

**MAGISTERSKÁ PRÁCE BIOLOGICKÉ FAKULTY  
JIHOČESKÉ UNIVERSITY**



**Variabilita kmenů *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales, Nostocaceae)  
ve střední Evropě a srovnání s kmeny z Antarktidy**

David Kaftan

1997

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jiří Komárek, DrSc.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury

Třeboň, 19. dubna 1997

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kaftan', is located in the bottom right corner of the page.

# Variabilita kmenů *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales, Nostocaceae) ve střední Evropě a srovnání s kmeny z Antarktidy

David Kaftan

Biologická fakulta, Jihočeská Universita

&

*Národní výzkumné centrum pro fotosyntézu a změny globálního klimatu*

Mikrobiologický ústav AV ČR, oddělení autotrofních mikroorganismů

**Abstrakt:** Presentovaná práce se zaměřila na taxonomickou revizi problematického zástupce kosmopolitního rodu, druh *Nostoc commune*, jehož ubikvitnost je zarážející, stejně tak jako jeho morfologická proměnlivost. Nacházen všude na světě, patří mezi sinice s nejrozšířenějším areálem vůbec. Již dlouhou dobu se ale nabízela možnost, že by mohlo jít o blízce příbuzné variety téhož druhu, ne-li zástupce odlišných druhů. Tento článek hledá řešení příbuznosti živého materiálu pocházejícího z několika lokalit v České kotlině (střední, západní a jižní Čechy) a pro získání obrazu variability v jiných geografických oblastech jsem zpracoval vzorky z antarktického Ostrova Krále Jiřího, reprezentující tak velmi vzdálený typ lokality s extrémními podmínkami. Studie se zabývá variabilitou ultrastruktury, kvalitativním i kvantitativním obsahem karotenoidů a mykosporinových aminokyselin, srovnáním elektroforetických paternů totálních proteinových extraktů a rozdíly aktivit PS II jednotlivých kmenů v závislosti na teplotě. Získané výsledky ukazují na validnost zařazení všech kmenů do druhu *Nostoc commune*. I přesto, že se v detailech kolonie i vlastní buňky liší je zjištěná morfologická variabilita v mezích plasticity druhu. Vlastní diference tkví v tloušťce kolonie a v motivu uspořádání vláken v kolonii. Jde tu však nejspíše o projev adaptace na vnější prostředí. Mezi zkoumanými kmeny nebyly nalezeny rozdíly v kvalitativním obsahu karotenů ani xantofylových barviv. Pouze jejich absolutní množství se často měnilo, Především u jednoho z antarktických kmenů množství karotenoidů převyšovalo evropské vzorky i vzorky z Antarktidy až třikrát. Celkem bylo nalezeno osm druhů mykosporinových aminokyselin. Ze čtyř typů produkováných každým z kmenů (až na jeden kmen), sdílí antarktické kmeny se středoevropskými pouze dva. Elektroforéza proteinových extraktů taktéž přinesla důležité informace, i když její výsledky lze interpretovat jen s největší obezřetností. Ty ukazují především na odlišnosti ve složení fykobilisomů, respektive přítomnost a množství jednotlivých fykobiliproteinů. Rozdíly mezi kmeny v aktivitách PSII nebyly shledány relevantními, pouze nalezená optimální teplota pro primární reakce fotosyntézy svědčí o jejich adaptovanost na nízké teploty.

**Klíčová slova:** cyanobakteria, karotenoidy, MAA, morfologie, *Nostoc commune*, PSII, taxonomie, UV-B.

## Úvod

Vznik prvních prokaryot spadá do období těsně po  $3.8 \cdot 10^9$  let BP (Schopf 1987), jejich fosílie jsou dokládány nálezy ve vůbec nejstarších horninách. První struktury podobné sinicovým koloniím, takzvaným stromatolitům, vyrůstaly v zátokách tehdejších moří a jsou datovány do poloviny archeanu ( $3.8 - 2.6 \cdot 10^9$  let BP) (Campbell 1982, 1983), aby v dalším věku (proterozoikum,  $2.6 - 0.58 \cdot 10^9$  let BP) bakteriální oxyfototrofové zcela ovládli planetu. Koncem „éry sinic“ (Schopf et Walter 1982) se na Zemi vyskytovaly všechny organizační typy známé z recentní doby, včetně druhů schopných asimilovat vzdušný kyslík v kyslíkaté atmosféře, známých jak heterocystózní skupina (monofyletická skupina sinic zahrnující řády nostocales a stigonematales) (Lachance 1981, Castenholz 1989, Wilmotte et al. 1993, Wilmotte et al. 1994, Nelissen et al. 1995). Skupina nostokálních sinic tedy patří k relativně nejmladším v rámci cyanobakteriální divergence (Wilmotte 1995).

Rod *Nostoc* samotný je dobře a jasně ohraničen (Mollenhauer 1988). Vyrůstá v mikro- i makroskopické kolonie. Sférické až oválné buňky tvoří uniseriální vlákna, buněčné dělení probíhá pouze v jedné rovině a to všude se stejnou frekvencí, netvoří se takzvané meristematické zóny. Vegetativní buňka na jednom konci hormogonia se přeměňuje v heterocyt, ten se také vyvíjí seriálně na zralém vlákně, vždy po určitém, pro druh specifickém, pevně daném počtu vegetativních buněk. Diferenciace heterocytů je závislá na dostupnosti dusíku, nemusí k ní tedy dojít

v prostředí bohatém na dusíkaté látky. Akinety, pokud jsou přítomny, se vytváří apoheterocyticky, to jest odstředivě směrem k terminálním metamerickým heterocytům. Jak diferenciace akinet tak i heterocytů je podřízena specifickým procesům založeným na polárním efektu transkripce genů (Damerval et al. 1991, Houmard 1994), pro vláknité sinice charakteristickým. Z hlediska fotoaklimace patří rod *Nostoc* do skupiny II (Houmard 1995), je schopný reagovat na změny světelných podmínek pouze regulací syntézy fykoerytrinu. Zástupci rodu *Nostoc* obývají nejrůznější biotopy - od litorálu jezer, bentosu řek až po povrchy skal nebo půd. Společnou charakteristikou jim jsou komplikované životní cykly. Jsou také velmi citlivé na znečištění a vyskytují se pouze ve sladkých vodách. Zkoumaný *Nostoc commune* je typovým druhem rodu. Sinice tvoří makroskopické kolonie, jež nabývají tvarů oušek i jiných laločnatých útvarů, v ideálních podmínkách dorůstají i do stogramových hmotností (Mollenhauer, ústní komunikace). Zachovávají si schopnost tvorby heterocytů i akinet. Jeho geografické rozšíření je kosmopolitní, je nacházen od vysoké arktidy po Antarktidu. Vyskytuje se takřka všude, kde jsou pro něj vhodné podmínky - pro pomalý růst především v místech s nízkým kompetičním tlakem. Roste na vápenitých (nejčastěji), ale i na granitických podkladech.

Za pomoci pouze srovnávací morfologie již nelze pokrýt potřeby moderní taxonomie, ta si klade za cíl obsáhnout veškeré dostupné metody. V minulosti byla s úspěchem použita izoenzymová analýza jako nástroj k řešení vztahů lokálních populací (Klein et al. 1973, Schenk et al. 1973), jako pomocná metoda se osvědčila i elektroforéza buněčných proteinů (Derbyshire et Whitton 1968, Palinska et Krumbein 1995, Rippka ústní sdělení). Chemické látky, jejichž přítomnost by sdružovala skupiny sinic je produkující (jde hlavně o sekundární metabolity, Hoffmann, ústní sdělení) jsou dalším potenciálním kritériem příbuznosti. U řas bylo tímto konceptem hledání specifických fotosyntetických pigmentů - mimo jiné, stávající systém chromofyt stojí i na těchto základech. Mykosporinové aminokyseliny jsou ve vodě rozpustné látky, které hrají významnou roli při ochraně proti ozáření v oblasti UV-B (Garcia-Pichel et al. 1993, Xiong et al. 1997). U vyšších rostlin přebírají tuto ochrannou roli karotenoidy a také flavonové glykosidy (Middleton et Tekamura 1993, Day et al. 1994). Schopnost syntézy MAA je široce rozšířena nejen mezi sinicemi, přítomnost látek tohoto typu byla zaznamenána i u hub, zelených řas a dinoflagelátů (přehled viz Garcia-Pichel et Castenholz 1993). Existence omezeného počtu (třináct) těchto chemických látek spolu s jejich výskytem v mnoha kombinacích (Xiong et al. 1996) rovněž nabízí možnou aplikaci v taxonomii.

Hlavním úkolem této práce bylo ověřit hypotézu, že i u makro-morfologicky i ekologicky identických kmenů může být na základě netradičního souboru metod, jež byly ale odděleně ověřené jako platné a v taxonomii použitelné, rozpoznána variabilita studovaných kmenů a že je tuto zjištěnou variabilitu možné použít k hodnocení jejich příbuznosti. Pro tuto studii byly vybrány tři lokality v České republice představující tři typy geografických oblastí. K posouzení celkové možné plasticity druhu jsem zpracoval i dva kmeny z Ostrova Krále Jiřího v Jižních Šetlendách, zastupující tak velmi vzdálenou a izolovanou enklávu. Rod *Nostoc* z taxonomického hlediska náleží, společně s některými skupinami kokálních sinic, k nejproblematictějšímu taxonům sinic vůbec. Do dnešní doby bylo popsáno více než 200 druhů členěných do dvou podrodů (*Nostoc*, *Amorphonostoc*) (Komárek et Ananostidis 1989, Komárek 1993). Dosud bylo revidováno kolem 40 druhů, převážně snadno determinovatelných (některé vodní a epifytické). Většina ostatních typů (půdní, epilithické, epipelické) jsou stále otevřenou otázkou. Především mezi půdní typy nejsou vymezeny jasné hranice, složité životní cykly a značná morfologická proměnlivost znesnadňují taxonomickou práci s živým materiálem a ani v případě na první pohled dobře definovaného druhu, jakým je *Nostoc commune*, nebylo a ještě dlouho nebude řečeno poslední slovo.

**Zkratky:** Chl - chlorofyl, DCMU - 3-(3,4 dichlorofenyl)- 1,1 dimethylurea, MAA - mykosporinové aminokyseliny, PAR - fotosynteticky aktivní záření (400-700 nm), PMSF - fenylmetylsulfonylfluorid, PSII - fotosystém II, UV-A - záření o vlnové délce 315-400 nm, UV-B - záření o vlnové délce 280-315 nm.

## Materiály a metody

### Vzorky sinic

Inhed po odběru byly kolonie sušeny ve stínu a při pokojové teplotě. Skladování suchých lupénkovitých stélek v papírových sáčcích ve tmě a suchu zajistilo, že v nezměněném stavu přetrvaly dlouhé období klidu. Vzhledem k obtížnosti kultivace těchto sinic jsem pro experimenty používal revitalizované kolonie, které takto prošly obdobím omezené dostupnosti vody; tuto hibernaci přežívají i opakovaně bez následků. Před započítím experimentů byly kolonie vždy rozvlhčeny živným médiem BG 11 (Stanier et al. 1971) a ponechány dvanáct hodin při 50  $\mu\text{E}$  PAR za pokojové teploty ve skleněných kádinkách revitalizovat. Kolonie byly pak vyňaty a osušeny po dobu pět minut na filtračním papíře. Kmeny použité v této studii jsou vyjmenovány v tabulce 1.

Kmen	Lokalita	Detaily	Datum sběru
Jižní Čechy	České Budějovice	kolonie rostoucí při kraji cesty při betonovém obrubníku	5.6.1996
Střední Čechy	Český Kras	dobře rostoucí kolonie na stezce (vápencový substrát)	24.4.1996
Západní Čechy	Slavkovský les	kolonie na panelové cestě	14.7.1996
Antarktida	Ostrov Krále Jiřího	poloostrov u polární stanice Arctowski	12.1.1996
Antarktida	Ostrov Krále Jiřího	nedaleko čínské základny	8.2.1996

Tabulka 1. Seznam kmenů použitých v práci

### Analýza pigmentů a mykosporinových aminokyselin

Od každého vzorku jsem navázil 200 mg rozvlhčených kolonií a roztřel s mořským pískem v 1.5 ml 90 % vodném roztoku acetonu s 1 mg uhličitanovo-hořečnatým zásaditým pufrům. Takto získané extrakty jsem centrifugoval při 4.000 ot.  $\text{min}^{-1}$  po dobu 10 minut. Supernatant byl poté odpipetován a doplněn na 4 ml 90 % acetonem. Dále byly roztoky pigmentů analyzovány na kapalinovém chromatografu Beckman se dvěma čerpadly typu 114M a programátorem gradientu Beckman 420. Elutant byl separován kolonou Altech non-encapped Spherisorb ODS-1 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 25 cm) a detekován diodovým polem Waters 900. Extrakce i analýza probíhaly při laboratorní teplotě, vlastní chromatografická analýza pak při tlaku 12 MPa a s rychlostí průtoku 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Mobilní fázi byla směs acetonitril-metanol-0.1 M Tris HCl pufr, pH 8.0 v poměru 75:12:4 (Gilmore et Yamamoto 1991).

Pro detekci MAA jsem použil extrakce v 70 % metanolu při 45 °C po dobu 2.5 hodiny. Mobilní fázi použitou při analýze byla 0.2 % kyselina octová a 4 % vodný roztok metanolu (Xiong et al. 1997). Pro separaci byla použita kolona Ultrasphere ODS (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 25 cm), řídicí jednotkou byl Beckman/Altex 334 HPLC.

Obsah celkových karotenoidů v acetonových extraktech i in vivo absorbních spekter byl stanovován v dvoupaprskovém spektrofotometru Shimadzu UV 2000.

### Elektroforéza totálních proteinů

1 g rozvlhčených kolonií jsem v třetí misce roztřel s 3,1 ml pufru (25 mM Tris, pH 7,5, 1 mM kyselina kapronová, 1 mM aminobenzamidin, 100  $\mu\text{M}$  PMSF), poté 6 minut drtil s balotinou velikosti 12, s přídatkem 2 ml pufru. Homogenát jsem pak přefiltroval přes síť s oky  $\varnothing$  40  $\mu\text{m}$  a spláchl 1 ml pufru. Zbytky buněčných stěn, které prošly síťkou jsem odcentrifugoval (4 minuty při 4.000 ot.  $\text{min}^{-1}$ ). Tuto suspenzi jsem zředil pětkrát a proteiny v ní rozpuštěné jsem zdenaturoval 80 % acetonem. Konečnou fázi separace byla centrifugace (5 minut při 5.000 ot.  $\text{min}^{-1}$ ), po které byl odstraněn supernatant, obsahující lipidické frakce. Posléze následovala 10-ti minutová relaxace při -20 °C, naředění proteinů na obsah 3  $\mu\text{g}$  chl-a na vzorek a opět centrifugace (10 minut při 6.000 ot.  $\text{min}^{-1}$ ). Poté jsem vzorky zbavil acetonu vyfoukáním dusíkem. Usazené bílkoviny jsem rozpustil v 12  $\mu\text{l}$  resuspendačního pufru (150 mM Tris/HCl, pH 6.8, 1 M sacharóza, 5

% SDS, 5 % dithiothreitol) (Komenda & Masojídek 1995), pak ponechal 1 hodinu relaxovat. Pro vlastní elektroforézu jsem použil denaturující polyakrylamidový gel se 7 M močovinou o lineárním hustotním gradientu 12-20 % (Laemmli 1970). Gely jsem barvil Coomassie blue po dobu 12 hodin.

### **Elektronová mikroskopie**

Rozvlhčené kolonie jsem fixoval 2.5 % glutaraldehydem ve 0.2 M fosfátovém pufru, pH 7.2 po dobu 12 hodin při 10 °C. Pak vzorky prošly trojnásobným promýváním v promývacím pufru (0,1 M fosfátový pufru, 0.02 M glukosa), vždy po půl hodině při 10 °C. Po následné 2 hodinové post-fixaci v 2 % OsO<sub>4</sub> ve fosfátovém pufru byly vzorky opět třikrát promývány ve fosfátovém promývacím pufru. Pak prošly sestupnou acetonovou odvodňovací řadou (15, 25, 35, 50, 70, 80, 90, 100 %), s periodou výměny 15 minut. Poté jsem převedl fixovaný a odvodněný materiál do nízko-viskózní pryskyřice spurr (Spurr 1969). Ultratenké řezy jsem připravil na ultramikrotonu REICHERT-JUNG Ultracut E, na skleněném lánaném noži. Řezy jsem zachycoval na měděných hexagonálních sítkách a pak stínoval uranyl acetátem po dobu 15 minut, pak omýval redestilovanou vodou. Barvení citrátem olova pak trvalo 30 minut, po kterém následovalo opětovné promytí redestilovanou vodou a sítky s řezy byly poté osušeny při laboratorní teplotě. Takto připravené vzorky jsem prohlížel pomocí transmisního elektronového mikroskopu PHILIPS-420 při urychlovacím napětí 60 kV.

### **Světelná mikroskopie**

Pro rutinní práci a měření rozměrů buněk jsem používal světelný mikroskop Zeiss - Docuval osazený fázovým a Nomarskiho interferenčním kontrastem a s GF-planapochromatickými objektivy. Mikrofotografie získané pomocí mikroskopu Nikon Labophot-2 a binokulární lupy Nikon pak sloužily jako podklad a dokumentace pro detailnější studie. Použitým fotografickým médiem byl Fujichrome 100DIN a BW Fopaman 100DIN a BW Fopaman 50DIN.

### **Měření indukované fluorescence a rychlosti vývoje kyslíku**

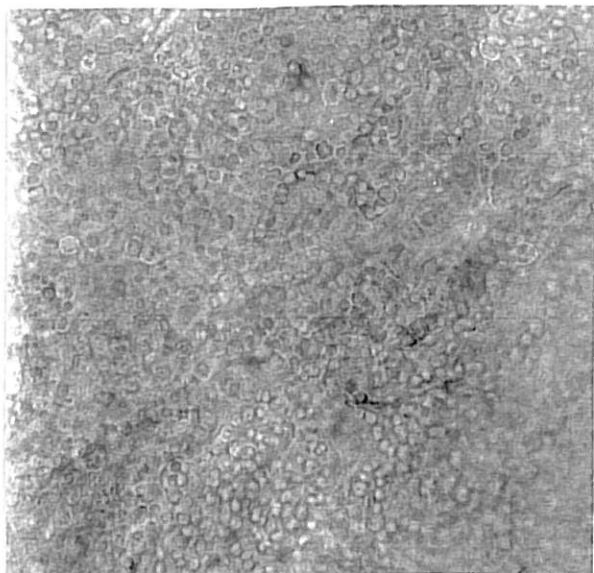
Fluorescenční odpověď fotosystému II bez aplikace DCMU jsem měřil dvoumodulačním fluorimetrem (Nedbal et Trtílek 1995). Přístroj dovoluje uživatelem definované časování jednotlivých událostí (záblesk, měření). Dva 100 kHz A/D převodníky umožňují měření signálů každých 10 μs, dvojice měření následujících těsně po sobě může být rozdělena minimálně 100 ns. V celém systému byla kontrolována teplota podle potřeby (2-30 °C).

Produkce kyslíku byla zjištěna měřením v koncentrační Clarkově elektrodě při kontrolované teplotě 2-30 °C a při světle 25-1000 μE PAR zajišťovaným dvěma poli světlo emitujících diod (LED) HLMP8104.

## **Výsledky**

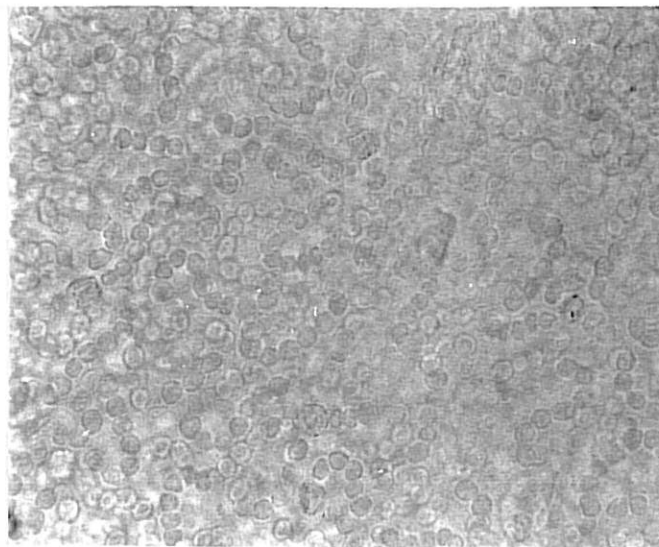
### **Morfologie a ultrastruktura**

Kolonie všech zkoumaných kmenů se v makroskopické struktuře nelišily, pouze barva odlišovala jednoznačně antarktické typy na základě jejich velmi tmavé pigmentace. Tloušťka stélky se různí podle toho, je-li již překryta jiným svým lupenitým výběžkem, nebo je vystavená přímo povětrnostním podmínkám. Vlastní kolonie sestává, kromě vlastních vláken sinice, z muko- a glykopolsacharidů a jim příbuzných látek sekretovaných živými buňkami. Mimo ty jsou v kolonii akcesoricky přítomny i buňky mrtvé. Nosná gelovitá substance je pokryta takzvanou kůrou (kortex), jež může být různě silná. Kortex je periferní část kolonie, obvykle silněji pigmentovaná extracelulárními barvivými sinic (například scytoneminem). V této oblasti jsou vlákna uspořádána do několika vrstev tak, aby vznikl zápoj s funkcí filtru. Každé má zde i svůj slizový obal konzistence odlišné od zbytku kolonie (soudě dle rozdílného indexu lomu), do něhož vlákno vylučuje množství barviva.



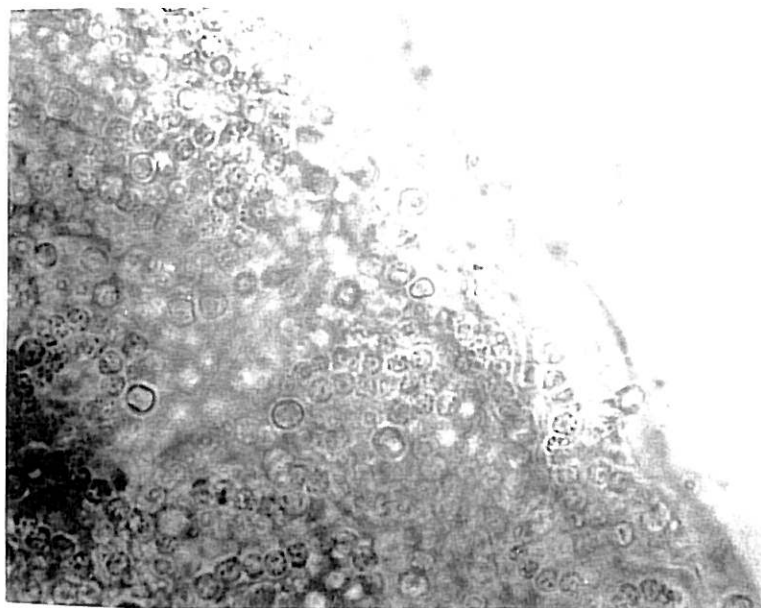
20  $\mu\text{m}$  —

**a**



20  $\mu\text{m}$  —

**b**



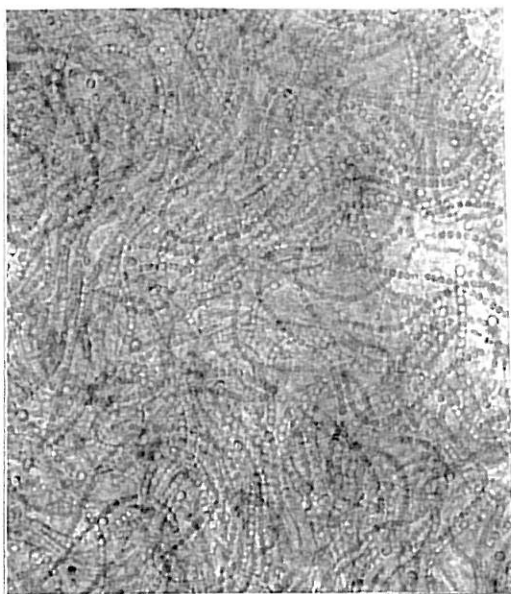
10  $\mu\text{m}$  —

**c**

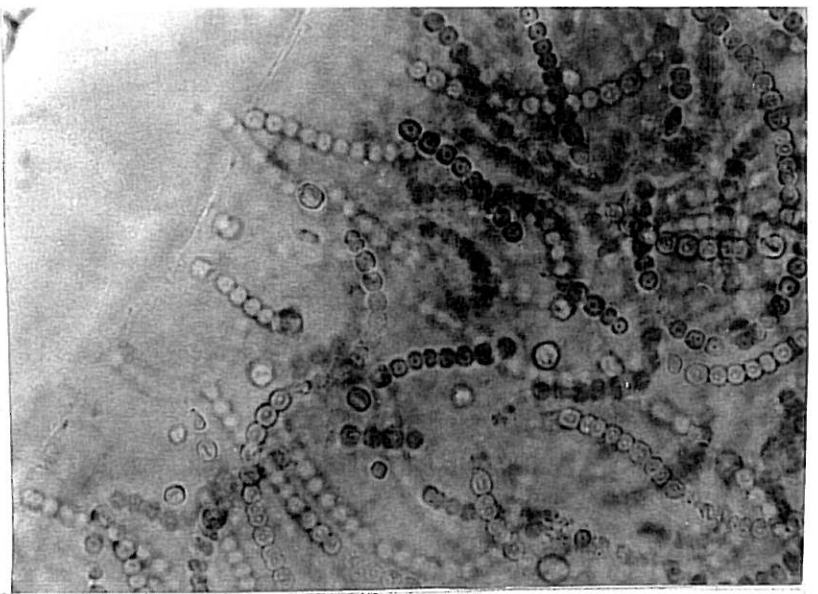
Obrázek 1. *Nostoc commune*,  
kmen 5. (antarktický).

Počet vrstev vláken v kortex a tím i její tloušťka závisí na vnějších podmínkách. Způsob uložení vláken je závislý na jejich hustotě a průměrné délce, tyto charakteristiky se ovšem mění s vývojovým stádiem. Ve zralé kolonii dochází ale jen k minimálním změnám, stagnuje v jednom období vývojové fáze. Tehdy se jen zřídka mění procentuální zastoupení heterocytů, někdy i akinet - pak se i rozpadá mateřské vlákno. Nová vlákna se v dospělé kolonii tvoří jen za zvláštních podmínek (většinou v případě vytváření hormogonií, nebo v období růstu kolonie).

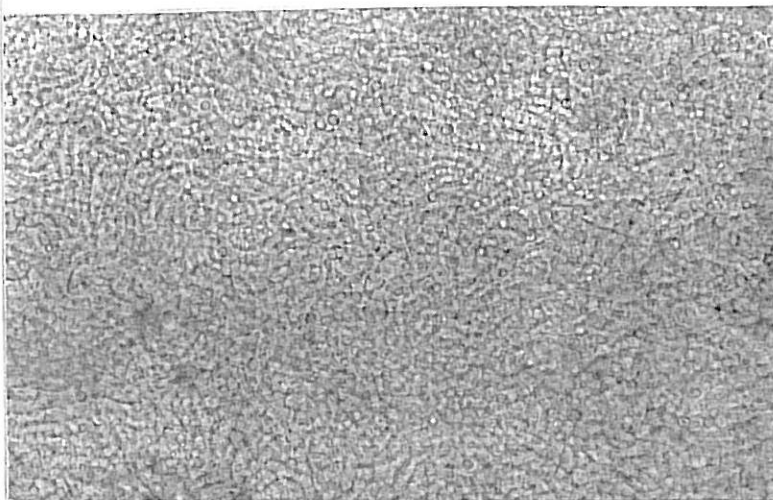
Zkoumané vzorky lze rozdělit na tři typy. Do první skupiny zařazují izoláty ze středních a jižních Čech, se slabou kortex, ve zralém stavu jsou vlákna v kolonii nepřiliš hustě uspořádána. Maximálně pět vláken leží nad sebou, průměrný počet buněk mezi heterocyty je 41. Tloušťka listu kolonie se pohybuje kolem 100  $\mu\text{m}$ . Druhá skupina je reprezentována izolátem ze západních Čech. Kolonie jsou v průřezu tenčí (50  $\mu\text{m}$ ), s vlákny maximálně ve čtyřech vrstvách nad sebou (obvykle tři), vlákna jsou těsněji uložena. Průměrný počet buněk mezi heterocyty je 41, jako u prvního typu. Kolonie nemají kortex. Třetím typem jsou kmene z Antarktidy, s velmi silnou stélkou 150  $\mu\text{m}$ , silně pigmentovanou. Celá kolonie je velmi heterogenní co se týče délky vláken (počtu jejich buněk) i co do počtu zaznamenaných vývojových stádií, přítomných v jediný oka-



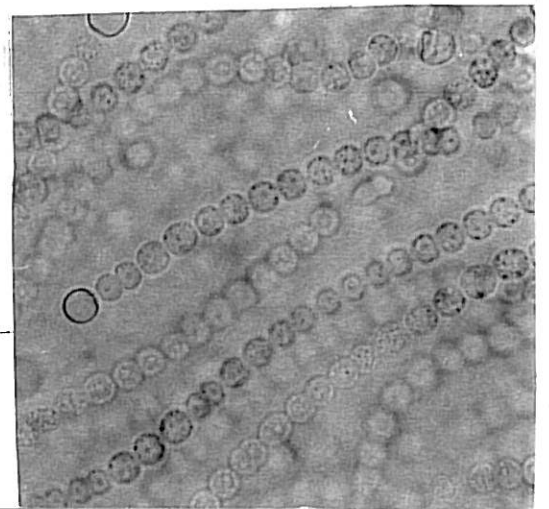
**a** 20 µm —



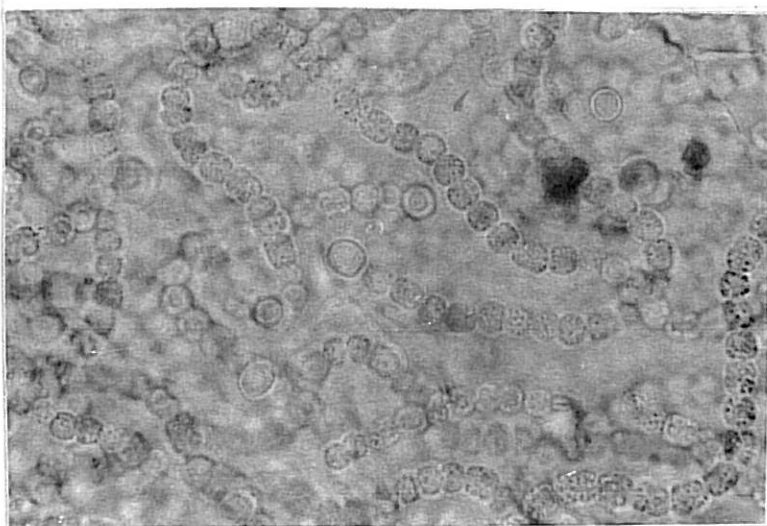
**b** 20 µm —



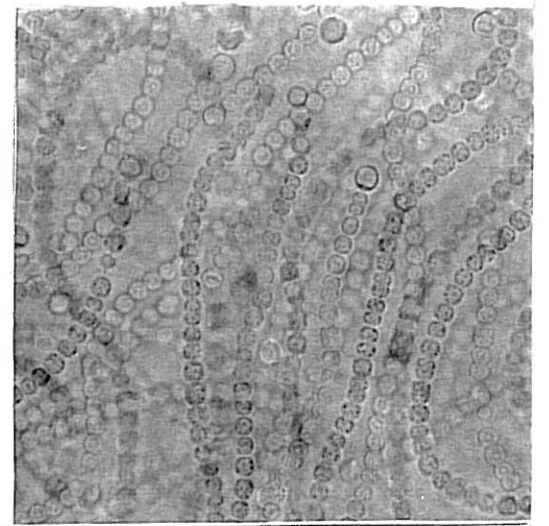
**c** 20 µm —



**d** 10 µm —



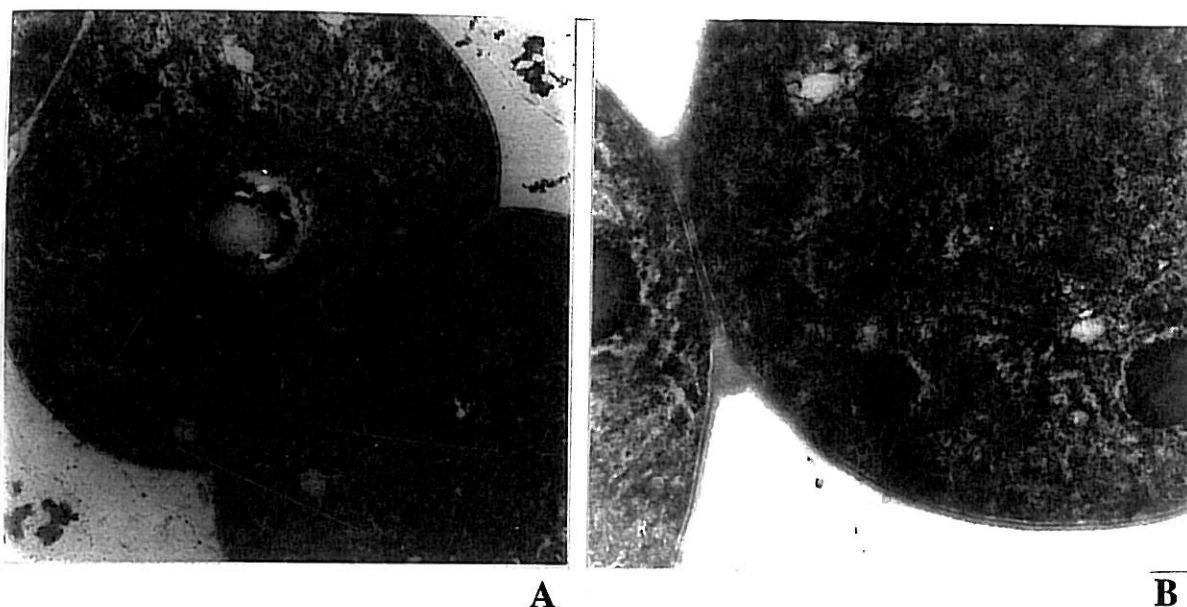
**e** 10 µm —



**f** 20 µm —

Obrázek 2. *Nostoc commune*, a, b, d - kmen z jižních Čech, c, e, f - kmen ze Slavkovského lesa

mžik v téže kolonii. Je to velmi dynamický systém, navíc obsahující symbionty - drobné rozsivky i sinice (*Chroococciopsis* sp.), celé kolonie antarktických zástupců svou stavbou přesně odpovídají kortex středoevropských.



Obrázek 3. *Nostoc commune*, ultrastruktura trichomu, A- zvětšeno 19.000 krát, B- zvětšeno 35.000 krát

Předmětem zkoumání elektronové mikroskopie byl především způsob uložení tylakoidů. Ten byl shledán identickým u všech zkoumaných sinic. Tylakoidy byly pozorovány na elektronmikroskopických snímcích rozptýlené po celém objemu buněk, jak je to u nostokálních sinic obvyklé (Komárek et Anagnostidis 1989). Jsou místně nahuštěné, někdy uspořádány ve zdánlivě pseudo-radiální symetrii, ve většině případů ale nerovnoměrně rozmístěny na periférii buňky. Vysloveně parietální tylakoidální vzorek nebyl pozorován. U převážné většiny aktivních buněk jsem zaznamenal nejvýše jeden centrální karboxysom a několik inkluzí zásobních látek. Jak polyfosfátová zrna tak i inkluze cyanofycinu byla naakumulovaná v období relativní hojnosti; tehdy, když stoupnou teploty nad prahovou hodnotu a voda začne být dostupná nejen ve formě vzdušné vlhkosti. Přítomnost asimilátů zjištěná u všech organismů ukazuje na jejich připravenost odolávat nepříznivým podmínkám.

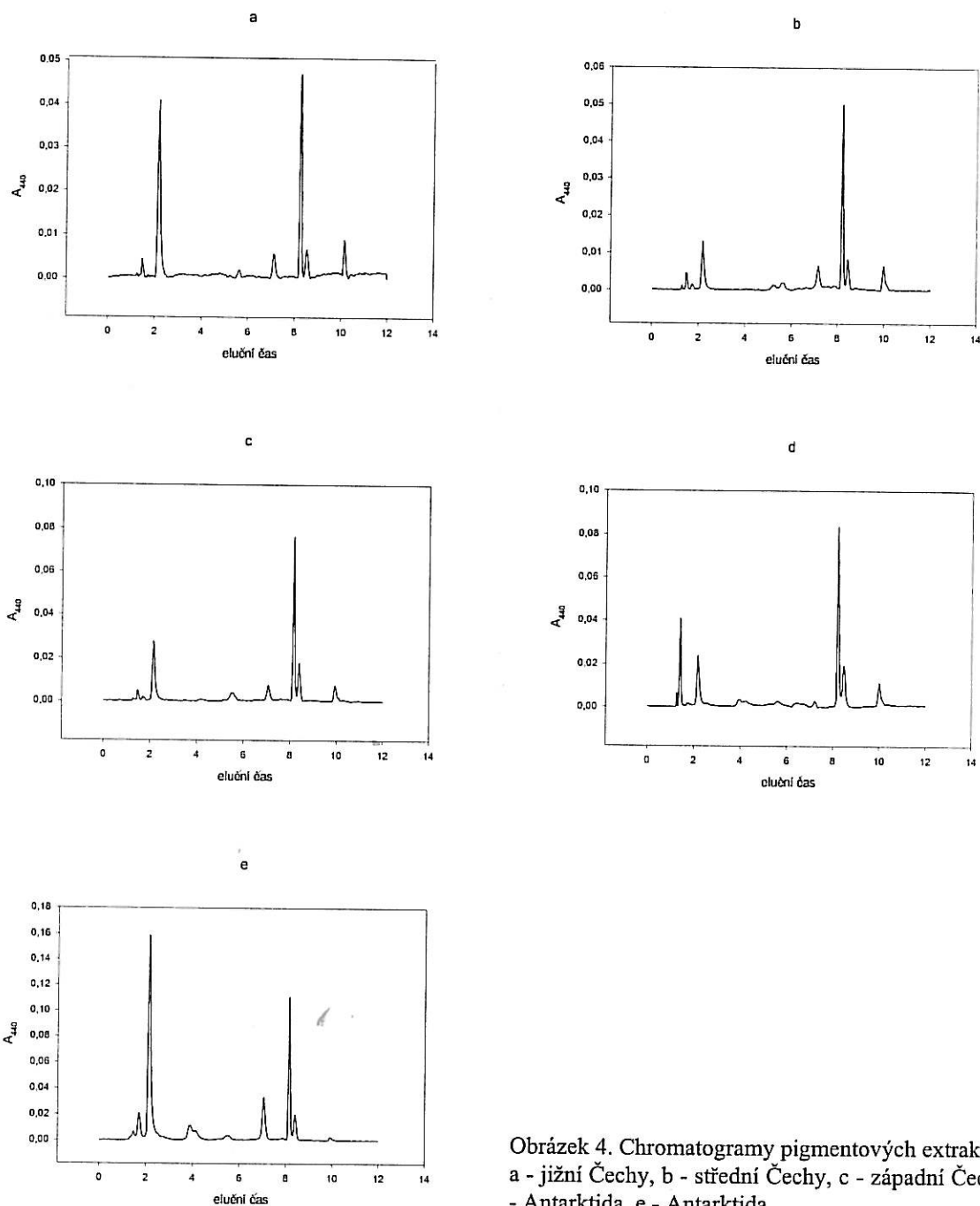
### Pigmenty

Všechny kmene obsahovaly shodné karoteny a xantofyly, pouze jejich absolutní množství se měnilo, jak je patrné z chromatogramů na obrázku 4. V extrémním případě, u antarktického kmene (kmen č. 5) suma karotenoidů převyšovala ostatní vzorky až třikrát (tabulka 2.). Tento organismus vykazoval také neobvykle vysoký obsah chlorofylu-a, zřejmě v reakci na sníženou koncentraci světla; většina ho byla absorbována právě produkovanými xantofyly. Nalezené pigmenty se shodovaly s daty uváděnými v již dříve publikovaných pracích (Garcia-Pichel et Castenholz 1991, Vincent et Quesada 1994, Quesada 1995, Castenholz 1995). Kromě scytoneminu, extracelulárního pigmentu široce rozšířeného mezi vláknitými sinicemi jsem zaznamenal i celou řadu unikátních karotenoidů (obrázek 9). Další zkoumání vyžaduje například přítomnost okenu, což je karotenoid běžně se vyskytující v purpurových bakteriích.

Kmen	1	2	3	4	5
Σ karotenoidů [ $\mu\text{g. l}^{-1}$ ]	4.04	11.69	9.66	7.93	29.29
Chl a [ $\mu\text{g. l}^{-1}$ ]	19.41	31.76	40.03	23.1	57.27

Tabulka 2. Obsah všech karotenoidů a chlorofylu-a ve zkoumaných kmenech

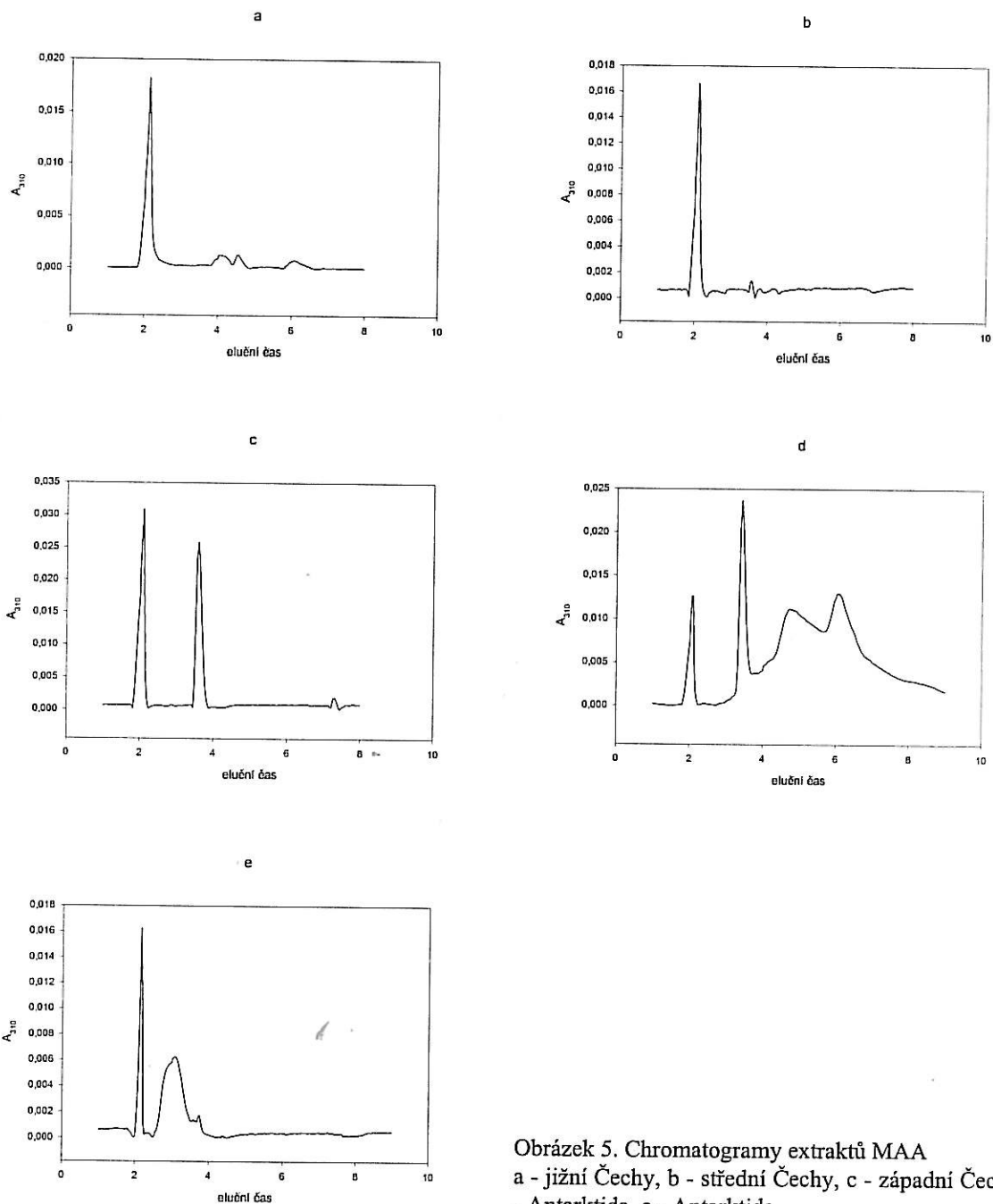




Obrázek 4. Chromatogramy pigmentových extraktů  
 a - jižní Čechy, b - střední Čechy, c - západní Čechy, d - Antarktida, e - Antarktida

### Mykosporinové aminokyseliny

U zkoumaných vzorků jsem našel celkem osm typů MAA, přičemž každý z kmenů obsahoval pouze čtyři typy, kmen z Českého Krasu pouze tři. Dva typy (typ VI a VII) sdílí všechny studované izoláty. Aminokyselinu palythin, která byla izolována z *N. commune* pocházejícího z Číny (Scherer et al. 1988) jsem detekoval pouze v jednom vzorku z Antarktidy (tabulka 3.). Populace sinic ze střední Evropy tvoří na základě získaných informací skupinu odlišující se od dvou kmenů z Ostrova Krále Jiřího. V obou skupinách sdílí kmeny navzájem po třech typech aminokyselin, zároveň se v přítomnosti výjimečných MAA obě skupiny nepřekrývají. Podle naměřených dat je zřejmé, že maxima absorpčních spekter MAA produkovaných antarktickými kmeny se vyskytují

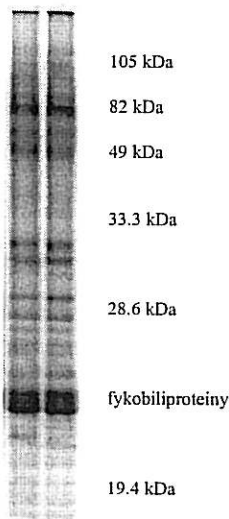


Obrázek 5. Chromatogramy extraktů MAA  
 a - jižní Čechy, b - střední Čechy, c - západní Čechy, d - Antarktida, e - Antarktida

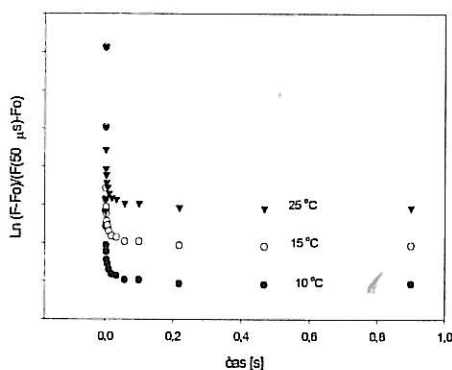
převážně v krátkovlnné oblasti UV-B, to jest pod 300 nm, zatímco MAA sinic pocházející z České kotliny absorbují v oblasti UV-B až krátkovlnné UV-A (v tomto případě od 300-330 nm). To se jeví jako prostředek odstínění záření kritických vlnových délek, jehož množství je v oblastech Antarktidy vyšší než v Evropě (Madronich 1992).

MAA Kmen	I shinorin	II porphyra	III asterina	IV palythin	V mycosporin- Gly	VI	VII	IX
Jižní Čechy					•	•	•	•
Střední Čechy						•	•	•
Západní Čechy			•		•	•	•	
Antarktida		•		•		•	•	
Antarktida	•	•				•	•	

Tabulka 3. Mycosporinové aminokyseliny nalezené ve studovaných kmenech



a b  
Obrázek 6. Porovnání dvou elektroforetických paternů totálních proteinových extraktů sinice *Nostoc commune* z jižních Čech, a-dobře vegetující kolonie, b-organismus v dormantním stavu, vyňatý z ledu



Obrázek 7. Fluorescenční odpověď na single-turnover saturační záblesk kmene z Antarktidy

## Diskuse

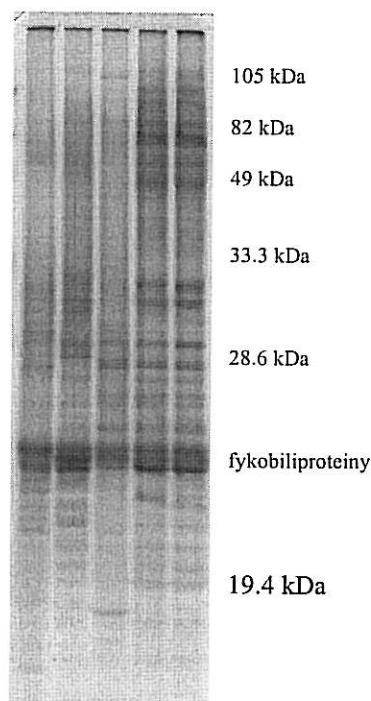
Zaměření se na objekt ve smyslu jediného vlákna a pozorování osudů tohoto jedince je konceptem, který dovolí odhlédnout od veškerého irelevantního šumu, který tolikrát zastiňuje podstatu toho, co dnes chápeme jako diagnózu druhu. Víme, že sdružování vláken do svazků, produkce extracelulárních slizů, stejně tak i chromatické adaptace (fotoaklimace) jsou reakcí na vnější podmínky, i když dosud známe jen několik takových receptorů, které jsou zodpovědné za patřičnou reakci (Houmard 1995). Mnoho charakteristik je tedy nesporně zavádějících. Pro hodnocení vztahů mezi populacemi sinic (druhy v úzkém slova smyslu) je nutné přihlédnout i k historii jejich parentálních lokalit (Mollenhauer 1988). I charakter předešlých populací jednoznačně určuje budoucí tvář společenstva. To je přístup, který jsem uplatňoval při taxonomickém zpracování kmenů.

## Elektroforéza proteinů

Z analýzy elektroforéz proteinových extraktů vyplývá, že všechny vzorky (s výjimkou kmene z jižních a středních Čech) se navzájem liší, je třeba upozornit především na odlišnosti ve složení fykobilisomů, respektive přítomnost a množství jednotlivých fykobiliproteinů (obrázek 9). Interpretace ostatních rozdílů je příliš nejistá, a tak bude nezbytné hodnotit tuto zjištěnou diferenci jen jako podobnost či rozdílnost na základě celkového vzhledu elektroforézy. Porovnání vzorků elektroforetických proteinů z kmenu v aktivním stavu (s dostatkem vody a fotosyntetizující při 1500  $\mu\text{E}$  PAR a teplotě vzduchu 23  $^{\circ}\text{C}$ ) a organismu z téže populace odebraného z ledu uprostřed zimní sezóny (vyschlé kolonie, 15  $\mu\text{E}$  PAR, -10  $^{\circ}\text{C}$ ) ukazuje obrázek 6. Na základě takto použité metody lze konstatovat, že se oba vzorky (aktivní i dormantní) neliší. Rozdíly v expresi genů jako odraz určité části vývojového cyklu jsou pravděpodobně setřeny nebo je nelze tímto experimentem podchytit. Dále je zřejmé, že existuje velká podobnost mezi izoláty z jižních a středních Čech. Naproti tomu oba antarktické vzorky a vzorek ze západních Čech se liší nápadně jeden od druhého.

## Fotosyntéza

Zkoumané kmeny se nelišily významně v rychlosti produkce kyslíku. Dokonce i v závislosti rychlosti primárních procesů fotosyntézy na teplotě se středoevropské kmeny a kmeny z Antarktidy nelišily. Nalezené optimum 10  $^{\circ}\text{C}$  bylo zcela ve shodě s hodnotami předpokládanými na základě charakteristik stanovišť. Dekonvoluce křivky poklesu fluorescence ukázala tři exponenciální procesy. Nejrychlejší z nich reprezentující  $Q_a$  reoxidaci je na teplotě nezávislý, optimální teplota byla odvozena z třetí komponenty křivky - reoxidace plastochinonu (obrázek 7). Rychlost vývinu kyslíku byla taktéž největší při 10  $^{\circ}\text{C}$  ( $20\mu\text{M O}_2 \cdot \text{mM}(\text{chl-a})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

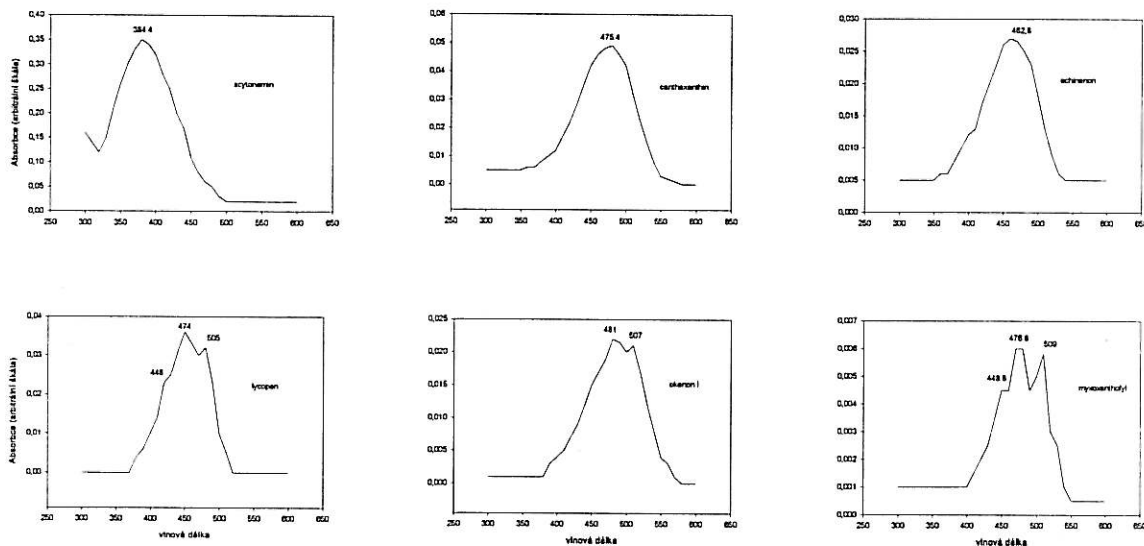


a b c d e

Obrázek 8. Elektroforéza proteinových extraktů pěti kmenů druhu *Nostoc commune*, a - Antarktida, b - Antarktida, c - západní Čechy, d - jižní Čechy, e - střední Čechy

Zařazení všech studovaných kmenů do druhu *N. commune* by bylo, určitým způsobem, přijetí koncepce široce pojatých druhů. Pak by bylo nutné přijmout hypotézu, že zjištěná morfologická variabilita je v mezích plasticity takto zpětně široce definovaného druhu. Není ale jisté, zda by byl *N. commune* původem z Čech schopen plodného růstu v antarktických podmínkách a to ve stejné „formě“ jako antarktické typy (to je předpoklad identity) a naopak. To vše ve smyslu zmíněné plasticity genotypu. Na základě zjištěných informací (absorpční spektra, MAA analýza, fotosyntéza) lze odpovědět pouze tolik, že by jistě přežil tamní podmínky, alespoň po několik sezón. Byl-li by však v dlouhodobém měřítku schopen odolat tlaku domácích, adaptovaných sinic, lze zjistit jen dlouhodobým manipulačním pokusem. Ale ani po dlouhotrvajícím pokusu nedostaneme jednoznačné výsledky svědčící ve prospěch trvalé a úspěšné koexistence. Pak se tedy ubíráme jiným směrem. Je obecně přijímáno tvrzení, že sinice jsou posly dávné minulosti, z dob, kdy byly doslova pány této planety si zachovaly mnohé vlastnosti, pro sinice (obecně, s mnoha výjimkami) typické, jako jsou odolnost proti nedostatku vody (Friedmann 1964, 1972, Golubič et al. 1981, Potts et Friedmann 1981) a odolnost vůči UV-B záření (Garcia-Pichel et al. 1993,

Garcia-Pichel et Castenholz. 1993, Castenholz 1995). Tyto prastaré klíčové inovace je staví do pozice průkopníků na stanovištích, kde se neuchytí mnohem agresivnější organismy, kupříkladu zelené řasy. Pak by si měli zachovat tak důležité metabolické pochody vedoucí kupříkladu k sekreci jakéhosi hypotetického primárního souboru MAA. Pod tlakem speciálních životních podmínek zůstaly v Antarktidě pouze ty populace *N. commune*, které jsou schopny odstínit světlo vlnových délek pro funkce organismu kritických (UV-B pod 300 nm), zatímco kmeny z Čech tuto výhodu nemají. Možnost, že by některé z produkovaných MAA mohly být přehlédnuty je málo pravděpodobná, protože MAA jsou přítomny v cytosolu i vázány na glykoproteiny slizu (Ehling-Schulz et al. 1995) neustále, i když v malých koncentracích (Xiong et al. 1996, 1997). Pozastaveníhodná variabilita v rámci kmenů z Čech ale ukazuje, že i na tak malém území, jakým je Česká republika existují (minimálně) dvě populace *N. commune*, které se liší ve schopnosti syntetizovat tyto chemické látky. O jejich metabolických drahách zatím nevíme nic. Snad později budeme moci rozhodnout, které z MAA jsou geneticky odvozenější a jaké jsou jejich prekurzory, je-li vytvoření takové genealogie možná. Na základě zjištěných dat se zdá, že si sinice spíše zachovaly schopnost reagovat na měnící se prostředí, než že by fakticky obsahovaly celý „produkční“ potenciál. Zmíněný potenciál však tkví ve schopnosti stavět na časem ověřených základech a s těmito základy tvořivě pracovat. Tyto procesy můžeme ale sledovat jen u těch znaků, které jsou pod selekčním tlakem. Na příkladu karotenoidů, které hrají důležitou roli při ochraně proti fotoinhibici (Hirschberg et Chamovitz 1995) lze dokumentovat jejich zjevně neutrální charakter. Ve všech kmenech jsem našel shodné karoteny a xantofyly, pouze jejich absolutní množství se měnilo, zřejmě opět v závislosti na předchozí historii izolátu. Nejsou prostředkem selekce v pozitivním smyslu, jejich nepřítomnost, tak jako chyba v zásadní struktuře fotosystému či ve funkci klíčového enzymu znamená pro organismus smrt.



Obrázek 9. Absorpční spektra některých karotenoidů extrahovaných ze sinice *Nostoc commune* - scytonemin, canthaxanthin, echinenon, lycopene, okenon, myxoxanthofyl.

Považujeme-li za jeden z důkazů na nichž stojí definice druhu absenci produkce akinet, aniž bychom doposud znali jeho molekulární pozadí, tak je tomu u druhu *N. pruniforme*, je pak nasnadě zvážení zjištěných výsledků analýzy MAA. Další použité metody nemají bohužel dostatečnou vypovídací hodnotu, aby jednoznačně rozřešily rozpory mezi fenotypovou podobností a genetickými rozdíly, jež uvedená práce našla. Zjištění struktury nukleoidu metodou barvení nukleových kyselin DAPI je jako taxonomické kritérium (Cepák et al. 1991, Cepák 1993) pro tuto práci nepoužitelná. Tak jako uložení tylakoidů je i struktura nukleoidu v odvozenějších skupinách sinic uniformní. Způsob uložení tylakoidů na tomto případě potvrdil použitelnost metody přinejmenším na mezidruhové úrovni. V budoucnu je třeba vzít v úvahu současné trendy v pojmání druhu u sinic založené na syntéze dat molekulárně biologických i fenotypických a ekologických (Wilmotte et Golubič 1991, Castenholz 1992, Wilmotte 1995). Jedině tento přístup může přinést tolik očekávané výsledky.

### Poděkování

Děkuji všem zaměstnancům Mikrobiologického ústavu, kteří mi při práci pomáhali a byli mi oporou v těžkých časech, především však Ladislavu Nedbalovi, Josefu Komendovi, Jiřímu Kopeckému a Ivanovi Šetlíkovi. Filipu Ledererovi děkuji za financování projektu (FRVŠ 0396). Vřelý dík patří též Janě Nebesářové za výuku metod elektronové mikroskopie. Svému školiteli Jiřímu Komárkovi děkuji za vzorky z Antarktidy a za připomínky k rukopisu.

### Literatura

- ✓ Campbell S. E. (1982): Precambrian endoliths discovered.- Nature, Vol. 299, 5882: 429-431
- ✓ - (1983): The modern distribution and geological history of calcium carbonate boring microorganisms. In Biomineralisation and Biological Metal Accumulation. Westbroek P. and Jong E. W. (eds). 99-104
- ✓ Castenholz R. W. (1989): Section 19, Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Stanley J. T. , Bryant M. P. , Pfennig N. and Holt J. G. (eds). Williams and Wilkins Co, Baltimore. Vol. 3: 1710-1806
- ✓ Castenholz R. W. (1992): Species usage, concept and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). J. Phycol. 28: 737-86

- ✓ Castenholz R. W. (1995): Adaptations to UV-radiation by Cyanobacteria: an overview. In 13th International Symposium on Cyanophyte Research, Frascati, Abstracts: p. 33
- ✓ Cepák V., Kováčik L. and Komárek J. (1991): DNA containing structures (nucleoids) in some cyanophytes/cyanobacteria as revealed by DAPI fluorescent staining. Arch. Hydrobiol./Algolog. Studies 64: 25-39
- ✓ Cepák V. (1993): Morphology of DNA containing structures (nucleoids) as a prospective character in cyanophyte taxonomy. J. Phycol. 29: 844-852
- ✓ Damerval T., Guglielmi G., Houmard J. and Marsac N. T. de (1991): Hormogonium differentiation in the cyanobacterium *Calothrix*: a photoregulated developmental process. Plan Cell 3: 191-201
- Day T. A., Howells W and Rice W. J. (1994): Ultraviolet absorption and epidermal transmittance spectra in foliage. Physiol. Plant. 92: 207-218
- ✓ Derbyshire E. and Whitton B. A. (1968): A disc electrophoretic study of proteins of blue-green algae. Phytochemistry 7: 1355-1360
- ✓ Ehling-Schulz M., Böhm G. A. and Schrerer S. (1995): UV A/B sunscreen pigment from *Nostoc commune*. In 13th International Symposium on Cyanophyte Research, Frascati, Abstracts: p. 48
- ✓ Friedmann E. I. (1964): Xerophytic algae in the Negev Desert.- Tenth Internat. Bot. Congr., Edinburgh, Abstracts: 290-291
- ✓ (1972): Ecology of lithophytic algal habitats in middle eastern and north american deserts. International Symposium.USSR, Leningrad, Abstracts: 182-185
- ✓ Garcia-Pichel F. and Castenholz R. W. (1991): Characterisation and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. J. Phycol. 27: 395-409
- ✓ Garcia-Pichel F. and Castenholz R. W. (1993): Occurrence of UV- absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. Applied and Environmental Microbiology 59: 163-169
- ✓ Garcia-Pichel F., Wingard C. E. and Castenholz R. W. (1993): Evidence regarding the sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp.. Applied and Environmental Microbiology 59: 170-176
- ✓ Gilmore A. M. and Yamamoto H. Y. (1991): Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C<sub>18</sub> high-performance liquid chromatographic column. J. Chromatography 543: 137-145
- ✓ Golubič S., Friedmann I. and Schneider J. (1981): The lithobionthic ecological niche, with special reference to microorganisms. J. Sed. Ptr. 51/2: 475-478
- ✓ Hirschberg J. and Chamovitz D. (1995): Carotenoids in cyanobacteria. In The molecular biology of cyanobacteria. Bryant D. A. (ed). Kluwer Academic Publishers. Dodrecht. Ch 18
- ✓ Houmard J. (1994): Gene transcription in filamentous cyanobacteria. Microbiol. 140: 433-441
- ✓ Houmard J. (1995): How do cyanobacteria perceive and adjust to their environment ? In Molecular ecology of Aquatic Microbes. Joint I. (ed). Springer Verlag, Berlin. Vol. G 38: 153-170
- ✓ Klein S., Chapman D. J. and Garber E. D. (1973): Chemotaxonomy of *Oscillatoria-Phormidium* complex. Biochem. Syst. 1: 173-177
- ✓ Komárek J. (1993): Cyanophyceae, Encyclopaedia of algal genera, in prep. (ed. B. Parker).
- ✓ Komárek J. and Anagnostidis K. (1989): Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. Arch. Hydrobiol./ Algolog. Studies 56: 247-345
- ✓ Komenda J. and Masojídek J. (1995): Functional and structural changes of the photosystem II complex induced by high irradiance in cyanobacterial cells. Eur. J. Biochem. 233: 677-682
- ✓ Lachance M. (1981): Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by deoxyribonucleic acid - deoxyribonucleic acid reassociation.
- ✓ Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

- ✓ Madronich S. (1992): Changes in biologically active UV radiation reaching the Earth's surface. In UV-B monitoring workshop: A review of the science and status of measuring and monitoring programs. Sobolev I. et al. eds. Washington. Ch 11
- ✓ Middleton E. M. and Tekamura A. H. (1993): The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol.* 103: 741-752
- ✓ Mollenhauer D. (1988): *Nostoc* species in the field. *Arch. Hydrobiol./ Algolog. Studies* 50-53: 315-326
- ✓ Nedbal L. and Trtílek M. (1995): Diffuse-light dual-modulation fluorometer: monitoring of electron transfer reactions in *Synechococcus elongatus* exposed to intermittent light. In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Mathis P. (ed). Vol. 5: 813-816.
- ✓ Nelisen B., Peer Y. Van de, Wilmotte A. and Wachter R. de (1995): An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 12(5):1166-1173
- ✓ Palinska K. A. and Krumbein W. E. (1995): The use of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of some cyanobacteria whole cell proteins and phycobilisomes in taxonomy. In 13th International Symposium on Cyanophyte Research, Frascati, Abstracts: p. 27
- ✓ Potts M. and Friedmann E. I. (1981): Effects of water stress on cryptoendolithic cyanobacteria from hot desert rocks. *Arch. Microbiol.* 130: 267-271
- ✓ Quesada A. (1995): Growth of antarctic cyanobacteria under ultraviolet radiation: UVA counteract UVB inhibition. *J. Phycol.* 31: 242-248
- ✓ Shenk H. E. A., Hofer I. and Metzner H. (1973): Malat-dehydrogenase Isoenzymbanden als potentielles chemotaxonomisches Kriterium für Cyanophyceen-Species. *Biochem. Syst.* 1: 179-184
- ✓ Scherer S, Chen T. W. and Böger P. (1988): A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiol.* 88: 1055-1057
- ✓ Schopf J. W. and Parcker B. M. (1987): Early Archean (3.3 billion to 3.5 billion-year-old) microfossils from the Warrawoona Group, Australia. *Science* 237: 70-73
- ✓ Spurr A. R. (1969): A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Ultrastruct. Res.* 26: 31-43
- ✓ Stanier R. Y., Kunisawa R., Mendel M. and Cohen-Bazire G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35: 171-184
- ✓ Warwick F. V. and Quesada A. (1994): Ultraviolet radiation effects on cyanobacteria: implications for antarctic microbial ecosystems. In *Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects* Weiler S. C. and Penhale P. A. (eds). Washington. Antarctic research series 62: 111-124
- ✓ Wilmotte A. and Golubič S. (1991): Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol./ Algolog. Studies* 64: 1-24
- ✓ Wilmotte A., Auwera G. Van der and Wachter R. de (1994): Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Microbiol. Ecol.* 317: 96-100
- ✓ Wilmotte A., Neefs J. and Wachter R. de (1994): Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. Strain NIIB 1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. *Microbiology* 140: 2159-2164
- ✓ Wilmotte A. (1995): Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant D. A. (ed). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Ch 1
- ✓ Xiong F., Lederer F., Lukavský J. and Nedbal L. (1996): Screening of freshwater algae (Chlorophyta, Chromophyta) for ultraviolet-B sensitivity of the photosynthetic apparatus. *J. Plant Physiol.* 148: 42-48
- ✓ Xiong F., Komenda J., Kopecký J. and Nedbal L. (1997): Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plant.* 100, in press