigma, Germany
- N,N,N',N' - tetrametyetylendiamin (TEMED), Merck, Germany
- Peroxodisíran amonný, Merck, Germany
- PVP, Sigma, Germany
- Rain-X Repellent, Turtle Wax, USA
- Tekutý dusík
- Thiosíran sodný, Lachema, CZ
- Trishydroxymethylaminomethan – Tris, Sigma, Germany
- Uhličitan sodný, Lach:ner, Neratovice
- X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranoside), Roche, Switzerland
- Xylenová modř, AppliChem, Germany
- 6x orange Loading dye, Fermentas, Canada
- 100 bp ladder, GeneRuler<sup>TM</sup>, Fermentas, Canada

## 4.9 Použité roztoky

### CTAB

- 4 g CTAB
- 20 ml TRIS
- 8 ml EDTA
- 16,36 g NaCl
- 400  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu
- do 200 ml doplnit deionizovanou vodou
- filtrovat přes 0,22 $\mu$ m MILEX GV filter unit s PVDF membránou

### Dusičnan stříbrný $\text{AgNO}_3$ – 0,1% roztok

- 2 g  $\text{AgNO}_3$
- doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 2000 ml
- před použitím přidat 3 ml formaldehydu

### EDTA 0,5 mol/l, pH 8

- 9,305 ml EDTA rozpustit ve 40 ml deionizované vody
- upravit pH pomocí NaOH na 8
- doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

### Fix/stop roztok

- 165 ml 98% kyseliny octové
- doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 1500 ml

### Kyseliny dusičná $\text{HNO}_3$ – 1% roztok

- 18 ml 65%  $\text{HNO}_3$
- objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 1200 ml

### LB médium

- 2 g Bacto®-Tryptone
- 1 g Bacto®-Yeast extract
- 1 g NaCl
- upravit pH pomocí NaOH na 7
- přidat 3 g agaru
- autoklávovat
- přidat 2 ml zásobního roztoku ampicilinu 100 ng/10 ml

### Nanášecí pufr pro elektroforézu

- 0,125 g bromfenolové modře
- 0,125 g xylenové modře
- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu

### Peroxodisíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ – 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- rozpustit v 10 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$
- uchovávat v mikrozkušavkách po 400  $\mu$ l v  $-20^\circ\text{C}$



**Polyakrylamidový 6% gel:**

- 70 ml zásobního roztoku akrylamidu
- 467  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- 46,7  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu

**SOC médium**

- 2 g Bacto®-Tryptone
- 0,5 g Bacto®-Yeast extract
- 1 ml 1 mol/l NaCl
- 0,25 ml 1 mol/l KCl
- rozpustit v 97 ml deionizované vody a autoklávovat
- po vychladnutí přidat 1 ml 2 mol/l  $\text{Mg}^{2+}$  (20,33 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  a 24,65 g  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  rozpustit ve 100 ml deionizované vody)
- 1 ml 2 mol/l glukózy

**TBE pufr – 10 x zásobní roztok**

- 108 g Tris
- 55 g kyseliny borité  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- 40 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

**TE pufr**

- 2 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 400  $\mu$ l zásobního roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0
- rozpustit ve 100 ml deionizované vody, poté doplnit na 200 ml

**TRIS 1 mol/l, pH 8**

- 6,055 ml EDTA rozpustit ve 40 ml deionizované vody
- upravit pH pomocí NaOH na 8
- doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

**Vývojka (před požitím vychladit)**

- 45 g uhličitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 1500 ml
- uložit ve 4 °C
- před použitím přidat 2,25 ml formaldehydu a 300  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### **4.10 Použité přístroje**

- Centrifuga 5415D, Eppendorf, Germany
- Cyklér XP, Bioer, China
- Cyklér PTC 200, MJ Research, USA
- Digestor Merci, CZ
- Digitální kamera Kodak Edas 290, Eastman Kodak, USA
- Elektroforetická komůrka HF33, Hoefer, USA
- Hlubokomrazicí box Advantage QLT1385V12, Queue Systems, Columbia
- Chladnička Liebherr, Germany
- Laboratorní váhy PM 2000, Mettler-Toledo, CZ
- Laminární box PV-100, Telstar, Spain
- Magnetická míchačka, Big-squid Ikamag, Ika, Germany
- Mikropipeta 0,5-10 µl (osmikanálová), HTL, Poland
- Mikropipety 0,3-1000 µl, Eppendorf, Germany
- Mikropipety 0,3-1000 µl, ThermoScientific, USA
- Mikrovlnná trouba 3203, ETA, CZ
- Minicentrifuga – MCF 2360, LMS, Germany
- Mlýnek Mixer Mill 200, Retsch, Germany
- Mraznička, Liebherr, Germany
- Nanodrop ND-1000, nanodrop technologies, USA
- Negastop – Ella NHQ1 R, Ella Legros, France
- pH metr 3320, P-LAB, CZ
- Sušárna HS62A, Chirana, CZ
- Termomixér Mixing Block MB-102, JNetDirect Biosciences, USA
- Termostat BT 120, Chirana, CZ
- Transiluminátor UVT 20M, Herolab, Germany
- T-REX, Thermo-Scientific Owl separation System, Rochester, USA
- Třepačka GFL, Helago, CZ
- Vodní lázeň GFL 1003, Helago, CZ
- Vortex – Minishaker, MS2, IKA, Germany
- Výrobek deionizované vody CDP 8800, Aquatec, USA
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact, Castel Mac, Italy
- Zdroj elektrického napětí, Minis 300, Major Science, USA

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 *Fylogenetické studie sinic*

Dva odlišné molekulární postupy byly využity ke studiu fylogenetické příbuznosti šesti kmenů sinic rodu *Nodularia* a dvanácti kmenů epipelických vláknitých sinic z řádu *Oscillatoriales* (šesti kmenů sinic rodu *Phormidium*, dvou kmenů rodu *Microcoleus* a čtyř kmenů rodu *Geitlerinema*) (Tab. 3). Hlavním cílem studie bylo posoudit citlivost a možnosti aplikace zvolených metod v taxonomii sinic.

První ověřenou metodou byla analýza konzervativního molekulárního markeru - 16S rRNA (kapitola 4.5), následná sekvenace PCR produktů a tvorba fylogenetického stromu (kapitola 4.7). Druhou byla technika AFLP (kapitola 4.3), vizuální a statistické hodnocení příbuznosti separovaných produktů a konstrukce fylogenetického stromu (kapitola 4.7).

#### 5.1.1 *Fylogenetická studie sinic rodu Nodularia*

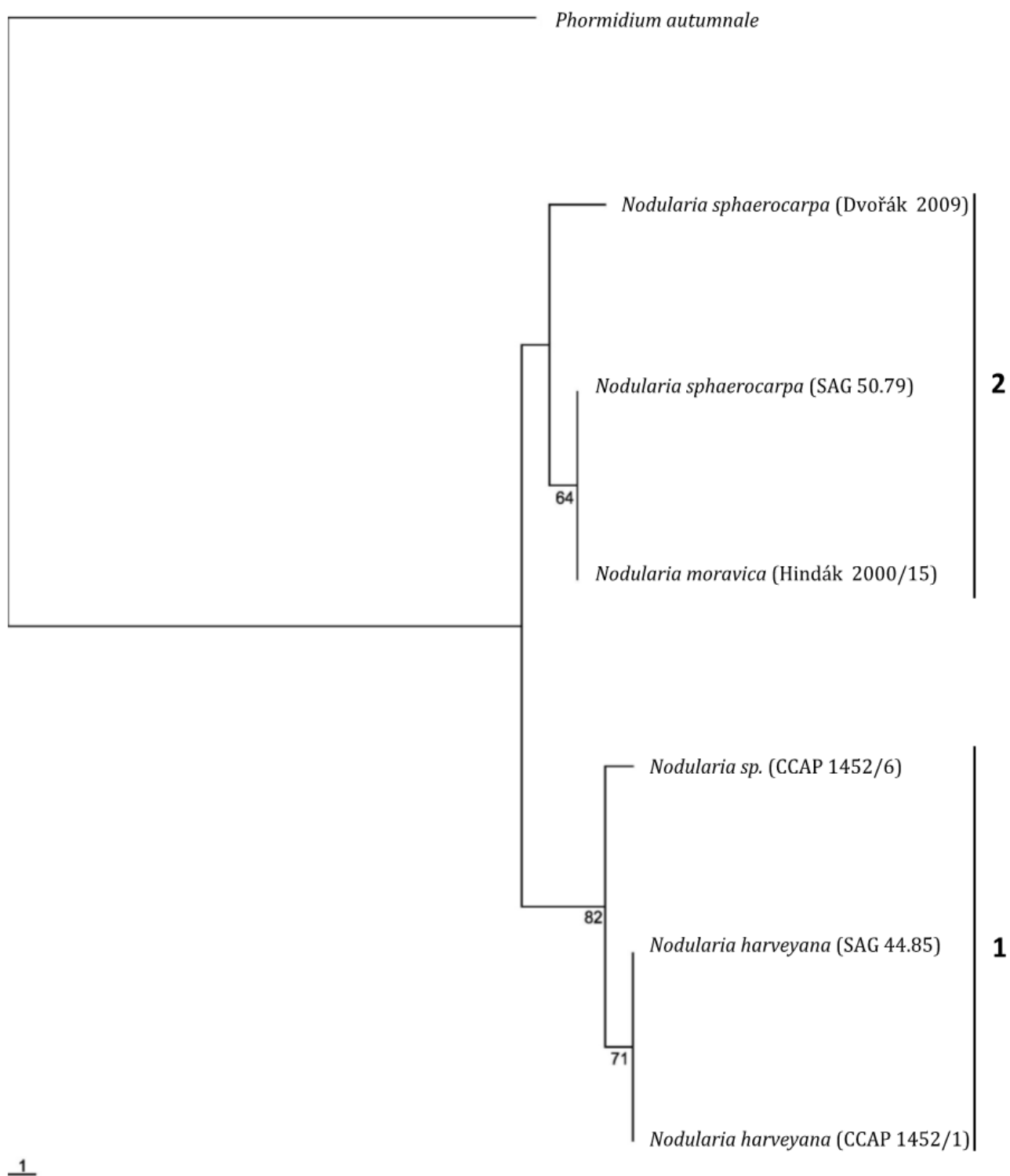
Výsledky získané sekvenací oblasti 16S rRNA genu po vytvoření fylogenetického stromu (obr. 9) rozdělily studované kmeny rodu *Nodularia* zřetelně na dvě hlavní skupiny.

První skupina zahrnuje kmeny ze slaných vod - *N. harveyana* (CCAP1452/1; SAG 44.85) a blíže neurčený kmen *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6). Z bootstrapové analýzy je patrná vzájemná podobnost mezi zkoumanými kmeny v rámci tohoto klastru.

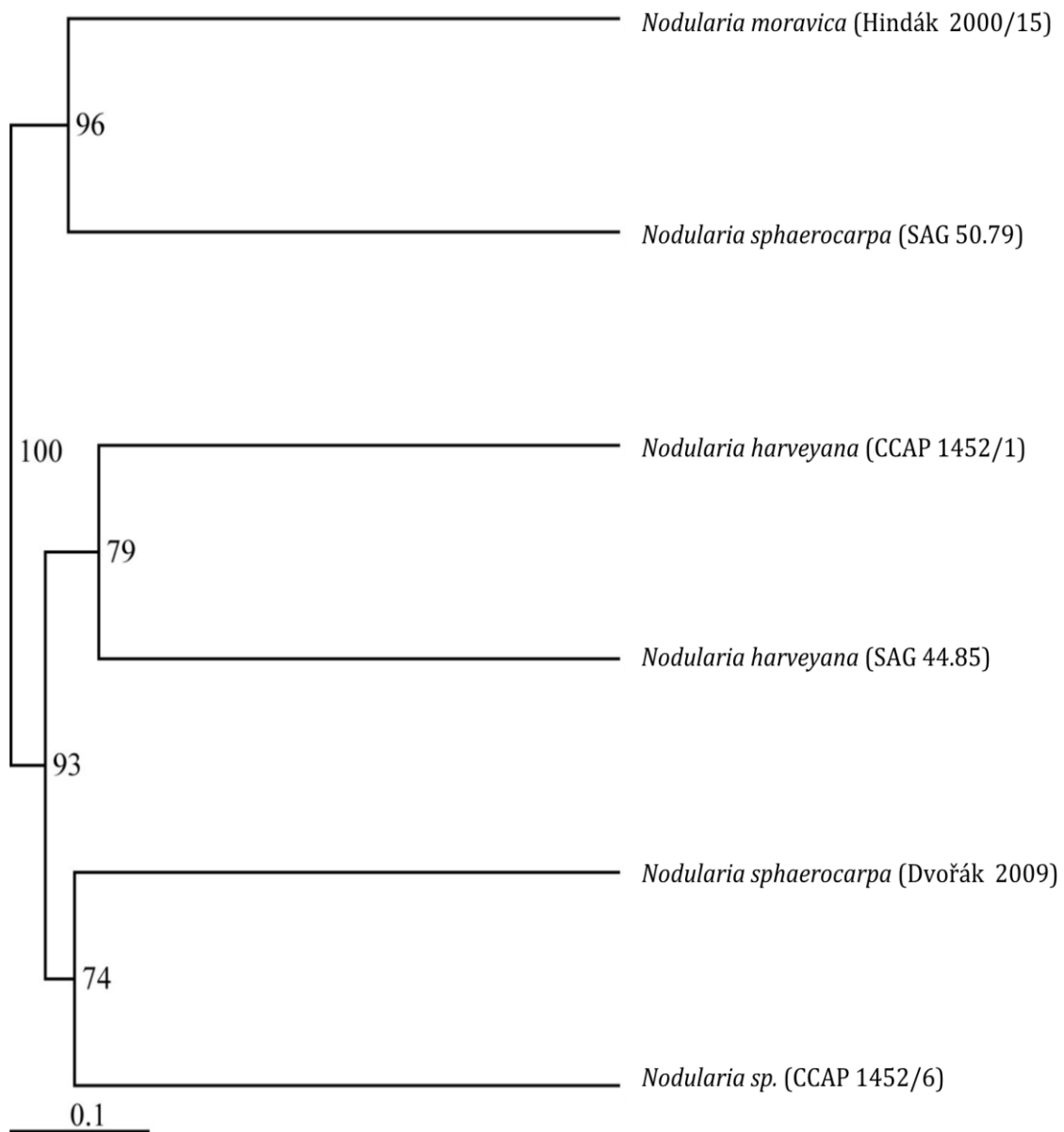
Druhou skupinu představují bentické kmeny *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79; Dvořák 2009) a *N. moravica* (Hindák 2000/15). Kmen *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) vykazuje příbuznost *N. moravica* (Hindák 2000/15) (bootstrap 64).

Tytéž kmeny *Nodularia* byly podrobeny analýze AFLP s použitím 11 primerových kombinací, které poskytly 711 fragmentů, jež byly z 99,43% polymorfni (Tab. 12). Statistická analýza (obr. 10) těchto výsledků se shoduje s výsledky sekvenace oblasti genu 16S rRNA (obr. 9), jediným rozdílem je spojení *N. sphaerocarpa* (Dvořák 2009) a *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6).

Společné seskupení *N. moravica* a *N. sphaerocarpa* podporuje teorii signifikantní divergence *N. moravica* od ostatních druhů rodu *Nodularia*. Navíc se *N. harveyana* ukazuje být monofyletickým druhem, což potvrdila molekulární i morfologická studia.



**Obr. 9:** Fylogenetický strom založený na sekvencích 16S rRNA (délka 421 bp) několika kmenů *Nodularia* konstruovaný UPGMA metodou s *Phormidium autumnale* jako outgroup a s hodnotami bootstrap analýzy uvnitř



**Obr.10 – UPGMA dendrogram (Jaccard's similarity coefficient) založený na 711 AFLP fragmentech s hodnotami bootstrap analýzy uvnitř**

**Tabulka 12: Seznam použitých primerů, počtu hodnocených a polymorfních bandů metodou AFLP u rodu *Nodularia***

Sekvence primeru EcoRI	Sekvence primeru MseI	Počet bandů	Počet polymorfních bandů
AGC	CAAC	77	77
AGC	CAAT	86	85
AGC	CGAT	65	65
ACC	CAAC	74	72
ACC	CAAT	50	50
ACC	CGAT	77	76
ACT	CGAC	67	67
ACG	CAAC	48	48
ACG	CCT	53	53
ATC	CGAT	72	72
ACA	CGAT	42	42

**Tabulka 13: Seznam použitých primerů, počtu hodnocených a polymorfních bandů metodou AFLP u rodů *Phormidium*, *Microcoleus* a *Geitlerinema***

Sekvence primeru EcoRI	Sekvence primeru MseI	Počet bandů	Počet polymorfních bandů
AGC	CAAT	25	9
AGC	CGAT	110	86
ACC	CGAT	38	14
ACG	CAAC	68	60

### 5.1.2 Fylogenetická studie sinic rodů z řádu Oscillatoriales

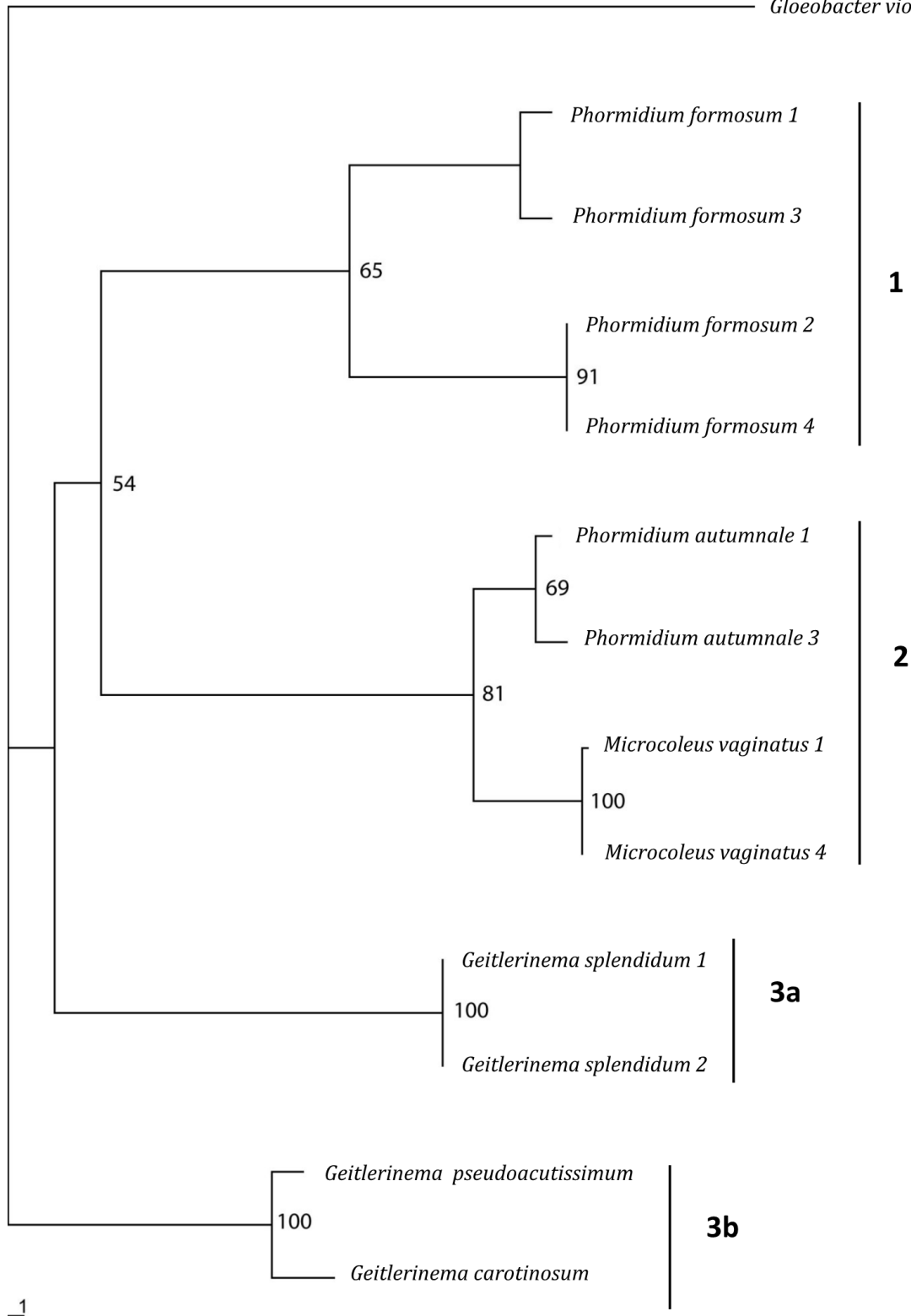
Analýzou sekvencí v oblasti 16S rRNA genu (obr. 11) bylo zjištěno, že studované kmeny vláknitých epipelických sinic se dělí do tří základních linií.

První linii reprezentuje druh *Ph. formosum*, který je morfologicky odlišný od druhu *Ph. autumnale*.

Druhá linie je směsí druhů *Ph. autumnale* a *M. vaginatus*, jež mají překryvné morfologické znaky. Zmíněné druhy bývá často obtížné od sebe navzájem odlišit. *Ph. autumnale* a *M. vaginatus* se v rámci skupiny č.2 od sebe liší na základě 16S rRNA jen nepatrně (bootstrap 81).

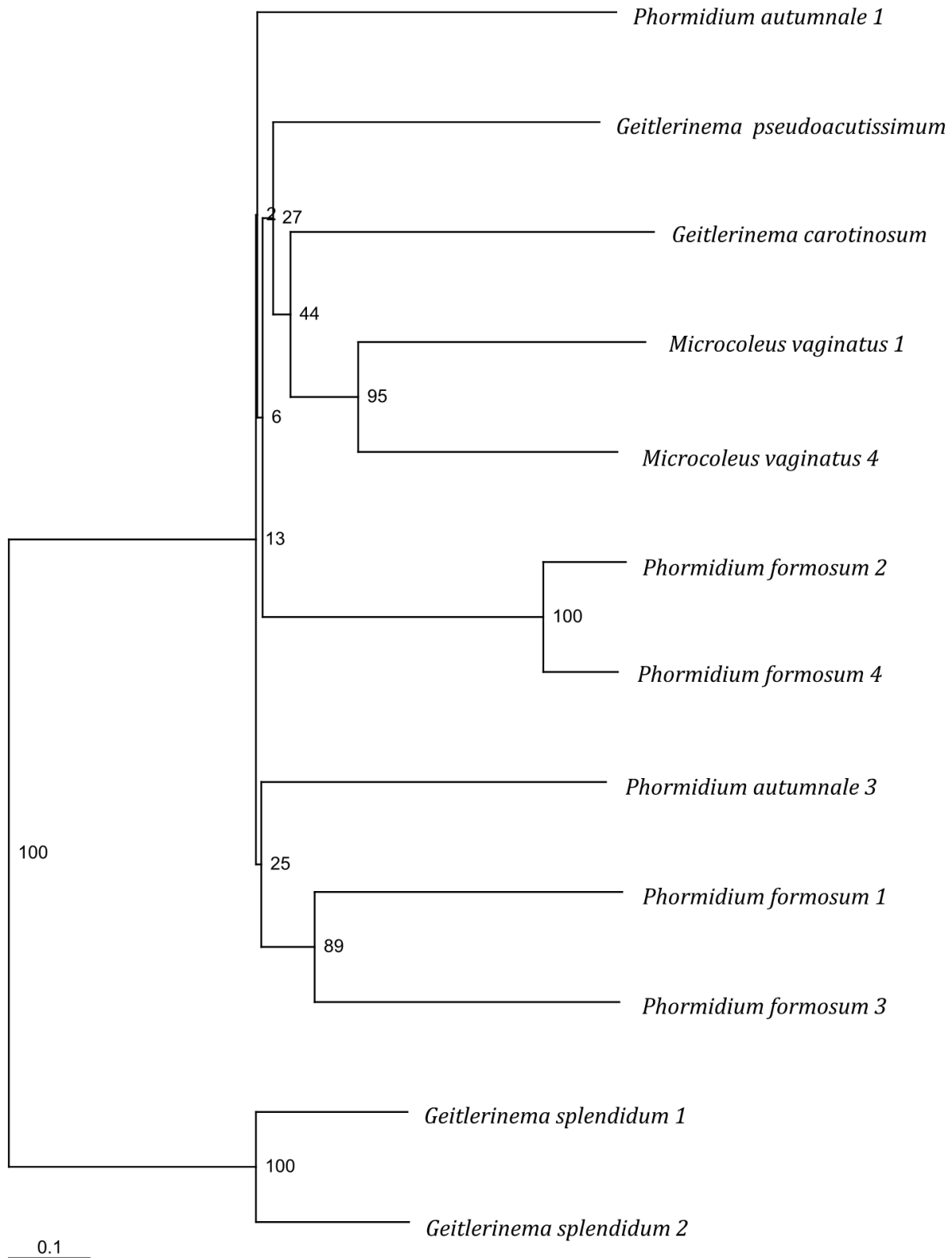
Třetí linii prezentují kmeny rodu *Geitlerinema*. Tento rod však není podle našich dosavadních výsledků dobře definovaným rodem. Typový druh *G. splendidum* se výrazně liší od dalších studovaných druhů *G. carotinosum* a *G. pseudoacutissimum*.

Hodnocením dat, které byly založeny na technice AFLP (obr. 12), bylo dosaženo poněkud odlišných závěrů než při hodnocení získaných sekvencí v oblasti 16S rRNA genu. Byla zjištěna větší heterogenita v DNA studovaných druhů. Zdá se, že zástupci rodů *Geitlerinema*, *Microcoleus* a *Phormidium* vykazují vysokou míru podobnosti DNA, což je patrné ze vzájemného promíchání druhů v zobrazeném dendrogramu (obr. 12). Tento výsledek podtrhuje známý fakt, že rody *Phormidium-Microcoleus* mají mnoho shodných znaků, jak molekulárních, tak morfologických. Zajímavým výsledkem je příslušnost *G. carotinosum* a *G. pseudoacutissimum* do skupiny *Phormidium-Microcoleus*, což přibližně odpovídá dosud zjištěným výsledkům z podrobnějších studií 16S rRNA genu a ITS oblasti (HAŠLER *et al.*, in prep.). Jediným spolehlivě definovaným druhem se zdá být *G. splendidum*, který je typovým druhem rodu *Geitlerinema*. Pro další genetické a taxonomické studie navrhuji srovnávat sekvence druhů rodu *Geitlerinema* s *G. splendidum*. Zmíněný rod vykazuje známky silné heterogenity. Jak je v současné době definován, můžeme jej považovat za polyfyletický a zřejmě dojde k jeho budoucímu rozdělení nebo přeskupení.



**Obr.11 -** Fylogenetický strom založený na sekvencích 16S rRNA (délka 421 bp) vybraných kmenů sinic z řádu Oscillatoriales konstruovaný NJ metodou s *Gloeobacter* jako outgroup a hodnotami bootstrap analýzy uvnitř





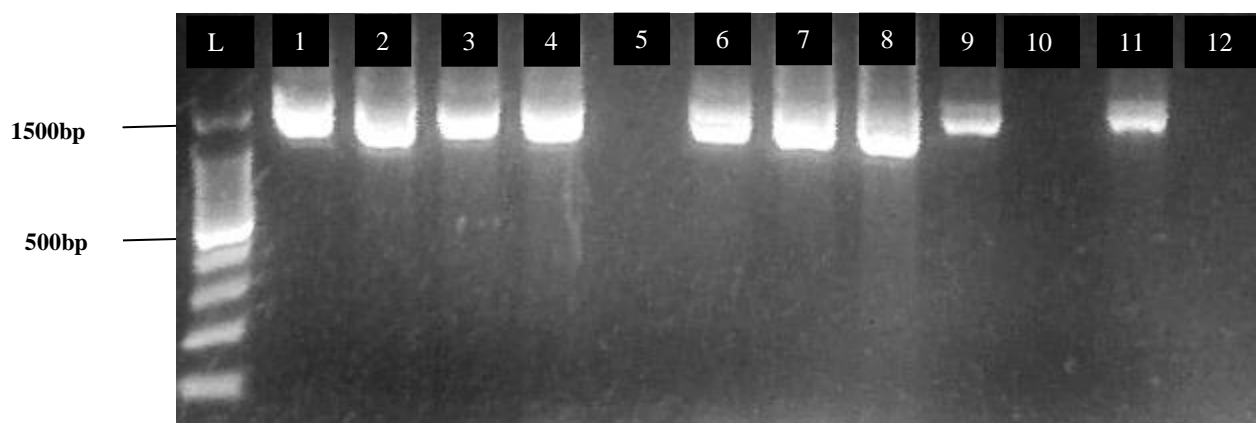
**Obr.12 – NJ dendrogram (Jaccard´s similarity coefficient) založený na AFLP fragmentech s hodnotami bootstrap analýzy uvnitř**

## 5.2 Single cell PCR

Šest kmenů rodu *Nodularia* (Tab. 3) bylo podrobena analýze metodou single cell PCR (kapitola 4.6). Hlavním cílem práce byla optimalizace tohoto postupu.

Vzorky byly analyzovány v duplikátech pro případnou absenci vlákna ve vzorku, kterou můžeme pozorovat v jamkách 5, 10 a 12 (Obr. 13).

Metodu se podařilo úspěšně optimalizovat. Místo tradičního chlazení vzorků v mrazničce byly vzorky opakovaně konzervovány tekutým dusíkem.



**Obr.13 – 1,8% agarózový gel ukazující PCR produkty generované single cell PCR**  
L – 100 bp ladder, GeneRuler™, Fermentas; 1, 2 - *N. harveyana* (CCAP 1452/1);  
3, 4 - *N. harveyana* (SAG 44.85); 5, 6 - *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6);  
7, 8 - *N. shaerocarpa* (Dvořák 2009); 9, 10 - *N. moravica* (Hindák 2000/15);  
11, 12 - *N. shaerocarpa* (SAG 50.79)

Po přečištění mohou být PCR produkty osekvenovány, získaná data použita ke konstrukci fylogenetického stromu a k dalšímu studiu fylogenetické a taxonomické příbuznosti sinic.

### 5.3 Reamplifikace AFLP fragmentů

Dvě kultury typového kmene *Asterocapsa divina* (Tab. 3) byly podrobeny AFLP, produkty byly separovány a vizualizovány v 6% polyakrylamidovém gelu (kapitola 4.3). Po vyvolání se gel nechal oschnout a byla provedena izolace DNA ze čtyř AFLP fragmentů (kapitola 4.4), vybraných z gelu na základě své intenzity. Cílem bylo navrhnout a optimalizovat postup získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů. Bylo využito dvou různých metod. Následně byla provedena reamplifikace získaného úseku DNA.

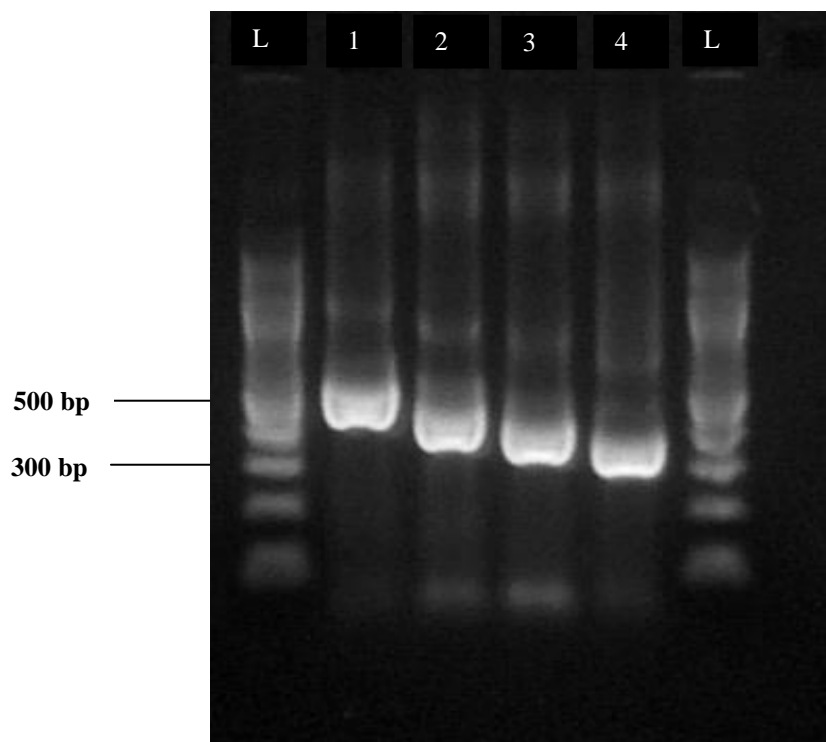
Protokol kitu UltraClean™15 DNA Purification Kit (Elisabeth Pharmacon) musel být nejprve modifikován pro polyakrylamidové gely - byl využit jiný extrakční pufr, nemohla být dodržena stanovená množství používaných chemikálií k parametrům fragmentu, některé kroky musely být vynechány, neboť bylo pracováno s nepatrným objemem a hrozila ztráta vzorku. Tato metoda nepodala uspokojivé výsledky pro nízký objem i výtěžek nukleové kyseliny.

Naproti tomu aplikace kitu D-TUBE™ Dialyzers: Mini, midi, maxi, and D-TUBE 96™ (Novagen) přinesla pozitivní výsledky. Poskytla jak vysoké objemy izolované DNA, tak je časově nenáročná.

Vzhledem k nízké koncentraci DNA izolované z fragmentu musely být produkty reamplifikace přečištěny a zaklonovány do bakterií, kde byly zmnoženy a DNA fragmentu byla opět vyizolována.

Po zmnožení DNA v bakteriích a její reamplifikaci byly produkty naneseny na agarózový gel (Obr. 14).

Tato DNA může být dále po přečištění využita na sekvenace a k dalšímu studiu fylogenetických a taxonomických vztahů sinic.



**Obr.14 – 1,5% agarózový gel ukazující PCR produkty po reamplifikaci originálních sekvencí z AFLP fragmentů**

**L** - 100 bp ladder, GeneRuler™, Fermentas; **1** - AFLP fragment 1 *Asterocapsa divina*;

**2** - AFLP fragment 2 *Asterocapsa divina*; **3** - AFLP fragment 3 *Asterocapsa divina*;

**4** - AFLP fragment 4 *Asterocapsa divina*

## 6 DISKUSE

Sinice zaujímají klíčové postavení v mnoha ekosystémech. Jednak díky produkci kyslíku a schopnosti fixovat vzdušný dusík, ale především se na ně obrací pozornost pro tvorbu toxických sekundárních metabolitů. Schopnost přesně a rychle determinovat jednotlivé druhy sinic a mapovat jejich fylogenetický vývoj nachází mnoho důležitých uplatnění. A to nejen při studiu jejich biodiverzity, ale i při výzkumu bioaktivních složek, které mohou mít potenciální terapeutické využití (TENEVA *et al.*, 2005).

Rod *Nodularia* představují vláknité sinice rodu Nostocales.

Morfologická studia rozlišují druhy *N. sphaerocarpa*, *N. harveyana* a *N. moravica*. *N. harveyana* se odlišuje v šířce trichomu, tvaru a počtu akinet (2-4), navíc se jedná o kmeny původem ze slaných vod. *N. sphaerocarpa* tvoří sférické akinety, proměnlivé ve svém počtu (KOMÁREK *et al.*, 1993). HINDÁK *et al.* (2003) vyčleňuje samostatný druh *N. moravica*, odlišující se od obou těchto druhů morfologií buněk a ekologií.

Kladistické analýzy oblasti 16S rRNA genu i AFLP shodně separují studované kmeny *Nodularia*. *N. harveyana* se jasně odlišuje od ostatních sinic rodu *Nodularia*. Tutéž rozdílnost na základě studia parciálních sekvencí 16S rRNA zaznamenala i studie LOPES *et al.* (2010). *N. harveyana* se ukazuje býti monofyletickým druhem.

Kmen *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6) na základě analýzy 16S rRNA patří ke klastru kmenů *N. harveyana*, data získaná z AFLP však tento kmen řadí k *N. sphaerocarpa* (SAG 44.85). Vzhledem k tomu, že údaje generované AFLP nemohou být porovnávány s databází, navrhuji na základě výsledků 16S rRNA určit *Nodularia* sp. jako *N. harveyana*.

Vztahy v rámci druhů *N. sphaerocarpa* stále ještě nejsou jednoznačné. Diskutují to i předchozí studie (LAAMANEN *et al.*, 2001; LYRA *et al.*, 2005). Identický kmen *N. sphaerocarpa* z termálních pramenů (PCC 7804, Dax, Francie), který studoval BOLSCH *et al.* (1999) vykazoval stejné nesrovnalosti v nukleotidové sekvenci cpcBA-IGS, proto je na místě polemizovat s určením kmene jako *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) a raději jej ponechat jako *Nodularia* sp. Obě metody prokázaly jednoznačnou příbuznost *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) s *N. moravica* (Hindák 2000/15). Tyto druhy se však fyziologicky, morfologicky i geneticky odlišují. Druh *N. moravica* definovali HINDÁK

*et al.* v roce 2003 a dosud ještě nebyl sekvenován a zkoumán na molekulární úrovni. Zvolené molekulární postupy potvrdily platnost tohoto druhu.

Rody *Geitlerinema*, *Microcoleus* a *Phormidium* sdílejí množství společných fenotypových i genotypových znaků, které se mohou překrývat a jejich rozeznání může být obtížné.

Kladistická analýza zvolených molekulárních markerů potvrdila, že rod *Phormidium* představuje polyfyletickou skupinu. Toto tvrzení souhlasí s výsledky, kterých dosáhli TENEVA *et al.* (2005). Nedala však odpověď na vnitřní rozřídění tohoto rodu. Fylogenetický strom konstruovaný na základě dat ze sekvenace oblasti genu 16S rRNA přiřadil kmeny *Ph. autumnale* ke kmenům *M. vaginatus*. Tato topologie je podporována prací STRUNECKÉHO *et al.* (2010), kteří u *Ph. autumnale* detekovali 11 bp dlouhý insert na 6. smyčce 16S rRNA, jenž popsali již dříve GARCIA-PICHEL *et al.* (2001) či BOYER *et al.* (2002) u *M. vaginatus*, a jež se zdá být specifický právě pro rod *Microcoleus*. Kmeny *Ph. autumnale* v jejich studii vytvořily samostatný klastr od ostatních druhů rodu *Phormidium*. PALINSKA and MARQUARDT (2008) též prokázali, že druh *Ph. autumnale* není zcela fylogeneticky koherentní k rodu *Phormidium* a vyžaduje revizi. Dva kmeny *Ph. autumnale* se v jejich studii geneticky odlišují od ostatních zkoumaných *Ph. autumnale* a vytvořily klastr s kmeny rodu *Microcoleus* a *Tychonema bourellyi*.

Tak jednoznačnou příbuznost druhů *Ph. autumnale* a *M. vaginatus*, jakou podaly výsledky oblasti 16S rRNA genu, však analýza AFLP nepotvrdila. Poukazuje spíše na příbuznost *M. vaginatus* s kmeny *G. carotinosum* a *G. pseudoacutissimum*, což přibližně odpovídá dosud zjištěným výsledkům z podrobnějších studií 16S rRNA genu a ITS oblasti (HAŠLER *et al.*, in prep.). Podle GUNDLAPALLY and GARCIA-PICHELLA (2006) je druh *M. vaginatus* striktně monofyletický, na což usuzují i já.

Analýza 16S rRNA provedená KIRKWOODEM *et al.* (2008) klasifikovala rod *Geitlerinema* jako monofyletický. Moje studie však přinesla jiný pohled, podle něhož vykazuje rod *Geitlerinema* značnou heterogenitu. Z výsledků obou molekulárních metod je patrné, že jediným spolehlivě definovaným druhem je typový druh *G. splendidum*. Přikláním se tedy k hypotéze, která pokládá rod *Geitlerinema* za polyfyletickou skupinu. Stejně tak WOOD *et al.* (2002) studovali 16S rRNA na 10 rodech z řádu Oscillatoriales a právě rod *Geitlerinema* rozčlenila získaná data do tří různých klastrů. Následně překlasifikovali dva kmeny *Geitlerinema* na *Phormidium*. BITTENCOURT-OLIVIERA *et al.* (2007, 2009) publikovali vysokou sekvenční

i morfológickou podobnost mezi druhy *G. amphibium* a *G. unigradatum* na základě více molekulárních metod a potvrdil hypotézu, že se může jednat z pohledu genetické informace o stejné druhy. Má studie i studie provedená MARGHERI *et al.* (2003) docházejí k myšlence, že s ohledem na rozmanitost je rod *Geitlerinema* "dočasný" a vyžaduje překlasifikování či rozčlenění do více druhů.

Systém sinic provází neustálý vývoj a i přes pokrok, který do něj vnáší molekulární fylogenetika, není dosud dořešen. Lze tedy očekávat, že v klasifikaci cyanobacterií bude docházet k četným změnám.

Single-cell PCR představuje revoluční metodu v analýze DNA. Její postup byl optimalizován pro molekulární studie sinic. Tradiční chlazení vzorků v mrazničce bylo nahrazeno jejich opakovaným mrazením v tekutém dusíku. Využití amplifikace DNA z jednotlivých buněk odstraňuje komplikace s kultivací sinic. V dnešní době lze kultivovat jen velmi malé množství druhů, přibližně 3% (HAŠLER, ústní sdělení).

Podařila se najít vhodná a optimalizovaná metodika získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů pomocí komerčního kitu. Tuto metodiku považují za vhodný nástroj ve studiu DNA sinic, u kterých PCR reakce neprobíhá s běžně používanými primery. Ze získaných AFLP fragmentů lze pak navrhovat specifické primery pro daný druh nebo rod.

## 7 ZÁVĚR

Náplní práce bylo posuzování taxonomie sinic rodů *Nodularia* a vybraných rodů z řádu *Oscillatoriales* (*Phormidium*, *Microcoleus*, *Geitlerinema*) dvěma metodami postavenými na molekulárních markerech – 16S rRNA a AFLP. Dále optimalizace metody typu single-cell PCR a nalezení vhodného postupu pro získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů.

Studie prokázala korelaci mezi molekulárními a morfologickými charakteristikami sinic rodu *Nodularia*. Mořský druh *N. harveyana* je odlišný od ostatních sladkovodních a bentických sinic druhů *N. sphaerocarpa* a *N. moravica*. K přihlédnutí na data poskytnutá analýzou oblasti genu 16S rRNA navrhuje revizi kmene *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6). Pravděpodobně se jedná o *N. harveyana*. S ohledem na příbuznost k *N. moravica* překlasifikovat také kmen *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) na *Nodularia* sp.

Zvolené metody v případě vybraných kmenů z řádu *Oscillatoriales* ukázaly poněkud odlišné výsledky. Bylo potvrzeno, že rod *Phormidium* vykazuje známky polyfyletie. Sekvence v oblasti genu 16S rRNA prokázala vysokou míru podobnosti DNA mezi *Ph. autumnale* a *M. vaginatus*. Pro přesnější porozumění vztahů mezi těmito druhy by však bylo výhodnější studium segmentu ITS a jeho sekundární struktury, popř. identifikace přítomnosti 11 bp dlouhého insertu na 6. smyčce 16S rRNA typického pro *M. vaginatus*. Podle dat AFLP analýzy náleží ke skupině *Phormidium-Microcoleus* navíc druhy *G. carotinosum* a *G. pseudoacutissimum*, což poukazuje na značnou heterogenitu rodu *Geitlerinema*. Jediným dobře definovaným druhem v rámci studovaných kmenů *Geitlerinema* se zdá být typový druh *G. splendidum*. Pro následné fylogenetické studie navrhuji tedy srovnávat sekvence druhů rodu *Geitlerinema* s *G. splendidum*.

Úspěšně se podařilo nalézt postup pro získávání originálních sekvencí z AFLP fragmentů, což může vést k následnému studiu taxonomie a fylogeneze sinic. Podle získaných sekvencí fragmentů mohou být navrženy primery specifické pro daný druh či rod.

Optimalizace single cell PCR spočívala v záměně chlazení vzorků v mrazničce za chlazení vzorků v tekutém dusíku. Metoda po sekvenci PCR produktu může dále nalézt využití v dalším srovnávání fylogenetických vztahů sinic.



## 8 LITERATURA

ANAGNOSTIDIS, K. and KOMÁREK, J. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. Arch.Hydrobiol.Suppl 80, 327-472.

ANAGNOSTIDIS, K. and KOMÁREK, J. (1990): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5 - Stigonematales. Arch.Hydrobiol.Suppl 86, 1-73.

APELDOORN, M. E., EGMOND, H. P., SPEIJERS, G. J. A. and BAKKER, G. J. I. (2007): Toxins of cyanobacteria. Mol.Nutr.Food Res. 51, 7-60.

ARZATE-CARDENAS, M. A., OLVERA-RAMIREZ, R. and MARTINEZ-JERONIMO, F. (2010): Microcystis toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. Ecotoxicology 19, 1157–1165.

BARTRAM, J., CARMICHAEL, W. W., CHORUS, I., JONES, G. and SKULBERG, O. M. (1999): Eutrophication, cyanobacterial blooms and surface scum. In: BARTRAM, J. (Ed.): Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Pp. 13-17, St. Edmundsbury Press, London.

BITTENCOURT-OLIVIERA, M. C., MASSOLA JR., N. S., ROMO, S., HERNANDEZ-MARINE, M. and MOURA, A. N. (2007): Taxonomic investigation using DNA fingerprinting in *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria). Phycological Research 55, 214–221.

BITTENCOURT-OLIVIERA, M. C., MOURA, A. N., OLIVEIRA, M. C. and MASSOLA, N. S. (2009): Geitlerinema species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by cellular morphology, ultrastructure and DNA sequencing. J. Phycol. 45, 716–725.

BOLCH, C. J. S., ORR, P. T., JONES, G. J. and BLACKBURN, S. I. (1999): Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (cyanobacteria). J. Phycol 35, 339-355.

BOYER, S. L., FLECHTNER, V. R. and JOHANSEN, J. R. (2001): Is the 16S – 23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. Mol. Biol. Evol. 18, 1057–1069.

BOYER, S. L., JOHANSEN, J. R., FLECHTNER V. R. and HOWARD, G. L. (2002): Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S - 23S ITS region. Journal of Phycology 38, 1222-1235.

BROWN, M. V., SCHWALBACH, M. S., HEWSON, I. and FUHRMAN, J. A. (2005): Coupling 16S - ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. Environmental Microbiology 7, 1466–1479.

CARVALHO, G. R. (1988): Molecular ecology; origins and approach. In: CARVALHO, G. R. (Ed.): Advanced in molecular ecology. Pp. 1-16. IOS press, Amsterodam.

CASAMATTA, D. A., VIS, M. L. and SHEATH, R. G. (2003): Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. Aquatic Botany 77, 295-309.

CASTENHOLZ, R. W. (2001): Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: GARRITY, G., BOONE, D. R. and CASTENHOLZ, R. W. (Eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition. Pp. 473–599. Springer-Verlag, New York.

CVRČKOVÁ, F. (2006): *Úvod do praktické bioinformatiky*. Academia Praha.

DE BRUIN, A., IBELINGS, B. W. and VAN DONK, E. (2003): Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiologia* 491, 47–63.

DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. (1990): A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12, 13-15.

DRUGĂ, B., BICA, A., COMAN, C., NICOARĂ, A. and DRAGOȘ, N. (2010): New primer combination for sequencing the cyanobacterial 16S rRNA gene. *Annals of RSCB* 14, 33-38.

DUY, T. N., LAM, P. K. S., SHAW, G. and CONNELL, D. W. (2000): Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 163, 113-186.

FARNELID, H., ÖBERG, T. and RIEMANN, L. (2009): Identity and dynamics of putative N<sub>2</sub>-fixing picoplankton in the Baltic Sea proper suggest komplex patterns of regulation. *Environmental Microbiology Reports* 1, 145–154.

FELSENSTEIN J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

FOX, G. E., WISOTZKEY, J. D. and JURTSUK, P. J. R. (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Inter.J.Syst.Bacteriol.* 42,166–170.

GARCIA-PICHEL, F. (2008): Molecular ecology and environmental genomics of cyanobacteria. In: HERRERO, A. and FLORES, E. (Eds.): *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Pp. 59-87. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

GARCIA-PICHEL, F., LÓPEZ-CORTÉS, A. and NÜBEL, U. (2001): Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the colorado plateau. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1902-1910.

GARCIA-PICHEL, F., NÜBEL, U. and MUYZER, G.(1998): The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169, 469–482.

GUNDLAPALLY, R. S. and GARCIA-PICHEL, F. (2006): The Community and Phylogenetic Diversity of Biological Soil Crusts in the Colorado Plateau Studied by Molecular Fingerprinting and Intensive Cultivation. *Microbial Ecol* 52, 345-357.

HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

HALL, B. G. (2001): *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Association Inc., Maryland, USA.

HAŠLER, P., DVOŘÁK, P., JOHANSEN, J. R., KITNER, M., ONDŘEJ, V. & POULÍČKOVÁ A. (In prep): Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria).

- HERBSTOVÁ, M., KOUTECKÝ, P. and KOŠNAR, J. (2008): Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice. České Budějovice.
- HINDÁK, F., ŠMARDA, J. and KOMÁREK, J. (2003): *Nodularia moravica* spec. nova, a benthic freshwater nostocalean species. *Algalogical Studies* 109, 241-253.
- IKEUCHI, M. and TABATA, S. (2001): *Synechocystis* sp. PCC 6803 – a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 70, 73–83.
- KALINA, T., VÁŇA, J. (2005): Oddělení: sinice – cyanobacteria. In: KLENER, P., (Ed.): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Pp. 60-77, Karolinum, Praha.
- KALINA, T. (1995): Říše Prokaryota. In: Ettl, H., (Ed.): Systém a vývoj sinic a řas. Pp. 32-41, Karolinum, Praha.
- KARDINAAL, W. E. A., JANSE, I., KAMST-VAN AGTERVELD, M., MEIMA, M., SNOEK, J., MUR, L. R., HUISMAN, J., ZWART, G., VISSER, P. M. (2007). *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquat. Microb. Ecol.* 48, 1-12.
- KAŠTOVSKÝ, J., HAUER, T., LUKAVSKÝ, J. (2003): Sinice a řasy, doplňkové učební texty pro studenty algologie. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- KIM, J. B., MOON, M. S., LEE, D. H. , LEE, S.T., BAZZICALUPO, M. and KIM, C. K.(2004): Comparative Analysis of Cyanobacterial Communities from Polluted Reservoirs in Korea. *The Journal of Microbiology* 42,181-187.
- KIRKWOOD, A. E., BUCHHEIM, J. A., BUCHHEIM, M. A. and HENLEY, W. J. (2008): Cyanobacterial Diversity and Halotolerance in a Variable Hypersaline Environment. *Microb Ecol* 55, 453–465.
- KITNER, M., LEBEDA, A., DOLEŽALOVÁ, I., MARAS, M., KRÍSTKOVÁ, E., NEVO, E., PAVLÍČEK, T., MEGLIC, V. ET BEHARAV, A. (2008): AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries. *Israel J. Plant Sci.* 56, 185-193.
- KOMÁREK, J. (1999): Diversity of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) of King Georges Island, maritime Antarctica – a survey. *Arch. Für hydrobiol. Suppl.* 71, 359-386.
- KOMÁREK, J. (2009): Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639, 245–259.
- KOMÁREK, J. and ANAGNOSTIDIS, K. (1986): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2- Chroococcales. *Arch.Hydrobiol.Suppl* 73, 157-226.
- KOMÁREK, J. and ANAGNOSTIDIS, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4- Nostocales. *Arch.Hydrobiol.Suppl* 82, 247-345.
- KOMÁREK, J. and ANAGNOSTIDIS, K. (1998): Cyanoprokaryota 1.Teil: Chroococcales. In: Ettl, H., GÄRTNER, G., HEYNIG, H., MOLLENHAUER, D. (Eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.

- KOMÁREK, J. and ANAGNOSTIDIS, K. (2005): Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: BÜDEL B., KRIENITZ L., GÄRTNER, G. and SCHAGERL, M. (Eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, Germany.
- KOMÁREK, J., HÜBEL, M., HÜBEL, H. and ŠMARDA, J. (1993): The *Nodularia* studies 2. Taxonomy. *Algological studies* 68, 1-25.
- KOMÁREK, J., KAŠTOVSKÝ, J., VENTURA, S., TURICCHIA, S. and ŠMARDA, J. (2009): The cyanobacterial genus *Phormidesmis*. *Algological studies* 129, 41-59.
- KOWALCHUK, G. A., DE BRUIN, F. J., HEAD, I. M., AKKERMANS, A. D. and VAN ELSAS, J. D. (2004): *Microbial Ecology Manual*, 2nd edition. Springer Verlag, Heidelberg.
- KUMARI, N., SRIVASTAVA, A. K., BHARGAVA, P. and RAI, L. C. (2009): Molecular approaches towards assessment of cyanobacterial biodiversity. *African Journal of Biotechnology* 8, 4284-4298.
- LAAMANEN, M. J., GUGGE, M. F., LEHTIMÄKI, J. M., HAUKKA, K. and SIVONEN, K.. (2001): Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (Cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4638-4647.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. and HIGGINS, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- LEHTIMÄKI, J., LYRA, CH., SUOMALAINEN, S., SUNDMAN, P., ROUHIAINEN, L., PAULIN, L., SALKINOJA-SALONEN, M. and SIVONEN, K. (2000): Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *Inter. Journal of System. and Evol. Microbiol.* 50, 1043–1053.
- LOPES, V. R., ANTUNES, A., WELKER, M. and MARTINS, R. F. (2010): Morphological, toxicological and molecular characterization of a benthic *Nodularia* isolated from Atlantic estuarine environments. *Research in Microbiology* 161, 9-17.
- LYRA, CH., LAAMANEN, M., LEHTIMÄKI, J., SURAKKA, M. and SIVONEN, K. (2005): Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. *Inter. Journal of System. and Evol. Microbiol.* 55, 555–568.
- MARGHERI, M. C., PICCARDI, R., VENTURA S., VITI, C. and GIOVANNETTI, L. (2003): Genotypic Diversity of Oscillatoriacean Strains Belonging to the Genera *Geitlerinema* and *Spirulina* Determined by 16S rDNA Restriction Analysis. *Current Microbiol* 46, 359–364.
- MEUDT, H. M. and CLARKE, A .C. (2007): Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *TRENDS in Plant Science* 12, 106-117.
- MORIN, N., VALLAEYS, T., HENDRICKX, L., NATALIE, L. and WILMOTTE, A. (2010): An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *Journal of Microbiological Methods* 80, 148–154.
- NICHOLS, J. M., FOULDS, I. J., CROUCH, D. H. and CARR N. G. (1982): The diversity of cyanobacterial genomes with respect to ribosomal RNA cistrons. *J. Gen. Microbiol.* 128:2739–2746.

- NICHOLS, J. M. and ADAMS, D. G. (1982): Akinetes. In: CARR, N. G. and WHITTON B. A. (Eds.): *The Biology of Cyanobacteria*. Pp. 387-412. Blackwell Science Publications, Oxford.
- NISHIZAWA, T., HANAMI, T., HIRANO, E., MIURA, T., WATANABE, Y., TAKANEZAWA, A., KOMATSUZAKI, M., OHTA, A., SHIRAI, M. and ASAVAMA, M. (2010): Isolation and molecular characterization of a multicellular cyanobacterium, *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. strain ABRG5-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1827-1835.
- NOVIS, P. M. and SMISSEN, R. D. (2006): Two genetic and ecological groups of *Nostoc commune* in Victoria Land, Antarctica, revealed by AFLP analysis. *Antarctic Science* 18, 573-581.
- NÜBEL, U., GARCIA-PICHEL, F. and MUYZER, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3327-3332.
- NÜBEL, U., GARCIA-PICHEL, F., KÜHL, M. and MUYZER, G. (1999): Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 422-430.
- OBERHOLSTER, P. J., BOTHA, A-M., MULLER, K. and CLOETE, T. E. (2005): Assessment of the genetic diversity of geographically unrelated *Microcystis aeruginosa* strains using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *African Journal of Biotechnology* 4, 389-399.
- OLIVER, R. L. and GANF, G. G. (1999): Freshwater Blooms. In: WHITTON, B. A. and POTTS, M. (Eds.): *Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Pp. 149-194. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston.
- OSBORN, M. and SMITH, C. (2005): *Molecular Microbial Ecology*. Taylor and Francis. New York.
- PAGE, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357-358.
- PALENIK, B. (1994): Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequenced analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3212-3219.
- PALINSKA, K. A. and MARQUARDT, J. (2008): Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Arch Microbiol* 189, 325-335.
- PANKRATZ, H. S. and BOWEN, C. C. (1963): Cytology of blue-green algae. I. The cells of *Symploca muscorum*. *Am J Bot* 50, 387-399.
- PAVLÍČEK, B. A., HRDA, S. and FLEGR, J. (1999): FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness, Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45, 97-99.
- SAVELKOUL, P. H. M., AARTS, H. J. M., HAAS, J., DIJKSHOORN, L., DUM, B., OTSEN, M., RADEMAKER, J. L. W., SCHOOLS, L. and LENSTZRA, J. A. (1999): Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3083-3091.
- SEMARY, N. A. E. (2010): Optimized electroporation-induced transformation in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 149-152.

- SEVERIN, I., ACINAS, S. G. and STAL, L. J. (2010): Diversity of nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 73, 514–525.
- STEUNOU, A. S., BHAYA, D., BATESON, M. M., MELENDREZ, M. C., WARD, D. M., BRECHT, E., PETERS, J.W., KÜHL, M. and GROSSMAN, A. R. (2006): In situ analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proceedings of the national academy of science of the united states of america* 103, 2398–2403.
- STRUNECKÝ, O., ELSTER, J. and KOMÁREK, J. (2010): Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? *Polar Biol* 33, 1419–1428.
- SWINGLEY, W. D., BLANKENSHIP, R. E. and RAYMOND, J. (2008): Insights into cyanobacterial evolution from comparative genomics. In: HERRERO, A. AND FLORES, E. (Eds.): *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Pp. 21–43. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- SWOFFORD D. L. (2001): PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- ŠVEJNOHOVÁ, L. and MARŠÁLEK, B. (2005): Pohled do mikroskopického světa sinic. *Živa* 3, 105–107.
- TENEVA, I., DZHAMBAZOV, B., MLADENOV, R. and SCHIRMER, K. (2005): Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the *cpcB-IGS-cpcA* locus. *J. Phycol.* 41, 188–194.
- TURICCHIA, S., VENTURA, S., KOMÁREK, J., SOLDATI, E., KOMÁRKOVÁ, J. (2009): Molecular and phenotype evaluation of oscillatorialean cyanobacteria from alkaline marshes of Northern Belize. *Nova Hedwigia* 89, 165–200.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407–4414.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K. and KAHL, G. (2005): *P: DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications*. Pp. 58–71. Taylor & Francis Group, USA.
- WOLK, C. P. (1982): Heterocysts. In: CARR, N. G. and WHITTON B. A. (Eds.): *The Biology of Cyanobacteria*. Pp. 359–386. Blackwell Science Publications, Oxford.
- WOOD, A. M., MILLER, S. R., LI, W. K. W. and CASTENHOLZ, R.W. (2002): Preliminary studies of cyanobacteria, picoplankton, and virioplankton in the Salton Sea with special attention to phylogenetic diversity among eight strains of filamentous cyanobacteria. *Hydrobiologia* 473, 77–92.
- ZEIDNER, G. and BÉJA, O. (2004): The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblages. *Environ. Microbiol.* 6, 528–534.
- ZIMA, J., MACHOLÁN, M., MUNCLINGER, P., PIÁLEK, J. (2004): *Genetické metody v zoologii*. Karolinum, Praha.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
bp	párů bazí ( <i>base pair</i> )
C	cytosin
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DGGE	gelová elektroforéza v denaturačním gelu ( <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
G	guanin
ITS	vnitřní transkribovatelný spacer ( <i>internal transcribed spacer</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PVP	polyvinylpyrolidon
Q-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
rRNA	ribozomová ribonukleotidová kyselina
RT-PCR	reverzní transkripce PCR ( <i>Reverse Transcription PCR</i> )
T	thymin
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

## **10 PŘÍLOHY**

HAŠLER, P., DVOŘÁK, P., ONDŘEJ, V., KITNER, M., HLOUŠKOVÁ, P. and POULÍČKOVÁ, A. (2011): The importance of the polyphasic approach in a comparative study of *Nodularia* (Nostocales, Cyanobacteria). *Preslia* 83, 167-172.



## The importance of the polyphasic approach in a comparative study of *Nodularia* (Nostocales, Cyanobacteria)

Význam komplexního přístupu při srovnávacím studiu sinic rodu *Nodularia* (Nostocales, Cyanobacteria)

Petr Hašler, Petr Dvořák, Vladan Ondřej, Miloslav Kitner, Petra Hloušková & Aloisie Pouličková

Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic, email: petr.hasler@upol.cz

Hašler P., Dvořák P., Ondřej V., Kitner M., Hloušková P. & Pouličková A. (2011): The importance of the polyphasic approach in a comparative study of *Nodularia* (Nostocales, Cyanobacteria). – Preslia 83: 167–182.

This paper focuses on the morphology, taxonomy and ecology of the widespread cyanobacteria of the genus *Nodularia* Mertens ex Bornet & Flahault. In this study the benthic strain of *N. sphaerocarpa*, isolated from a sand-pit near Olomouc (Czech Republic), is compared with brackish and seawater strains. Changes in morphology and growth parameters (biomass and chlorophyll *a*) recorded in varying salinity gradients were studied and a 16S rRNA sequencing and AFLP analysis conducted. Morphological and ecophysiological characteristics found were in congruence with molecular data. Three major subgroups of the benthic *Nodularia* (*N. sphaerocarpa*, *N. moravica* and *N. harveyana*) were found using the polyphasic approach. The results of both the molecular and morphological study clearly separated *N. moravica* and *N. sphaerocarpa*, as freshwater species preferring a low salinity and the *N. harveyana* strains originating from a marine environment preferring a high salinity.

**Key words:** AFLP, cyanobacteria, ecology, morphology, *Nodularia*, salinity, 16S rRNA

### Introduction

The genus *Nodularia* Mertens ex Bornet & Flahault is a widespread group of ecologically and morphologically complicated species, which usually occur in brackish coastal waters and freshwater alkaline water bodies. This genus rarely occurs in the Czech Republic being represented exclusively by benthic species (Kaštovský et al. 2010). Previous identification was primarily based on the width of the filament. Based on Geitler's species concept (Geitler 1932), two main groups of species are recognized; the *N. harveyana* group (filaments narrower than 8 µm) and the *N. spumigena* group (filaments wider than 8 µm). Before the 1980s a great number of species, forms and varieties were described. After this date several taxonomic revisions were made and many taxa were combined (e.g. Nordin & Stein 1980, Komárek et al. 1993). The number of species varies depending on the authors. Komárek et al. (1993) and Hindák et al. (2003) classified *Nodularia* species, using the presence of gas vesicles as the main diacritical feature, with filament width secondary. Following this treatment *Nodularia* species were divided into a benthic group without gas vesicles (*N. harveyana*, *N. moravica*, *N. sphaerocarpa*, *N. turicensis*, *N. willei*) and a planktonic water bloom forming group with gas vesicles (*N. baltica*, *N. crassa*, *N. litorea*, *N. spumigena*). However, the occurrence of gas vesicles is not a stable feature and gas vesicles can disappear under unfavourable conditions (Pouličková et al. 2004).

The taxonomically important character should be the ability to form gas vesicles and not their actual presence (Komárek et al. 1993).

Current identification of *Nodularia* species is based on the morphology of vegetative cells, heterocytes, akinetes, ecology and molecular biology (Laamanen et al. 2001, Lyra et al. 2005). Cell size can be variable and can overlap among different species (for detail see Komárek et al. 1993, their Fig. 2), however, in combination with the other features all *Nodularia* species are identifiable. The taxonomic position of *N. sphaerocarpa* is still unclear. Numerous authors consider this species to be a variety of *N. harveyana* (e.g. Geitler 1932, Elenkin 1938, Starmach 1966, Kondrateva 1968, Bourrelly 1970, Nordin & Stein 1980), whereas others classify it as a separate species (Komárek et al. 1993, Hindák et al. 2003).

The aims of this study are: (i) to evaluate the relationship of morphology, ecophysiology and molecular variability in the taxonomic classification within the genus *Nodularia* and (ii) to evaluate the taxonomic position of *N. moravica* and *N. sphaerocarpa*.

### Material and methods

A benthic population of *N. sphaerocarpa* was obtained from a eutrophic sandpit near Olomouc (Czech Republic; 49°34'3.775"N; 17°14'58.131"E) in 2007 (pH 8.03, conductivity 1040  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , salinity 0.7‰) using the sampling methods published in Špačková et al. (2009). Samples of bottom sandy sediments were incubated under standard laboratory conditions (temperature  $t = 15 \pm 1$  °C, illumination 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , photoperiod L/D 16/8 hrs) and studied using a Zeiss AxioImager light microscope (AxioCam HRc 13MPx, objectives Planapochromat 100/1.4, Oil, DIC, EC Plan-Nefluar 40/1.3, Oil, DIC). A strain of *N. sphaerocarpa* was isolated in liquid Bristol-Bold (BB) medium (Bold 1949). Several strains including those of *N. harveyana* (strain CCAP 1452/1, origin: marine; SAG 44.85, origin: salt marsh), *N. moravica* (strain Hindák 2000/15; Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, origin: freshwater, benthic), *N. sphaerocarpa* (strain SAG 50.79, origin: thermal water) and *Nodularia* sp. (strain CCAP 1452/6, origin: marine) were used for comparing with the above strain of *N. sphaerocarpa* (strain Dvořák 2009, origin: freshwater, benthic; Table 1).

### Experimental growth in salinity gradient

The liquid medium BB was adjusted with sodium chloride to a final salinity gradient as follows: 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70‰. Serological plates (12 wells) were filled with 3.5 ml of culture media and 100  $\mu\text{l}$  of *Nodularia* inoculum (3000 cells per ml) added to each well, with three replicates of each salinity. The plates were kept at the same culture conditions as incubated natural material of *N. sphaerocarpa*. Cultures were maintained for 30 days and regularly checked using an inverted microscope, the Zeiss Axiovert 40C. During the following 30 days, the number of vegetative cells, heterocytes, akinetes and vegetative cells between heterocytes were counted in a Bürker chamber. Morphological parameters (cell length and width) were measured for one hundred filaments per sample. The growth of cultures was evaluated using the chlorophyll-a concentration method of Vernon (1960).

Table 1. – List and characterization of the *Nodularia* strains used in this study.

Strain name and designation	Locality/Habitat	Reference	GeneBank access no.
<i>N. harveyana</i> , CCAP 1452/1	no data/marine	this study	HQ394172
<i>N. harveyana</i> , SAG 44.85	Lincolnshire, near Gibraltar/salt marsh	this study	HQ394175
<i>N. moravica</i> , Hindák 2000/15	Podivín, Czech Republic/freshwater, benthic, sand-pit lake	this study	HQ394173
<i>N. sphaerocarpa</i> , Dvořák 2009	Olomouc, Czech Republic/freshwater, benthic,	this study	HQ394177
<i>N. sphaerocarpa</i> , SAG 50.79	Dax, France/thermal water	this study	HQ394174
<i>Nodularia</i> sp., CCAP 1452/6	Dunstaffnage Bay, Oban, UK /marine, intertidal sediment	this study	HQ394176
<i>N. harveyana</i> , BECID29	Gulf of Finland, Baltic Sea/littoral zone, rock surface	Lyra et al. 2005	AJ781146
<i>N. harveyana</i> , Hübel 1983/300	Hiddensee, Baltic Sea/benthic microbial mat	Lyra et al. 2005	AJ781142
<i>N. harveyana</i> , Bo53	Boiensdorf/shallow coastal water	Lyra et al. 2005	AJ781143
<i>N. harveyana</i> , BECID27	Gulf of Finland, Baltic Sea /littoral zone, plant surface	Lyra et al. 2005	AJ781145
<i>N. sphaerocarpa</i> , BECID35	Gulf of Bothnia, Baltic Sea/littoral zone, mat-like colony	Lyra et al. 2005	AJ781149
<i>N. sphaerocarpa</i> , BECID36	Gulf of Finland, Baltic Sea/littoral pool, rock surface	Lyra et al. 2005	AJ781147
<i>N. sphaerocarpa</i> , Fä19	Fährdorf, Isle of Poel/shallow coastal water	Lyra et al. 2005	AJ781144
<i>N. sphaerocarpa</i> , Hübel 296	no data	Lyra et al. 2005	AJ781141
<i>N. sphaerocarpa</i> , PCC 73104	Spotted lake, Canada/alkaline soil	Lyra et al. 2005	AJ781139
<i>N. sphaerocarpa</i> , Up16a	Gulf of Finland, Baltic Sea/plankton	Lyra et al. 2005	AJ781140
<i>N. sphaerocarpa</i> , UTEX B 2092	Osoyoos, Canada/alkaline soil	Lyra et al. 2005	AJ781151
<i>N. spumigena</i> , AV1	Gulf of Finland, Baltic Sea/plankton	Lyra et al. 2005	AJ781136
<i>N. spumigena</i> , F81	Gulf of Finland, Baltic Sea/plankton	Lyra et al. 2005	AJ781137
<i>N. spumigena</i> , PCC 9350	Gulf of Finland, Baltic Sea/plankton	Lyra et al. 2005	AJ781131
<i>N. spumigena</i> , UTEX B 2093	San de Fuca, Whidbey Island, WA, USA/pond	Lyra et al. 2005	AJ781148

### Statistical analyses

Morphological variability was analysed using one-way ANOVA (NCSS software; Hintze 2006). Polynomial correlation was made on significance level of  $\alpha = 0.05$ . Hierarchical clustering was based on Ward's minimum variance method (NCSS software).

### DNA extraction, amplification and sequencing

DNA extraction was performed using the protocol of Doyle & Doyle (1990). The integrity and quality of DNA was checked on 1.8% agarose gel. Concentrations of DNA samples were assessed by a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). The PCRs with 16S rRNA primers CYA106F, CYA359F, CYA781R(a) and CYA781R(b) (Nübel et al. 1997) were performed using a FastStart PCR Master Kit (Roche) following the PCR protocol of Nübel et al. (1997). The PCR products were checked by agarose electrophoresis, purified using GeneElute PCR Clean up Kit (Sigma-Aldrich Co., USA) or cloned into the pGEM<sup>®</sup>-T vector (Promega Corporation, Madison, USA) and sequenced.

Table 2. – List of primer sets used in the reactions with the total number of scored and polymorphic bands.

Amplification Primer Sets Sequences	Number of bands	Number of polymorphic bands
EcoRI primer E-CAG / MseI primer M-CAAC	77	77
EcoRI primer E-CAG / MseI primer M-CAAT	86	85
EcoRI primer E-CAG / MseI primer M-CGAT	65	65
EcoRI primer E-ACC / MseI primer M-CAAC	74	72
EcoRI primer E-ACC / MseI primer M-CAAT	50	50
EcoRI primer E-ACC / MseI primer M-CGAT	77	76
EcoRI primer E-ATC / MseI primer M-CGAT	72	72
EcoRI primer E-ACA / MseI primer M-CGAT	42	42
EcoRI primer E-ACT / MseI primer M-CGAT	67	67
EcoRI primer E-ACG / MseI primer M-CAAC	48	48
EcoRI primer E-ACG / MseI primer M-CTT	53	53

Total number of bands: 711

Polymorphic bands: 99.43%

### *AFLP analysis*

The original procedure published by Vos et al. (1995) with the modification proposed by Kitner et al. (2008) was used for AFLP analysis of six *Nodularia* strains. In total eleven selective primer combinations were chosen to generate the AFLP profiles (Table 2). Products of amplification were separated on a 6%, 0.4 mm thick denaturing polyacrylamide gel (0.5× TBE buffer) using the T-REX (Thermo Scientific Owl Separation Systems, Rochester, NY, USA) sequencing gel electrophoresis apparatus. Subsequent silver staining was used for visualizing the AFLP patterns.

### *Phylogenetic analyses*

The 16S rRNA sequences of selected *Nodularia* strains (see Table 1 for access numbers) obtained above and from EMBL Nucleotide Sequence Database were aligned with ClustalW2 (EMBL Sequence Analysing tool; available from <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). The phylogenetic tree was obtained using Bayesian MCMC (Markov chain Monte Carlo) analysis, which also enables a molecular clock analysis (Drummond & Rambaut 2007). The 95% confidence interval for the divergence of *Nodularia* isolates was inferred by an analysis with BEAST 1.4.2. (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk>). The analysis was run for 10M generations and the burn-in was set to 100K generations. Then program TreeAnnotator summarized a tree sample from BEAST annotating it with posterior probabilities, HPD node heights and rates. This tree was viewed in the program FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Minimum evolution and maximum likelihood bootstrap analysis was carried out using PAUP\* (Swofford 2001). Visualized AFLP gels were scored for presence (1) or absence (0) of bands. The binary matrix was constructed from primary data and subjected to FreeTree for cluster analysis (Pavliček et al. 1999; method UPGMA, Jaccard similarity coefficient). The resulting cluster was visualized in TreeView (Page 1996). To validate how consistently the AFLP data support given isolate bipartitions, bootstrap analysis was carried out using 1000 replicates (Felsenstein 1985).

## Results

### *Investigation of natural population of Nodularia sphaerocarpa*

The morphology of *N. sphaerocarpa* accords with the description in Komárek et al. (1993) and differences between the species studied are compared in Table 3. *Nodularia sphaerocarpa* was initially observed in December 2007 when it formed an important part of the benthic cyanobacterial assemblages (25%) on the surface of sandy bottom sediments. Filaments were usually straight, bent or occasionally wavy, attenuated or not, 5–8 µm wide (Figs 1–5). Sheaths were colourless and diffluent. Cells without gas vesicles were short, barrel-shaped, 2–5 × 5–7 µm. Heterocytes were elliptical, rectangularly-rounded or barrel-shaped, 5–9 × 6–10 µm. Akinetes were spherical or elliptical, 6–10 µm in diameter, with wart-like incrustations on their surface (Figs 6–9) and often in chains (more than four cells). Occasionally, short hormogonia (up to 20 cells), which had germinated from akinetes, were found.

Table 3. – Comparison of the morphology of the *Nodularia* species included in this study.

	<i>N. sphaerocarpa</i>	<i>N. moravica</i>	<i>N. harveyana</i>	<i>N. spumigena</i>
Vegetative cells	2–5 × 5–7	2–6 × 7–15	1.5–3.5 × 4–5	2–5.6 × 6.8–12
Heterocytes	5–9 × 6–10	4–11 × 8.5–11	3–6 × 4–7	2–5 × 9–13.7
Akinetes	6–10 in diam.	6–10 × 8–12	4–8 × 5–7	5.7–15 × 8–12
Gas vesicles	not present	not present	not present	present
Habitat	periphytic, benthic, alkaline waters	alkaline littoral	periphytic, benthic, saline or mineral water	planktonic, marine
Reference	this study	Hindák et al. 2003	Komárek et al. 1993	Komárek et al. 1993

### *Effect of salinity on morphology of Nodularia strains*

Five strains of *Nodularia*, from culture collections, were compared with the isolate (Table 1, Figs 10–43). Growth and filament shape were variable and depended on salinity. *Nodularia sphaerocarpa* (both strains), *N. harveyana* (both strains) and *Nodularia* sp. were mostly long and straight (Figs 1–30) or slightly bent. Short filaments and hormogonia of *N. sphaerocarpa* (strain Dvořák 2009) were recorded in standard BB medium (Fig. 10).

Growth of *N. sphaerocarpa* (strain Dvořák 2009) was best when the salinity was 10–20‰ (Table 4) and inhibited when it was 40‰, whereas the second strain (SAG 50.79) grew well only in basic BB medium and at a salinity of 10‰ (1920000 cells per ml). *Nodularia moravica* (Hindák 2000/15) grew well in media with salinities of up to 40‰ (with the highest abundance of 4,138,000 cells per ml at 10‰ salinity). Strain *N. harveyana* (CCAP 1452/1) grew in basic BB medium with salinities up to 50‰, but the growth was similar over the entire range. Strains of *N. harveyana* (SAG 44.85) and *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6) grew in basal BB medium with salinities up to a 40‰ and *N. harveyana* and *Nodularia* sp. grew best at salinities of 30‰ and 10‰, respectively (Table 4). Growth parameters (abundance and chlorophyll-a) were significantly correlated with gradient of salinity, except for strain *N. harveyana* CCAP 1452/1 (Table 5).

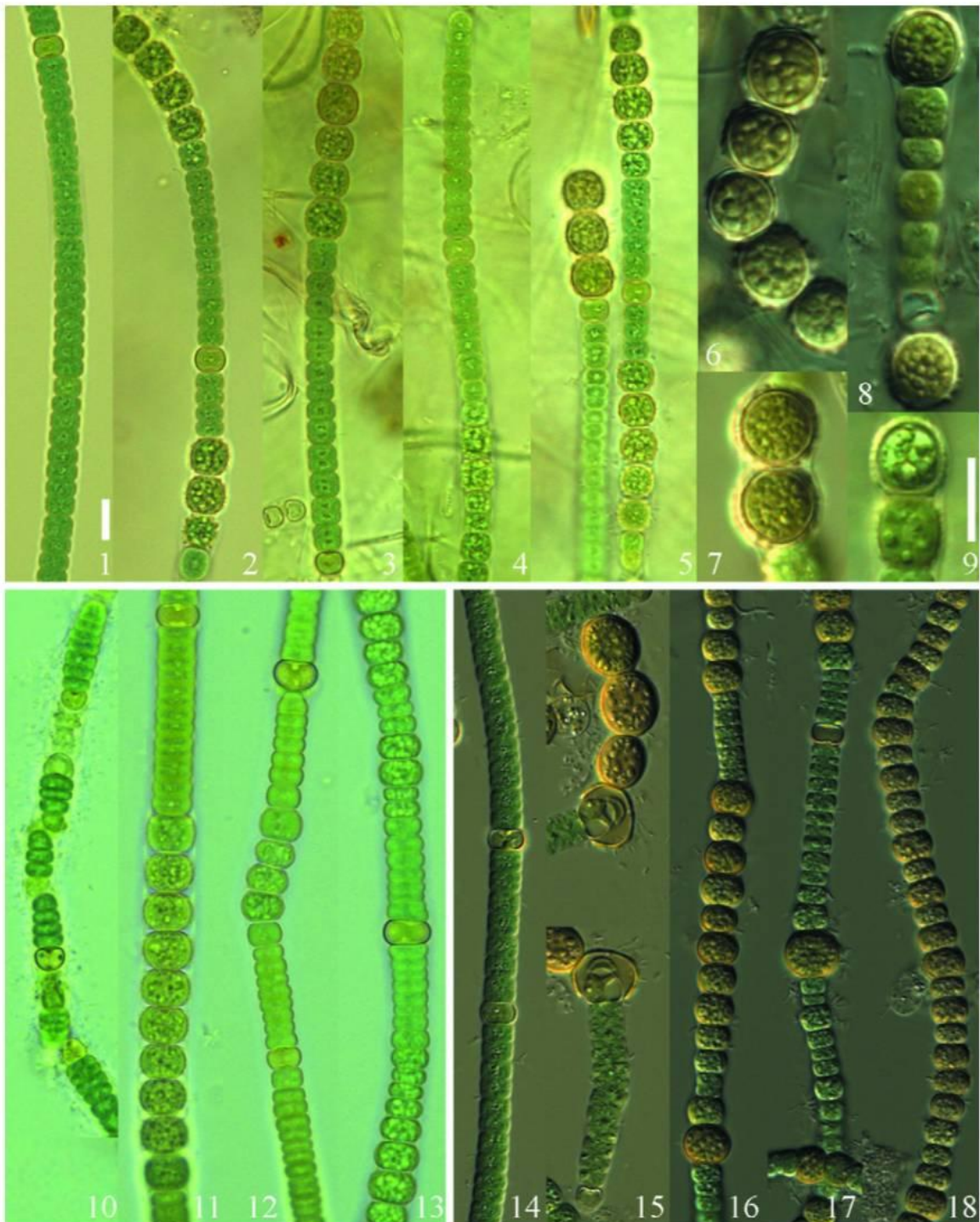
Table 4. – Culture growth parameters on salinity gradient: abundances (thousands·ml<sup>-1</sup>) of vegetative cells, heterocytes, akinetes and the chlorophyll *a* concentration (µg·l<sup>-1</sup>) of *Nodularia* species when kept at particular salinities; n.d. – no data (no akinetes appeared or strain was not growing); salinity gradient: BBM – Bristol-Bold medium without addition of NaCl (= 0‰) and salinity range (10–50‰).

Species (strain)	Abundance	Salinity					
		BBM	10‰	20‰	30‰	40‰	50‰
<i>N. sphaerocarpa</i> (strain Dvořák 2009)	cells	2904	13737	18205	2558	n.d.	
	heterocytes	149	290	349	49	n.d.	
	akinetes	4	27	37	4	n.d.	
	total cells	3058	14053	18592	2611	n.d.	
	chlorophyll <i>a</i>	11.89	31.39	22.63	5.72	n.d.	
<i>N. sphaerocarpa</i> (SAG 50.79)	cells	5893	1920	n.d.	n.d.	n.d.	
	heterocytes	209	43	n.d.	n.d.	n.d.	
	akinetes	n.d.	130	n.d.	n.d.	n.d.	
	total cells	6102	2093	n.d.	n.d.	n.d.	
	chlorophyll <i>a</i>	37.43	8.89	n.d.	n.d.	n.d.	
<i>N. moravica</i> (strain Hindák 2000/15)	cells	3222	4138	3940	3247	320	
	heterocytes	471	347	273	210	27	
	akinetes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	63	
	total cells	3693	4484	4213	3457	410	
	chlorophyll <i>a</i>	110.62	76.58	54.10	13.08	3.43	
<i>N. harveyana</i> (CCAP 1452/1)	cells	19653	13871	13113	12573	19431	10071
	heterocytes	1327	809	847	740	870	542
	total cells	20980	14680	13960	13313	20306	10613
	chlorophyll <i>a</i>	25.02	40.90	40.37	31.66	52.96	16.00
<i>N. harveyana</i> (SAG 44.85)	cells	3849	2960	6422	9600	3871	
	heterocytes	658	596	556	756	191	
	total cells	4507	3556	6978	10369	4076	
	chlorophyll <i>a</i>	19.56	19.94	17.91	15.24	5.97	
<i>Nodularia</i> sp. (CCAP 1452/6)	cells	15607	18853	8044	10449	4787	
	heterocytes	747	900	484	716	223	
	total cells	16353	19753	8529	11164	5010	
	chlorophyll <i>a</i>	49.07	32.54	24.54	16.90	10.31	

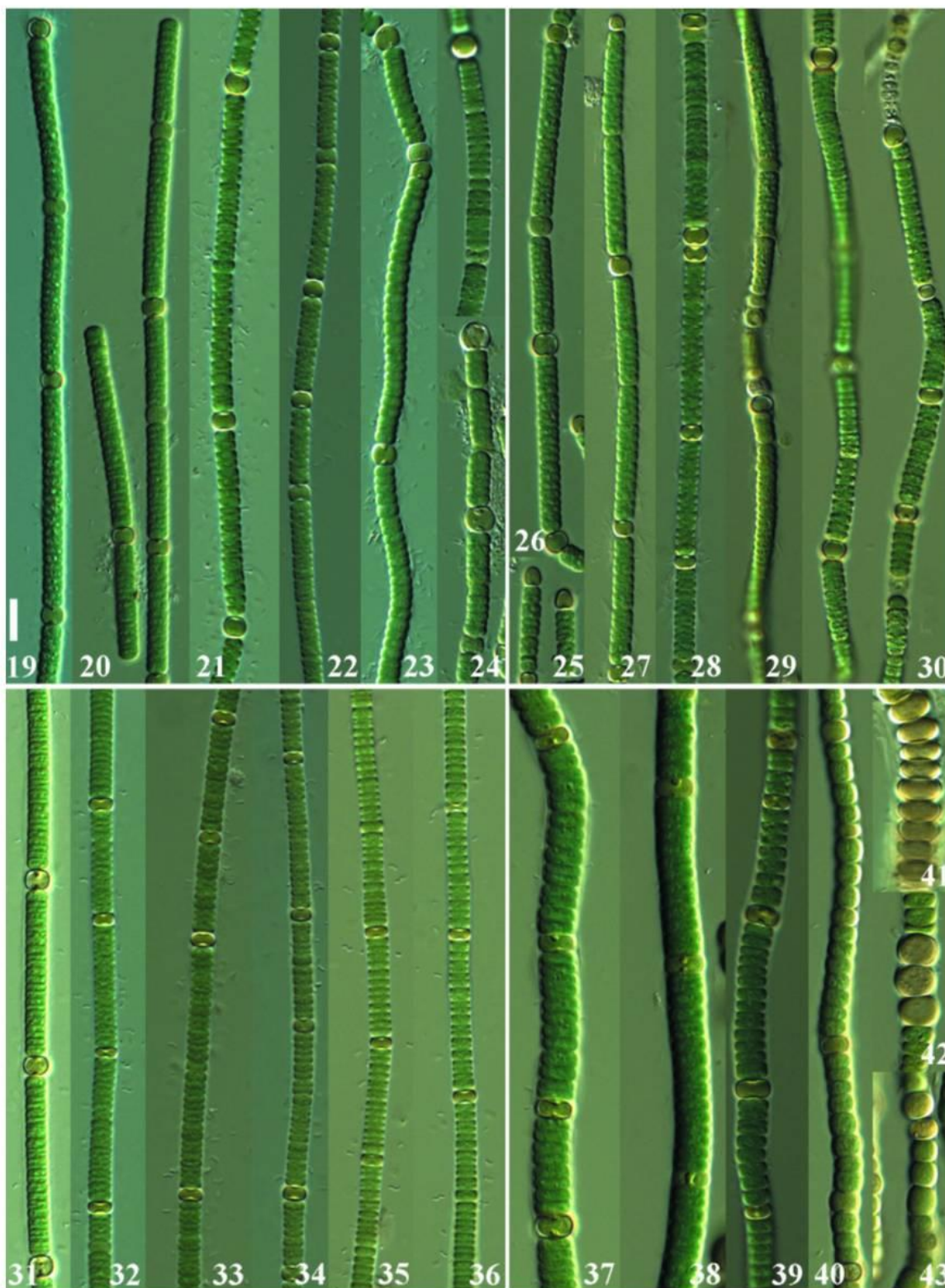
Table 5. – Coefficient of determination ( $r^2$ ) of the correlation between the growth parameters and salinity. Salinity ranges as in Table 4; the strain *N. harveyana* CCAP 1452/1 growth of which was not significantly correlated with salinity is not shown. \* significance level 0.05.

Growth parameters	<i>N. sphaerocarpa</i> (strain Dvořák 2009)	<i>N. moravica</i> (strain Hindák 2000/15)	<i>N. sphaerocarpa</i> (SAG 50.79)	<i>N. harveyana</i> (SAG 44.85)	<i>Nodularia</i> sp. (CCAP 1452/6)
Vegetative cells	0.949*	0.987*	0.394	0.214	0.711*
Heterocytes	0.930*	0.972*	0.549	0.694*	0.649*
Total cells	0.949*	0.979*	0.369	0.241	0.710*
Chlorophyll-a	0.948*	0.984*	0.980*	0.440	0.993*





Figs 1–18. – Morphological variability of *Nodularia sphaerocarpa*. **1–9** seminatural population of *N. sphaerocarpa* from a sand pit at Olomouc: **1–5** filaments; **6–9** akinetes; **10–18** changes in the filaments recorded at different salinities. **10–13** strain Dvořák 2009: **10** standard BB medium; **11** salinity 10‰; **12** salinity 20‰; **13** salinity 30‰; **14–18** strain SAG 50.79: **14–15** standard BB medium; **15** hormogonia production; **16–18** salinity 10‰. Scale bars 10 µm (1–5, 10–18; 6–9)



Figs 19–43. – Morphological variability of *Nodularia harveyana* and *Nodularia moravica*. 19–24 strain CCAP 1452/1: 19 standard BB medium; 20 salinity 10‰; 21 salinity 20‰; 22 salinity 30‰; 23 salinity 40‰; 24 salinity 50‰; 25–30 strain SAG 44.85: 25–26 standard BB medium; 27 salinity 10‰; 28 salinity 20‰; 29 salinity 30‰; 30 salinity 40‰; 31–36 strain CCAP 1452/6: 31 standard BB medium; 32 salinity 10‰; 33 salinity 20‰; 34 salinity 30‰; 35–36 salinity 40‰; 37–43 strain Hindák 2000/15: 37 standard BB medium; 38 salinity 10‰; 39 salinity 20‰; 40 akinete formation in standard BB medium; 41–43 salinity 10 and 30‰. Scale bar 10  $\mu$ m.



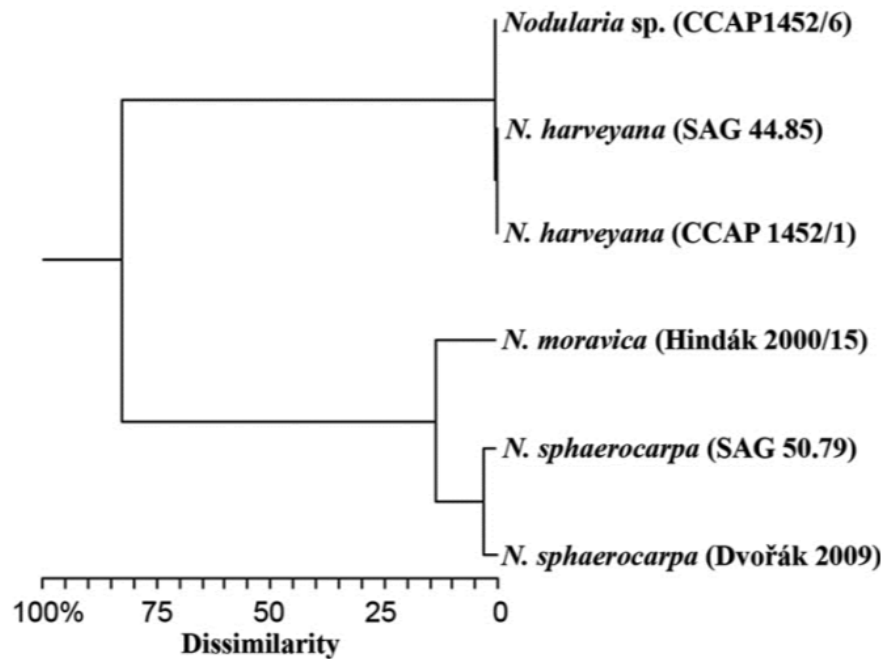


Fig. 44. – Hierarchical clustering based on morphology of vegetative cells and heterocytes (Ward's minimum variance method).

Vegetative cells were always wider than long. Barrel-shaped cells occurred occasionally. Cell morphology was significantly influenced by the salinity gradient (Table 6). Hierarchical clustering analysis based on cell morphology clearly separated the marine group of *N. harveyana* and *Nodularia* sp. from the freshwater group of *N. sphaerocarpa* and *N. moravica*. *Nodularia moravica* was also slightly separated from *N. sphaerocarpa* (Fig. 44). There was no significant influence of salinity on cell size within the *N. harveyana* group. A wide variation in cell dimensions was observed in *N. moravica*, but without any general trend relative to salinity. Cells, akinetes and heterocytes seemed to be wider at the higher salinities in *N. sphaerocarpa* (Table 6). Cells and heterocytes were the widest in a medium adjusted to a salinity of 30‰. Cell dimensions of the strain (SAG 50.79) of *N. sphaerocarpa* were similar to those of strain Dvořák 2009. There were no significant differences in cell dimensions in the standard medium with a salinity of 10‰ (except for that of the heterocytes). Cells of *N. moravica* were wider than long, occasionally barrel-shaped or elliptical. Cell and heterocyte width in the *N. harveyana* group were not as variable as in *N. sphaerocarpa* and *N. moravica*. Cells and heterocytes were always wider than long and the minimum and maximum values were similar (for details see Table 6).

Within the first 10 days of the experiment vegetative cells and heterocytes were observed in cultures of all strains. No akinetes were formed by *N. harveyana* and *Nodularia* sp. After 20 days akinetes occurred in the cultures of *N. sphaerocarpa* and *N. moravica*, particularly at salinities between 10–30‰ and sporadically in the basic BB medium. Akinetes of *N. sphaerocarpa* (strain Dvořák 2009) were not of the same shape as in the natural population and were usually wider than long and lacked wart-like incrustations on their surfaces (Figs 11–13). Low salinities stimulated *N. sphaerocarpa* to produce short hormogonia from filaments by means of necridic cells (Fig. 10). Akinetes of *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) occurred in long chains (0–10‰ salinity) and those in stan-

Table 6. – Changes in morphology of *Nodularia* strains kept at different salinities. Salinity gradient as in Table 4; n.d. – no data. Effects of salinity on the length ( $\mu\text{m}$ ) and width ( $\mu\text{m}$ ) of each cell type were tested using one-way Anova; \* significance level 0.05–0.01; \*\* significance level  $< 0.01$ ,  $n = 100$  cells for each salinity.

		Vegetative cells		Heterocytes		Akinetes		Cells HTC-HTC
		Length	Width	Length	Width	Length	Width	
<i>Nodularia sphaerocarpa</i> (strain Dvořák 2009)	BBM	2.51±0.64	6.90±0.58	4.96±0.77	7.54±0.81	5.67±0.71	9.43±1.15	31±7
	10‰	2.40±0.70	8.02±0.73	4.98±0.90	9.06±1.00	5.03±1.31	10.00±0.81	95±15
	20‰	2.51±0.62	7.57±0.67	5.29±0.90	9.28±0.96	6.09±0.94	9.81±1.29	69±20
	30‰	2.24±0.46	9.19±1.02	6.08±1.29	11.06±1.44	5.73±0.64	10.89±1.53	70±31
	F	3.83**	141.71**	25.15**	160.04**			
	r <sup>2</sup>	0.50	0.74	0.69	0.93			
<i>Nodularia sphaerocarpa</i> (SAG 50.79)	BBM	3.28±0.92	6.97±0.47	6.43±1.16	8.75±0.88	9.77±1.76	10.56±1.31	17±7
	10‰	2.93±0.76	7.13±0.94	5.62±1.80	7.92±0.95	7.96±1.42	10.40±0.98	23±4
	F	2.64	0.70	3.32	7.78**			
<i>Nodularia moravica</i> (strain Hindák 2000/15)	BBM	3.13±0.85	9.81±0.65	5.48±1.03	9.67±0.60	n.d.	n.d.	13±4
	10‰	3.00±0.89	8.90±0.60	4.52±0.68	9.16±0.64	n.d.	n.d.	13±5
	20‰	3.58±0.92	7.71±0.59	5.29±0.78	8.26±0.68	8.00±0.00	12.00±0.00	9±3
	30‰	3.06±0.89	7.00±0.68	5.55±0.76	8.03±0.60	n.d.	n.d.	11±4
	40‰	3.81±0.75	8.69±1.25	6.06±1.18	10.00±0.63	7.32±2.04	9.84±1.60	14±8
	F	3.88**	69.05**	10.31**	47.78**			
r <sup>2</sup>	0.39	0.36	0.38	0.01				
<i>Nodularia harveyana</i> (CCAP 1452/1)	0‰	2.29±0.59	5.42±0.51	5.16±0.58	5.93±0.44	n.d.	n.d.	18±6
	10‰	2.29±0.46	5.29±0.46	4.58±0.81	5.61±0.50	n.d.	n.d.	17±5
	20‰	2.29±0.46	5.16±0.27	4.90±0.83	5.55±0.57	n.d.	n.d.	15±4
	30‰	2.58±0.50	4.90±0.60	4.74±0.58	5.45±0.57	n.d.	n.d.	13±5
	40‰	2.09±0.65	5.00±0.51	4.77±0.92	5.58±0.62	n.d.	n.d.	17±6
	50‰	2.45±0.63	5.37±0.49	5.09±0.88	6.27±0.65	n.d.	n.d.	15±7
F	2.73*	6.89**	2.38*	9.22**				
r <sup>2</sup>	0.02	0.13	0.01	0.07				
<i>Nodularia harveyana</i> (SAG 44.85)	0‰	2.44±0.62	5.25±0.57	5.03±0.53	5.53±0.88	n.d.	n.d.	12±6
	10‰	2.06±0.56	5.19±0.40	4.94±0.80	5.62±0.61	n.d.	n.d.	17±9
	20‰	2.03±1.18	5.19±0.57	4.72±0.77	5.81±0.64	n.d.	n.d.	15±5
	30‰	2.16±0.37	5.16±0.37	4.60±0.71	5.88±0.55	n.d.	n.d.	14±7
	40‰	2.16±0.57	5.31±0.47	4.69±0.78	5.91±0.47	n.d.	n.d.	11±4
	F	1.61	0.63	2.03	2.06			
r <sup>2</sup>	0.20	0.06	0.79	0.93				
<i>Nodularia</i> sp. (CCAP 1452/6)	0‰	2.06±0.57	4.87±0.50	5.13±0.62	6.10±0.60	n.d.	n.d.	26±9
	10‰	2.06±0.68	5.26±0.68	3.94±0.81	5.94±0.73	n.d.	n.d.	22±8
	20‰	2.00±0.63	4.98±0.48	4.19±0.75	5.58±0.50	n.d.	n.d.	24±9
	30‰	1.68±0.60	5.39±0.56	3.58±0.81	6.03±0.60	n.d.	n.d.	26±12
	40‰	1.94±0.57	5.16±0.45	3.71±0.94	6.00±0.77	n.d.	n.d.	25±12
	F	2.13	4.68**	18.73**	3.04*			
r <sup>2</sup>	0.39	0.29	0.68	0.01				
Pooled data	F	17.26**	233.43**	20.13**	200.98**			

dard medium were more spherical than in the 10‰ medium (Figs 16–18). Germination was observed in the standard BB medium (Fig. 15). Akinetes of *N. moravica* occurred throughout the whole salinity gradient and were the widest of all of the cultivated strains (Table 6). Their shape changed from flatly elliptical to round (Figs 41–43). Unlike in

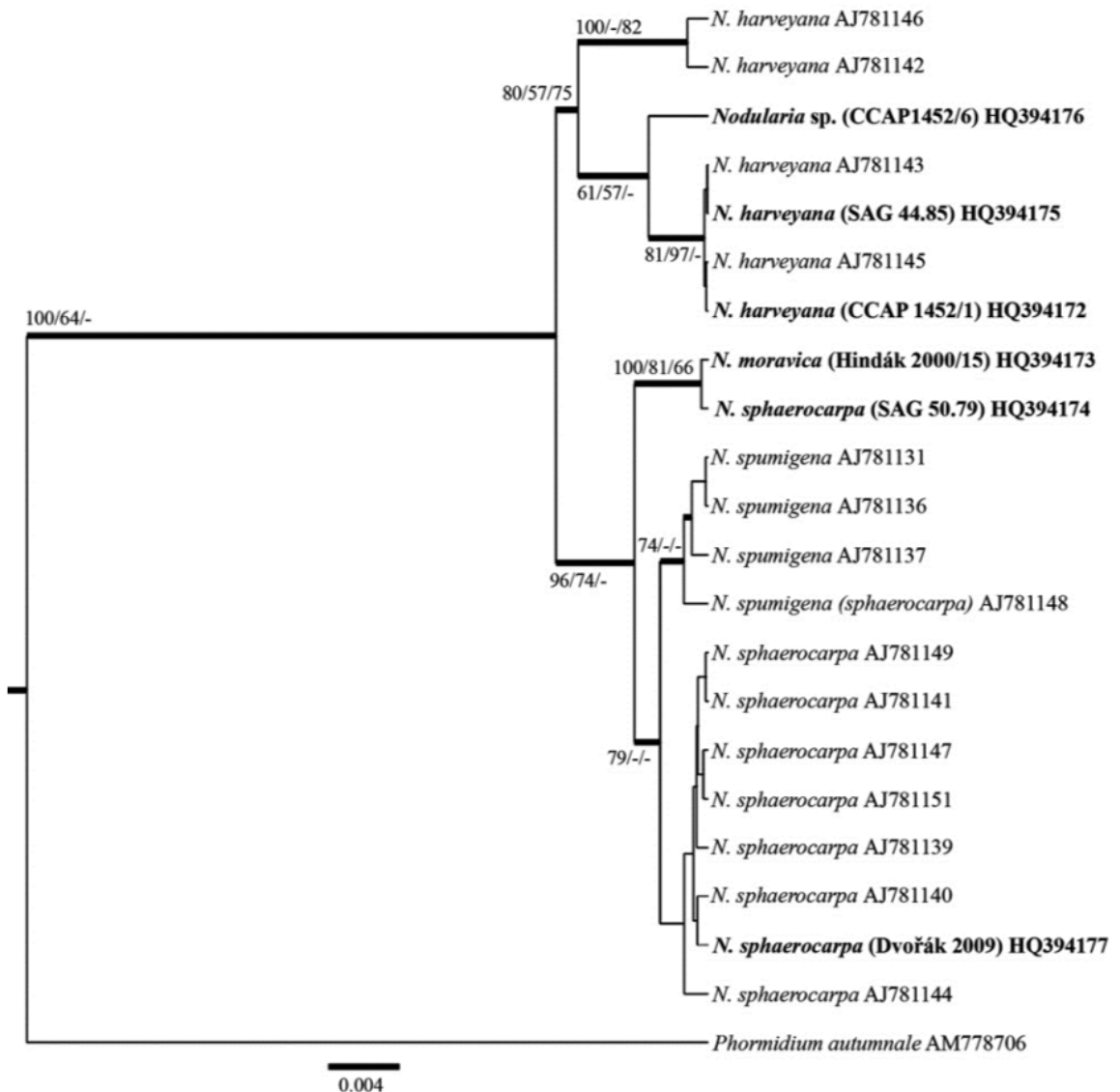


Fig. 45. – Phylogram of single tree generated from Bayesian MCMC (Markov chain Monte Carlo) analysis based on 16S rRNA sequences (length = 421bp) and with *Phormidium autumnale* as the outgroup. Labelled branches indicate Bayesian posterior probabilities  $\geq 95\%$ . Bootstrap support values ( $\geq 50\%$ ) are shown above the branches (posterior probability from Bayesian analysis/minimum evolution/maximum likelihood). Strains studied are in bold.

*N. sphaerocarpa*, the content of the akinetes was less granulated, rather fine granulated to nearly homogenous and pale brown or green-brown. Akinetes of *Nodularia moravica* germinated to produce hormogonia in media with salinities of between 10 and 20‰.

#### Analysis of 16S rRNA gene sequences

The 16S rRNA sequences from the *Nodularia* strains studied were compared with those available from the GenBank and one *Phormidium* isolate (outgroup). Following Lyra et al. (2005), only well-defined sequences were used. This analysis clearly divided the genus *Nodularia* into two major groups: *N. harveyana* and a group represented by *N. moravica*,

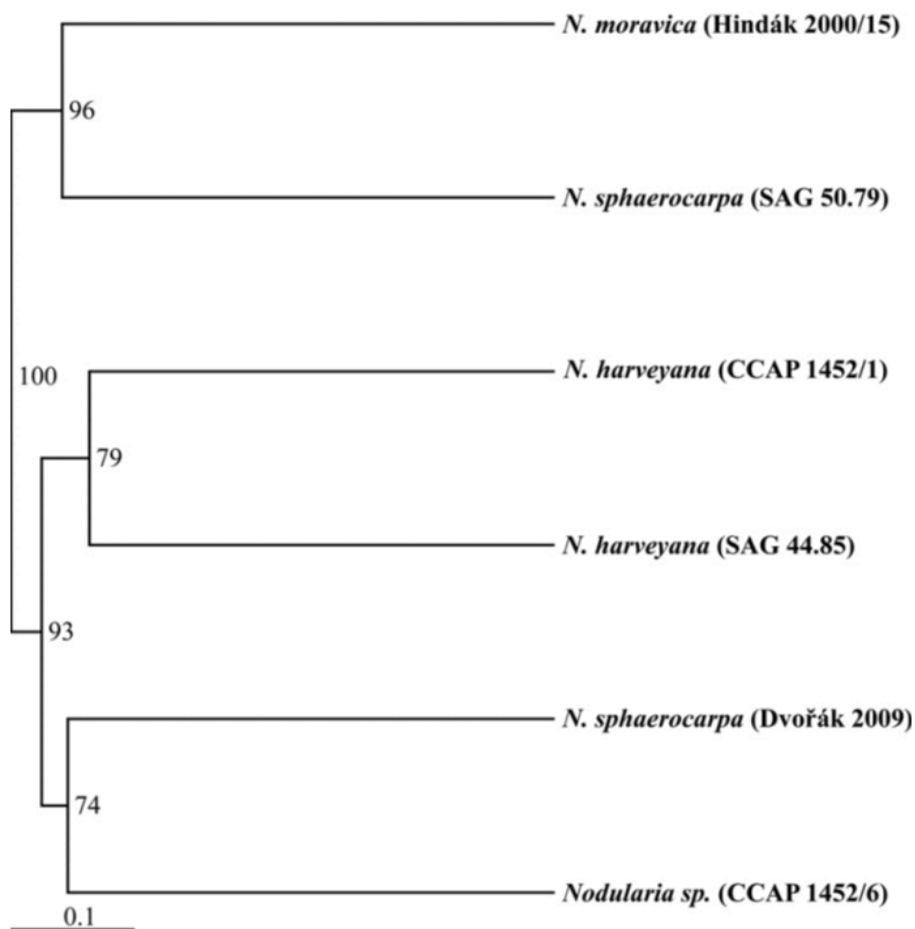


Fig. 46. – UPGMA analysis dendrogram (Jaccard's similarity coefficient) based on 711 AFLP fragments. Significant values of bootstrap analysis are shown on branches.

*N. spumigena* and *N. sphaerocarpa* (Fig. 45). The *N. harveyana* clade included the strains CCAP 1452/1 and SAG 44.85 (*N. harveyana*) and strain CCAP 1452/6 (*Nodularia* sp.). There was not a high degree of similarity within the *N. harveyana* clade.

The second group is represented by *N. moravica*, *N. spumigena* and *N. sphaerocarpa* and its inner separation is supported by high bootstrap values (Fig. 45). The most dissimilar group inside this clade is *N. moravica*, which is separate from the *N. sphaerocarpa* and *N. spumigena* groups.

#### AFLP analysis

In total six *Nodularia* spp. strains were analysed using eleven AFLP primer combinations, which generated 711 unambiguously scored fragments, of which 99.4% were polymorphic. The statistical analysis (Fig. 46) supported the results of the 16S rRNA sequencing (Fig. 45). The only difference was the co-segregation of *Nodularia* sp. (CCAP 1452/6) strain together with *N. sphaerocarpa*. Nevertheless, the co-segregation of *N. moravica* and *N. sphaerocarpa* support the theory that *N. moravica* has diverged significantly from other *Nodularia* species. Moreover, *N. harveyana* is considered to be a monophyletic species clearly diagnosed both by molecular and morphological characters.

## Discussion

Cyanobacteria play a key role in the functioning of many ecosystems and because they produce toxins they are potentially harmful organisms. Despite their importance, however, many aspects of their biodiversity and ecology are poorly understood. Routine species identification, mostly using morphology-based classifications, may not provide sufficient taxonomic resolution as cyanobacteria with similar or identical morphology can differ significantly in their physiology. In recent years, the analysis of 16S rRNA gene sequences has demonstrated that the morphological classification of cyanobacteria in some cases corresponds to phylogenetically coherent taxa (Garcia-Pichel et al. 1996), whereas in other cases the traditional classification greatly underestimates extant diversity (Ferris et al. 1996). For example, in bacteriology, the tolerance and requirements for high salt concentrations and high temperatures are recognized as important phenotypic properties that are correlated with phylogeny (Imhoff et al. 1998).

The genus *Nodularia* consists of apoheterocytic nostocalean cyanobacteria, for which filament and cell morphology can be used for intraspecific taxonomy (e.g. Geitler 1932, Kondrateva 1968, Nordin & Stein 1980, Komárek et al. 1993). Altogether 28 species, varieties and forms were revised by Nordin & Stein (1980) and only *N. harveyana* and *N. spumigena* were considered as valid species. They hypothesized that the other morphological species may only be a result of adaptation to growth conditions, e.g. salinity and pH values, which are the most important factors influencing the distribution of *Nodularia*. Thus these authors do not consider cell and heterocyte dimensions and morphology in general to be reliable taxonomic characters.

However, hierarchical cluster analysis based on morphological data of five *Nodularia* strains clearly separated the species *N. sphaerocarpa*, *N. harveyana* and *N. moravica*. While *N. harveyana* differs in trichome width, shape and number of chained akinetes (2–4), *N. sphaerocarpa* forms spherical akinetes and has chains of high numbers of akinetes (Komárek et al. 1993). These features were probably overlooked by previous authors (Geitler 1932, Elenkin 1938, Starmach 1966, Kondrateva 1968, Bourrelly 1970, Nordin & Stein 1980). Similarly, *N. moravica* differs from both of the species mentioned above (Hindák et al. 2003) in terms of its morphology (vegetative cells, heterocytes and akinetes) and ecology.

The classification based on morphology accords with molecular data. *Nodularia harveyana* is clearly separated from other *Nodularia* species. Although the validity of *N. sphaerocarpa* is confirmed by molecular studies (Bolch et al. 1999, Laamanen et al. 2001, Lyra et al. 2005) it is heterogeneous. *Nodularia sphaerocarpa* (strain Dvořák 2009) belongs to the main cluster of *N. sphaerocarpa*, however, *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) is separated from this group and has a high similarity with *N. moravica*. An identical strain of *N. sphaerocarpa* from a thermal spring (strain PCC 7804; Dax, France) studied by Bolch et al. (1999) has the same dissimilarities in the nucleotide sequences of its *cpcBA-IGS* as *N. sphaerocarpa*. However, the position of strain PCC 7804 is closer to *N. sphaerocarpa* than the other species included in his study.

*Nodularia moravica* was described by Hindák et al. (2003) and currently there are no molecular studies on this species. This author provided us with the type strain of *N. moravica* (Hindák 2000/15) for DNA analysis. The molecular, morphological and ecophysiological data support the claim of Hindák et al. (2003) that *N. moravica* differs significantly from

the other *Nodularia* species. The taxonomic position and/or determination of the thermophilic *N. sphaerocarpa* (SAG 50.79) strain remains unresolved and it is proposed to keep this strain as *Nodularia* sp.

A similar situation exists for *N. harveyana*, whose separation from other species was supported by morphology and 16S rRNA sequences. Strain *Nodularia* sp. CCAP 1452/6 belongs to the *N. harveyana* cluster, although it was not supported by AFLP profiles, due to the fact that the few strains tested could not be compared with database data. Based on the 16S rRNA sequencing results it is proposed to identify *Nodularia* sp. CCAP 1452/6 as *N. harveyana*.

Nordin & Stein (1980) studied *Nodularia* isolates kept in various salinity and pH gradients and concluded that although this genus can tolerate low salinities and pH values, it does not have the features of a “true freshwater” species. Warr et al. (1984) record a negative influence of increasing salinity on the growth of *N. harveyana*. The results presented here support the idea that halotolerance in *Nodularia* is species-specific. Unlike species isolated from marine environments (*N. harveyana*) those from freshwater (*N. sphaerocarpa*, *N. moravica*) grew better at low salinities. The highest range of salinities tolerated by species in the study was recorded for *N. harveyana* and *Nodularia* sp. and the narrowest for *N. sphaerocarpa* isolated from thermal water. However, its extremely narrow range compared to that for *N. sphaerocarpa* (strain Dvořák 2009) may be because of the age of the culture and the length of time it was maintained under laboratory conditions.

The dependence of the growth rate of genetically variable strains on salinity and species-specific halotolerance is also reported for *Spirulina* spp. by Nübel et al. (2000). Their data do not support the traditional opinion that a few closely related species of cyanobacteria with *Spirulina* morphology have a broad ecological euryvalence and ubiquitous distribution (Anagnostidis & Golubić 1966). Three of the isolates originated from hypersaline water and were similar in their high halotolerance and broad euryhalinity. Phylogenetic analysis placed them in a monophyletic cluster apart from all the other species (Nübel et al. 2000).

The ecophysiological characteristics of *Nodularia* strains studied support the hypothesis, that ecologically distinct organisms thriving in different habitats have different physiological capabilities and different evolutionary histories, which are reflected in their genetic divergence.

## Acknowledgements

We are grateful to Hedy J. Kling (Winnipeg, Canada) for improving our English, Tony Dixon for editing English of the final version of the paper, and an anonymous reviewer for improving the manuscript. This work was supported by grants GA CR no. 206/07/0115, Thomas Bata foundation, IGA UP Agency no. PrF/2010/001, MSM 6198959215 and NPGZ-M/03-023 from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

## Souhrn

Studie se zabývá morfologií, taxonomií a ekofyziologií sinic rodu *Nodularia*, který zahrnuje sladkovodní, brakické i mořské zástupce. Experimentální práce spočívala v hodnocení morfologické variability a růstových parametrů v gradientu salinity. Ekofyziologické a morfologické charakteristiky velmi dobře korespondují s výsledky molekulárních metod (16S rRNA, AFLP) a mohou vysvětlit rozdělení bentických druhů rodu *Nodularia* na dva sladkovodní druhy (*N. sphaerocarpa* a *N. moravica*) a jeden mořský (*N. harveyana*).

## References

- Anagnostidis K. & Golubić S. (1966): Über die ökologie einiger *Spirulina*-Arten. – *Nova Hedwigia* 11: 309–335.
- Bolch C. J. S., 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: 339–355.
- Bold H. C. (1949): The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. – *Bull. Torrey Bot. Club* 76: 101–108.
- Bourrelly P. (1970): Les algues d'eau douce. – Boubée, Paris.
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. – *Focus* 12: 13–15.
- Drummond A. J. & Rambaut A. (2007): BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. – *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Elenkin A. A. (1938): Monographia algarum cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum. – *Sumptibus Academiae Scientiarum URSS, Leningrad*.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. – *Evolution* 39: 783–791.
- Ferris M. J., Riff-Roberts A. L., Kopczynski E. D., Bateson M. M. & Ward D. M. (1996): Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. – *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1045–1050.
- 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: Rabenhorst L. (ed.), *Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, Vol. 14, p. 673–1056, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Hindák F., Šmarda J. & Komárek J. (2003): *Nodularia moravica* spec. nova, a new benthic freshwater nostocalean species (Cyanophyta/Cyanobacterial/Cyanoprokaryota). – *Algol. Stud.* 109: 241–253.
- Hintze J. (2006): NCSS, PASS and GESS. – Number cruncher statistical system, Kaysville, Utah, URL: [http://www.ncss.com].
- Imhoff J. F., Süling J. & Petri R. (1998): Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1129–1143.
- Kaštovský J., Hauer T., Komárek J. & Skácelová O. (2010): The list of cyanobacterial species of the Czech Republic to the end of 2009. – *Fottea* 10: 245–249.
- Kitner M., Lebeda A., Doležalová I., Maras M., Křístková E., Beharav A., Nevo E., Pavlíček T. & Meglic V. (2008): AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle East countries. – *Isr. J. Plant Sci.* 56: 185–193.
- Komárek J., Hübel M., Hübel H. & Šmarda J. (1993): The *Nodularia* studies. 2. Taxonomy. – *Algol. Stud.* 68: 1–25.
- Kondrateva N. V. (1968): Sin' o zeleni vodorostli: *Cyanophyta* [Blue-green algae: *Cyanophyta*]. – *Vid. Naukova dumka, Kiev*.
- Laamanen M. J., Gugger M. F., Lehtimäki J. M., Haukka K. & Sivonen K. (2001): Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (Cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. – *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4638–4647.
- Lyra C., Laamanen M., Lehtimäki J. M., Surakka A. & Sivonen K. (2005): Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 555–568.
- Nordin R. N. & Stein J. R. (1980): Taxonomic revision of *Nodularia* (Cyanophyceae/Cyanobacteria). – *Can. J. Bot.* 58: 1211–1224.
- Nübel U., Garcia-Pichel F. & Muyzer G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. – *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327–3332.
- Nübel U., Garcia-Pichel F. & Muyzer G. (2000): The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1265–1277.
- Page R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. – *Computer Appl. Biosci.* 12: 357–358.
- Pavlíček A., Hrdá S. & Flegr J. (1999): FreeTree: Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness: application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. – *Fol. Biol.* 45: 97–99.

- Pouličková A., Hašler P. & Kitner M. (2004): Annual cycle of *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. & Kom. nature population. – Int. Rev. Hydrobiol. 89: 278–288.
- Starmach K. (1966): *Cyanophyta*. – Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- Swofford D. L. (2001): PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. – Sinauer, Sunderland.
- Špačková J., Hašler P., Štěpánková J. & Pouličková A. (2009): Seasonal succession of epipelagic algae: a case study on a mesotrophic pond in a temperate climate. – Fottea 9: 121–133.
- Vernon L. P. (1960): Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. – Anal. Chem. 32: 1144–1150.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – Nucl. Acids Res. 23: 4407–4414.
- Warr S. R. C., Reed R. H. & Stewart W. D. P. (1984): Physiological responses of *Nodularia harveyana* to osmotic stress. – Marine Biol. 79: 21–26.

Received 11 June 2010

Revision received 20 October 2010

Accepted 27 October 2010