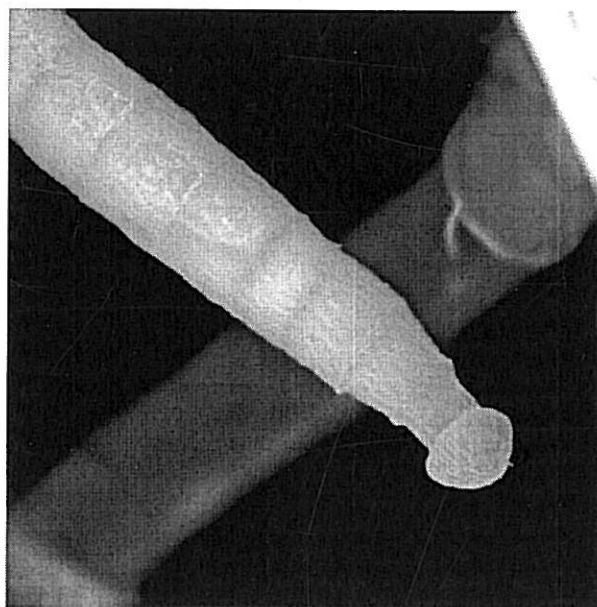


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta**



Magisterská diplomová práce

**Srovnávací studie sinic v okruhu druhu
*Phormidium autumnale***

Antonín Volf

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

Konzultant: RNDr. Jan Kaštovský

České Budějovice, 2002

Magisterská diplomová práce

Volf, A. (2002): Srovnávací studie sinic v okruhu druhu *Phormidium autumnale* [Comparative study of Cyanobacteria related to species *Phormidium autumnale* group. Mgr. Thesis, in Czech] – 43 pp., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The thylakoid structure of 16 strains related to *Phormidium autumnale* group was observed. Their morphology and biochemistry was compared using the fatty acid and pigment composition analyses. RFLP method was used for molecular analysis. *Phormidium autumnale* s.l. group is a cosmopolitan species with number of eco- and morphotyps.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, s použitím vlastních údajů, citované literatury a za přispění osob uvedených v poděkování.

V Českých Budějovicích, 3. ledna 2002


.....

Poděkování:

Můj srdečný dík patří velkému množství lidí kolem mne, kteří mi v různých etapách vývoje této práce vždy ochotně pomohli. Nelze je zde bohužel vyjmenovat všechny, přesto pár z nich rád zmíním. Děkuji svému školiteli prof. Komárkovi za poskytnuté zázemí a cenné rady. Janu Hanysovi Kaštovskému za veškerou pomoc od poskytnutí přístřeší, značné trpělivosti až k mnoha odborným radám. Davidu Zelenému za pomoc se statistickým zpracováním. Děkuji Dr. Kopeckému, Dr. Lukavské a lidí kolem nich za pomoc při biochemických analýzách. Mirkovi Oborníkovi a celé laboratoři molekulární taxonomie za pomoc s molekulárními metodami.

Děkuji všem, kterým stálo za to se se mnou zastavit a zeptat se: "Tak, jak to jde?"

Děkuji Vendě za její lásku.

OBSAH

1. Úvod	1
1.1. Přehled problematiky.....	1
1.1.1. Přístupy dnešní taxonomie.....	2
1.1.2. Současný pohled na rod <i>Phormidium</i>	4
1.2. Charakteristika rodu <i>Phormidium</i> a druhu <i>Phormidium autumnale</i>	8
1.3. Charakteristika studovaných kmenů.....	9
2. Metodika	10
2.1. Metodika kultivací.....	10
2.2. Metodika morfologického zpracování.....	11
2.3. Příprava vzorku pro TEM.....	12
2.4. Metodika analýzy pigmentů.....	12
2.5. Metodika analýzy mastných kyselin.....	13
2.6. Metodika molekulárního zpracování.....	14
2.7. Statistické zpracování.....	16
3. Výsledky	17
3.1. Ultrastruktura sledovaných kmenů.....	17
3.2. Morfologie sledovaných kmenů.....	18
3.3. Biochemické analýzy sledovaných kmenů.....	26
3.3.1. Analýza pigmentů.....	26
3.3.2. Analýza mastných kyselin.....	27
4. Molekulární analýza	28
5. Závěry a diskuse	31
5.1. Sběr a kultivace.....	31
5.2. Ultrastruktura.....	32
5.3. Molekulární analýza.....	32
5.4. Morfologie.....	34
5.5. Biochemie.....	36
6. Souhrn	38
7. Literatura	40

1. Úvod

1.1. Přehled problematiky

Sinice (Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota) jsou autotrofní gramnegativní bakterie, vykonávající oxygenní fotosyntézu, reprezentují jednu z hlavních eubakteriálních skupin (Castenholz & Waterbury 1989a). Obsahují chlorofyl a a fykobiliproteiny (fykocyanin, alofykocyanin a fykoerytrin), které jsou zodpovědné za typické modro – zelené zbarvení (Fritsch 1945, Geitler 1960, Wolk 1973 , Rudi et al. 1997). Cyanobacteria jsou geograficky velmi rozšířenou skupinou organismů, dominantní jsou především ve vodním prostředí a v prostředí s dostatečným osvětlením (Carr & Whitton 1973, Castenholz & Waterbury 1989a). V těchto podmínkách většinou hrají roli primárního producenta (Anagnostidis and Komárek 1985; Honda 1999), jsou významnými primárními kolonizátory a poměrně často se účastní primární sukcese.

Dnes už je obecně přijímáno, že endosymbioticky žijící sinice daly vznik chloroplastům a umožnily rostlinám oxygenní fotosyntézu (Itelman et al. 2000) a tím zahájily evoluci rostlin. Sinice také slouží jako jednoduchý model pro studium fotosyntézy. Diskuse o původu fotosyntetických organel by měla být nutně založena na diskusi o vzájemných fylogenetických vztazích mezi sinicemi, ideální by bylo kdyby se tyto vztahy odrazily v jejich systematickém uspořádání (Turner 1997). Důležitost studia sinic je známa již dlouhou dobu, ale taxonomie a fylogeneze této skupiny je stále nejasná.

Historie systematického uspořádání sinic byla poměrně bouřlivá a je dosti zešíroka popsána (Turner 1997; Boyer 2001).

Jsou pro ni charakteristické čtyři etapy: 1. První taxonomické monografie popisují sinice jako typy „algal plant“ (Gomont 1892), systém byl založen na klasických botanických kritériích (tj. především morfologii a cytologii). O 40 let později Geitler (1932) provedl souhrnné taxonomické review, základ, ze kterého započala moderní éra systematiky sinic (Turner 1997) a později z něj vychází i Anagnostidis & Komárek (1985).

2. V období 1956 – 1981, Drouet (1981) vytvořil alternativní systém, kde výrazně redukoval počet rodů a druhů sinic. Vše bylo založeno

na myšlenku, že většina morfologických odlišností mezi vzorky sinic je efemerní a způsobená podmínkami okolí.

3. R. Stanier, R. Rippka et al. vytvořili systém založený na zkušenosti s kmeny v axenických kulturách, systém postavili na bakteriologických kriteriích. Považovali sinice za sesterskou skupinu jiných bakterií (Stanier & van Niel 1962, Rippka 1978, Carr & Whitton 1982).

4. Nejnovější, kompromisní řešení mezi botanickým a bakteriologickým přístupem, vytvořili (Anagnostidis et Komárek, 1985). Z historických důvodů je nomenklatura založená na botanicko - taxonomických kriteriích, ale užitečné informace je možno získávat za pomoci bakteriologického přístupu z čistých (axenických) kultur.

1.1.1. Přístupy dnešní taxonomie

Dnešní moderní taxonomie a fylogenetika se neobejde bez použití molekulárně - biologických metod. V algologii tento přístup nabývá stále většího významu. Současné přístupy (nejen v algologii) se dají rozdělit na dvě skupiny. První užívá kromě metodik molekulární biologie i postupy klasické taxonomie (morfologie, cytologie, biochemie), a druhá se omezuje jen na molekulární biologii.

- 1.) Práce spojující oba přístupy mají za cíl nahlédnout na problém z více stran, mají snahu doplnit a podtrhnout určitý trend. Výsledky jsou zajímavé až protichůdné, kdy především výsledky studia fenotypu a genotypu u téhož rodu se různí. Otsuka et al. (1998) studovali 15 kmenů různých druhů rodu *Microcystis*. Klasická taxonomie a biochemie (obsah fykobilinů) tyto druhy rozlišuje, genetická analýza vykazovala vysokou příbuznost (až 100%). Wilmotte et al. (1992) analyzovali morfologické rozdíly mezi rodem *Oscillatoria* (podle moderních přístupů zde jde o *Phormidium*) a *Microcoleus* a tyto rozdíly nerefletovaly rozlišení na molekulární úrovni (16S RNA), Palinska et al. (1996) prováděla studii uvnitř rodu *Merismopedia*. Studovala 5 kmenů a na základě zjištěné 96-97% genetické podobnosti zahrnula všechny kmeny do druhu *Merismopedia punctata* Meyen.

Lehtimäki et al. (2000) k výše uvedeným studiím přidali analýzy kmenů rodu *Nodularia*, které navazují na studie Hayes & Barker (1997) a zjistily, že jediným fenotypickým znakem odpovídajícím genotypické analýze byla produkce toxinu nodularinu. Na druhou stranu některé jednobuněčné sinice, morfologicky podobné, mohou být fylogeneticky rozdílné (Ward et al. 1992). Podobně morfologicky nerozlišitelné kmeny rodu *Leptolyngbya* byly na základě sekvence 16S RNA rozdílné (Payne et al. 2001). Asencio Martinez et al. (1998) na rodu *Scytonema* a Li et al. (1998) na rodu *Anabaena* našli shodu mezi oběma přístupy.

Komárek & Kaštovský (2002) se pokusili kombinací molekulárního a fenetického aspektu (zejména uspořádání thylakoidů) naznačit nový trend moderní fylogenetické klasifikace sinic.

- 2.) Práce zaměřené jen na molekulárně – biologický přístup se věnují téměř výhradně studiu 16S RNA a zabývají se jednotlivými rody spíše v kontextu celého systému sinic. Současná taxonomie bakterií je hlavně založena na molekulární fylogenezi, která je definována jako analýza 16S rRNA (Woese 1987). Nelissen et al. (1992) prokázali monofyletický původ rodu *Pseudanabaena* a spolehlivě geneticky rozlišily rody *Arthrospira* a *Spirulina*, umístění dalších rodů v systému sinic (*Microcoleus*, *Phormidium* a *Oscillatoria*) působí nejistě. Nelissen et al. (1996) zpracovávali další kmeny vláknitých sinic, 7 kmenů rodu *Leptolyngbya* vyšlo jednotně a rod *Oscillatoria* vyšel opět nejednoznačně. Ishida et al. (1997) analyzovali zástupce osmi rodů ř. *Oscillatoriales* a znovu potvrdili nejednoznačné umístění tohoto řádu v dendrogramu sinic. Rudi et al. (1997) klasifikovali na základě 16S RNA vybrané sinice z kultur a podpořili stávající klasifikaci.

Wilmotte a Golubić (1991) a Wilmotte (1994) navrhuje na základě 16S RNA analýz dva systémy pro sinice, jeden sestává z 10 monofyletických skupin a druhý z osmi. Turner (1997) na základě molekulárních dat a „maximum likelihood“ analýzy rozděluje sinice na 10 monofyletických skupin, totéž potvrzuje Honda et al. (1998). Na druhou stranu Herdmann et al. (1998) vytvořil fylogenetický strom ze sekvencí celé sbírky Pasteurova ústavu a výsledky jsou většinou odlišné od běžného schématu.

Nevýhodou těchto studií, vedených především mikrobiology a molekulárními biology, je determinační neznalost a malá snaha ověřit si, zda studovaný kmen ze sbírky je skutečně

kmen, který studovat chtěli. Více než 50% kmenů ve sbírkách neodpovídá diagnóze taxonu jejich původního určení (Komárek & Anagnostidis 1989). Determinační chyby jsou často patrné (např. Ishida et al. 1997, Pichel et al. 2001).

1.1.2. Současný pohled na rod *Phormidium*

Rod *Phormidium* patří taxonomicky k nejvíce obtížným rodům sinic. Zahrnuje množství morfotypů, které vytvářejí velké množství přechodných forem. Dosud popsané druhy zastupují pouze část variability celého rodu, přesto bylo už popsáno více než 200 druhů. Pro snazší identifikaci je tento rod rozdělen do 8 skupin na základě odlišné morfologie apikální buňky vlákna (problematické je rozpoznání zralého, dobře vyvinutého vlákna; v nárostech dominují nezralá, mladá vlákna) (Anagnostidis & Komárek in press)

Phormidium autumnale sensu lato – group: zahrnuje víceméně fenotypicky uniformní skupinu morfotypů, které se liší morfologicky pouze mírně a obsahují spoustu přechodných forem, vyskytující se v různých biotopech. Vytvářejí načernalé makroskopické, ploché kolonie s hladkým, samet připomínajícím povrchem. Rozpoznat se dají podle původního popisu, ale jména v literatuře jsou užívána velmi arbitrárně (Anagnostidis & Komárek in press). Do této skupiny patří: *Ph. calcareum*, *Ph. vulgare*, *Ph. amoenum*, *Ph. caucasicum*, *Ph. fonticolum*, *Ph. hiemale*, *Ph. autumnale*, *Ph. favosum*.

Phormidium autumnale s. l. bylo k taxonomickému srovnání jednotlivých ekotypů vybráno jako poměrně rozšířený a všude běžný druh. Nejen pro jeho obtížnou kultivaci je taxonomická klasifikace této celé skupiny stále otevřená. Otázky jeho taxonomie a ekologie jsou bez molekulárně – biologického přístupu neřešitelné a molekulární přístup bez rozlišení např. ekologicky odlišných skupin druhů či kmenů nemá taxonomický výstup, který by se dal dobře aplikovat v praxi. Navíc celý rod *Phormidium* vystupuje v celkovém fylogenetickém schématu nejednotně (Komárek & Kaštovský 2002). Přesto v tomto schématu lze najít soubor kmenů, o kterém jde hovořit, jako o reprezentantu pravých zástupců rodu *Phormidium*. Kmeny v jiných pozicích schématu budou pravděpodobně chybně určené taxony. Srovnáním těchto kmenů na molekulární úrovni, doplněné morfologickou i biochemickou studií, by mělo odpovědět na hlavní otázku

kladenou v případě tohoto druhu: jedná se o jeden druh se širokou ekologickou a morfologickou variabilitou nebo je to skupina sobě si podobných druhů?

Pro porovnání morfotypů a kmenů skupiny *Phormidium autumnale* s. l. – group byla snaha získat co největší množství kmenů z této skupiny. Díky obtížnosti získávání a především kultivování těchto kmenů se podařilo nakultivovat a udržovat ve sbírce pouze 16 kmenů. Těchto 16 kmenů (viz tab. č. 1) reprezentuje celosvětové zastoupení tohoto druhu i jeho zastoupení v jednotlivých biotopech. K těmto 16 kmenům byla jako “outgroup” vybrána *Leptolyngbya* sp. Pro dobrý aplikační výstup této studie je molekulárně – biologická analýza doplněna biochemickou analýzou, studiem ultrastruktury a morfologie.

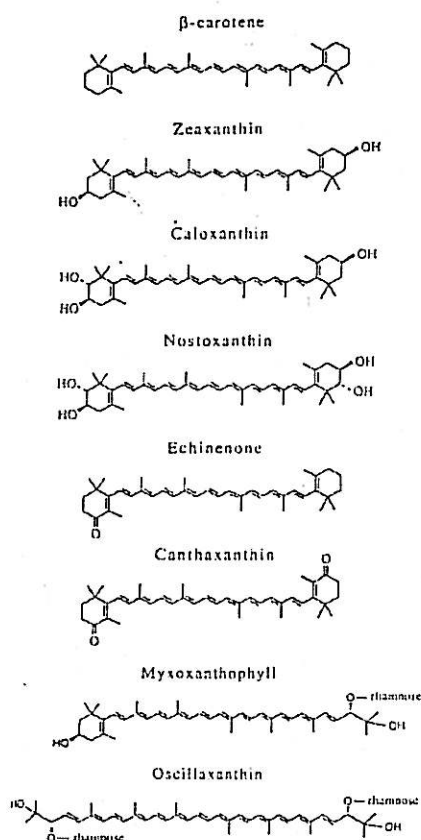
Zejména z ekologického hlediska bylo *Phormidium autumnale* už dříve poměrně hojně studováno. Sezonality a řasovou distribucí v potocích bohatých na štěrk studoval Pfister (1993). Potvrdil studie, jež dokazují, že nárůstová optima *Phormidium autumnale* jsou pozdní podzim (listopad) až brzká zima (prosinec, leden až únor). Nejmenší jsou naopak v létě (červen, červenec, srpen). Také Bosli-Pavoni (1970) studovala *Phormidium autumnale* z tekoucích vod, z prostředí pro něj nejtypičtějšího. Popis ekologických vlastností sinicových nárůstů z Antarktidy, s dominancí *Phormidium autumnale* popisuje Davey (1992, 1993).

Vědecké práce zabývající se taxonomií v okruhu druhu *Phormidium autumnale* s. l. jsou ve srovnání s ekologickými a floristickými studii zastoupené výrazně méně. Základní prací o taxonomii a ekologii *Phormidium autumnale* je práce Kannové & Komárka (1970), jedná se o revizi několika podobných druhů na bázi morfologického srovnání. Již dříve byla rovněž zkoumána jeho fototaxe (Nultsch 1961, 1962). Morfologickou variabilitu uvnitř jednotlivých kultur, zvláště při odlišných podmínkách kultivace rozsáhle zpracovávali u kmenů r. *Phormidium* Komárek (1972) a Stam & Holleman (1975, 1979). Byla dokázána značná variabilita. Thomas (1969) studoval makroskopický vzhled kolonie (makronárust) na agaru u druhů *Ph. autumnale* a *Oscillatoria princeps*. Typ ohybu a pohybu vláken je specifický pro každý kmen a to bylo potvrzeno i v této práci. Morfologické srovnání, včetně ultrastrukturních řezů dvou blízkých druhů *Phormidium boryanum* (Bory ex. Gom.) Anagn. et Kom a *Phormidium janthiformum* (Fior.-Mazz. ex Gom) Elenk. studoval Anagnostidis et al. (1988).

Studiem ultrastruktury a biochemií pochvy, buněčné stěny u r. *Phormidium* se zabýval Hoiczky (1995, 1998, 2000). Jednou z mála prací zabývajících se strukturou thylakoidů vláknitých sinic příbuzných *Phormidium* je od Hernández - Mariné (1996). V práci se zabývala ultrastrukturou (včetně studia thylakoidů) vláknité sinice *Microcoleus chthonoplastes* Thur. Potvrdila radiální strukturu thylakoidů a zdůraznila, že znalost ultrastruktury je vzácná i u poměrně běžných druhů, jako např. *M. chthonoplastes*. Zjistit ultrastrukturu *Phormidium autumnale* (všech studovaných kmenů), jejich srovnání a potvrzení taxonomického zařazení (na základě struktury thylakoidů) u r. *Phormidium*, bylo součástí této práce.

K morfologickému zpracování byla snaha tuto studii doplnit o biochemické analýzy, především analýzu pigmentů (chlorofylu a , karotenoidů) a mastných kyselin. Karotenoidy (obr. 1.) mají u sinic dvě hlavní funkce: jako antény zachytávající fotony během fotosyntézy a dále slouží jako prevence proti fotooxidativnímu poškození. Z chemického hlediska jsou to hlavně hydrofóbní isoprenoidy, syntetizované v membránách. Jsou uloženy nejvíce v proteinových komplexech membrán sloužících k fotosyntéze, v buněčných membránách a buněčných stěnách. Jejich kvalitativní a kvantitativní složení závisí na způsobu jejich analýzy (Fresnedo et al. 1991) a kultivace (de Loura et al. 1986). Analýzy obsahu toxinů a karotenoidů použil k rozlišení planktonních rodů *Planktothrix* a *Tychonema* Skulberg et al. (1985).

Obr. 1. Seznam karotenoidů a jejich chemických struktur běžných u sinic: (Hirschberg & Chamovitz 1994)



Studium poměrného zastoupení mastných kyselin bylo použito jako další doplňková analýza pro srovnání studovaných kmenů. Složení mastných kyselin (podobně jako pigmentů) závisí na kultivačních podmínkách. Efekt světla na složení mastných kyselin u sinic (poměr nasycených a nenasycených) závisí na výběru typu osvětlení (Döhler & Datz 1980). Nedostatek dusíku (De Loura et al. 1986) a teplota (Fork et al. 1978) ovlivňují zastoupení mastných kyselin.

Rozpoznání pigmentů i mastných kyselin je na základě retenčních časů a specifického tvaru křivky chromatografu.

Pro molekulárně– biologické zpracování studovaných kmenů byla použita metoda RFLP, která patří dnes už mezi běžné metody analýzy DNA (Turner 1997). Tato metoda bývá užívána k determinaci genetických rozdílů mezi jednotlivými kmeny, které mohou patřit i k jedinému druhu sinice (Wood & Townsend 1990). Do roku 1992 byla většina srovnávacích studií dělána pouze na 16S RNA. Fox et al. (1992) dokazují, že pro studia

na úrovni nižší než rodové není 16S RNA vhodná. V současné době je pro tyto studia nejvíce užívána více variabilní 16S – 23S ITS (internal transcribed spacer) (Boyer et al. 2001).

Snahou této práce je srovnání sledovaných kmenů na základě výše uvedených analýz a pokusit se odpovědět na otázku, v úvodu už jednou zmiňovanou : Jedná se o jeden druh se širokou ekologickou a morfologickou variabilitou nebo je to soubor sobě si podobných druhů?

1.2. Charakteristika rodu *Phormidium* a druhu *Phormidium autumnale*

Phormidium Kützing ex Gomont 1892

Stélka široce nasedá na substrát nebo vytváří (vzácně) volné krusty, shluky, zřídka se vyskytuje ve formě volných vláken. Stélka se víceméně rozšiřuje, vytváří řídký nebo kohezivní útvar ploché kolonie, gelatinózní, slizovitý, připomínající při pohledu z vrchu plstěnou kůži. Jednotlivá vlákna se různě kroutí, nemají nepravé větvení, obvykle jsou propleteny. Pochva se vyskytuje fakultativně (závisí to na podmínkách prostředí), pevně nebo volně nasedá na vlákno, je obvykle bezbarvá, bez vrstevnatosti, někdy přerušovaná až chybí zcela. Vlákna jsou cylindrická, většinou dlouhá mírně až silně vlnitá nebo rozvolněná a tvořící až šroubovitě vypadající prstýnky. Vlákna jsou (1,8) 2,5 – 11 (15) μm široká, nezaškrcovaná nebo jemně zaškrcovaná až po výrazně zaškrcovaná (na buněčných přepážkách), mají často výraznou motilitu uvnitř i vně pochvy. Buňky jsou víceméně izodiametrické, kratší i delší než širší, bez aerotopů. Apikální buňka je špičatá, zúžená nebo zakulacená s kalyptrou nebo bez kalyptry. Thylakoidy jsou uspořádány více méně radiálně.

Buňky se dělí transversálním dělením a rostou víceméně do původní velikosti mateřské buňky před rozdělením. Typickým způsobem reprodukce je rozpad vláken na krátká nebo dlouhá hormogonia. Sporadicky se odděluje pomocí bikonkávní nekroidní buňky (Anagnostidis & Komárek in press)

Phormidium autumnale [Agardh] Gomont 1892 sensu stricto

Phormidium autumnale var. *minus* Gardner 1927 incl.; *Lyngbya autumnalis* [Agardh] Bourrelly 1970 sec. Senna 1983

Stélka mikro až makroskopická, plochá, kožovitý zevnějšek působí černě, černohnědě, od tmavomodrozelené do hnědozelené nebo olivově zelené, někdy nažloutle i fialově, vnitřek vlákna je žlutohnědý. Povrch je sametově hladký. Vlákna jsou většinou přímá, někdy (vzácně, většinou na konci) jsou mírně ohnutá a smotaná. Pochva je tenká, pevná, zřejmá i méně viditelná, amorfni, slizovitá, někdy chybějící. Vlákna jsou ostře modro – zelená nebo špinavě zelená, (3,5) 4 – 7 μm široká, pohybující se proti směru hodinových ručiček a silně drkají. Vlákna jsou jemně nebo vůbec zaškrcovaná a nad přepážkami je zřejmá granulace. Koncové buňky jsou krátce (nevýrazně) nebo silně ztenčeny, rovné nebo mírně ohnuté. Buňky jsou izodiametrické nebo polovičně dlouhé jako široké, vzácně delší než širší, 2- 4 (5) μm dlouhé. Apikální buňky se často prodlužují a buď zakulacují nebo se vytváří kalyptra.

Výskyt: Sladká voda, perifyton na submerzním substrátu (kameny, kamenité hráze), méně frekventovaně benticky na bahnitých březích (mesotrofních a mírně znečištěných) nádržích, v potocích, řekách, vodopádech; jsou zaznamenány z vlhkých půd, zdí, hrází, na mořských pobřežích, na dně brakických nádržích atd.

Phormidium autumnale je vnímáno jako souhrn nitrofilních druhů celosvětového rozšíření. (Anagnostidis & Komárek in press)

1.3. Charakteristika studovaných kmenů

KMEN	DRUH	ZEMĚ PUVODU	BIOTOP	ROK SBĚRU/ Autor
PH1	Ph. autumnale	střední Turecko	zastíněná kaluže	2000/Volf
PH2	Ph. autumnale	východní Německo	vlhká půda, výsypky	1999/ Lukešová
PH3	Ph. autumnale	severní Čechy	jílovitá půda, výsypky	1999/ Lukešová
PH4	Ph. autumnale	severní Čechy	půda, výsypky	1998/ Lukešová
PH5	Ph. autumnale	střední Čechy	periodicky vysychající kaluže	2000/ Volf
PH6	Ph. autumnale	Švýcarsko	žlab	196497/ Zehnder (CCALA)
PH7	Ph. amoenum	Špicberky	?	1998/ Elster
PH8	Ph. autumnale	Brazílie	půda	1998/ Komárek
PH9	Ph. autumnale	Brazílie	půda	1998/ Komárek
PH10	Ph. autumnale	Slovensko	rybník, perifyton	1963/ Marvan (CCALA)
PH11	Phormidium sp.	Čechy	akvarium	1999/ Volf
PH12	Ph. attenuatum	Antarktida	půda, rookeries	1999/ Rektoris
PH13	Ph. autumnale	jižní Čechy	výtok z rybníku	1999/ Kaštovský
PH14	Ph. autumnale	Švýcarsko	potok	196499/ Zehnder (CCALA)
PH15	Ph. autumnale	Antarktida	půda	1998/ Lukešová
PH16	Ph. autumnale	Antarktida	půda	1997/ Lukešová

Tab. 1. Soupis studovaných kmenů *Phormidium autumnale* s. l. – group a jejich charakteristika

2. Metodika

2.1. Metodika kultivací

Kmeny studovaných sinic byly získány z různých ekologických i geografických oblastí. Tomuto předpokladu byla snaha přispůsobit způsob a metodiku kultivace (Rippka at al. 1981).

- 1) **Odběr sinic** – sinice byly nejčastěji ihned po odebrání udržovány v živném médiu BG 11 (Stanier et al. 1971) a Z (Staub 1961) nebo vysušeny savým papírem (až posléze dány do živného média) a následně v kultivační místnosti převedeny na Petriho misku s agarem (~ 2 %). Jako živné medium bylo převážně užíváno BG11. Některé kmeny (šlo především o antarktické a arktické druhy) bylo nutno kultivovat delší čas v Erlenmayerově baňce (250 ml) v médiu se sterilním podkladem (kamínky). Agarové plotny s kmeny sinic byly kultivovány (vyjma arktických a antarktických kmenů) v kultivační místnosti za standardních podmínek (teplota: 23-24°C, 14 hodin světlo, 10 hodin tma). Arktické a antarktické druhy byly kultivovány v lednici za stálého světla, při teplotě 9 - 9,5°C.
- 2) **Čištění kmenů od nežádoucích organismů (*Fungi, Bacteria, Acarina*)** - byl prováděn především častým přeočkováním za obvyklých podmínek tj. pomocí sterilního laminárního boxu (Jouan MSC 12), sterilní očkovací kličky a vysterilizovaných agarových ploten. Občas byl dodáván cykloheximin (omezuje růst Eukaryot) o koncentraci 1mg/ml do agaru. Při přeočkovávání byla snaha přenést co nejmenší počet čistých vláken sinic. Přeočkovávání probíhalo v měsíčním až v jeden a půl měsíčním intervalu.
- 3) **Uchování kmenů** – kmeny sinic, které se zdály být axenické (nikdy se nepodařilo je vyčistit zcela) byly přeočovány do zkumavek s šikmým agarem a vystaveny pravidelné světelné periodě (vyjma antarktických a arktických druhů).

2.2. Metodika morfologického zpracování

Při morfologickém zpracování byl brán zřetel jak na makroskopický vzhled kolonie (dále jen makronárůst), tak především na mikroskopické pozorování vláken sinic. Sterilní kličkou byl převeden vzorek sinice ze zkumavky s šikmým agarem na podložní sklíčko a tento vzorek byl pozorován mikroskopem Olympus CX 40, vzhledem k velikosti pozorovaného organismu byl nejčastěji užíván objektiv 100x a imerzní olej (Olympus). Zobrazení pozorovaného objektu, fotodokumentace a získání potřebných dat (měření šířky vlákna, délky buněk aj.) bylo umožněno díky kameře Olympus DP 10 a softwaru

Olympus DP soft. Makronárůst byl zdokumentován fotoaparátem Canon EOS 300 a digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-2000.

2.3. Příprava vzorků sinic pro transmisní elektronovou mikroskopii

Vzorky byly zpracovávány od března r. 2000 do března r. 2001

Příprava preparátů:

Buňky byly fixovány 2,5 % glutaraldehydem v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,0 nebo 7,2) po dobu 4 hod. nebo přes noc při teplotě 4 °C. (V některých případech bylo použito místo fosfátového pufru 0,1 M pufru kakodylanového.) Po promytí 0,1 M puftrem (fosfátovým, popř. kakodylanovým) byla suspence buněk postfixována 2 % roztokem OsO₄ v 0,1 M pufru po dobu 3 - 4 hod. při 4 °C.

Po promytí postfixačního roztoku puftrem byly buňky odvodněny acetonem (stoupající řada koncentrací: 30 %, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100%) a zality do Spurrovy pryskyřice (Spurr 1969).

Ultratenké řezy byly kontrastovány octanem uranylu a citrátem olova. Ke studiu ultrastruktury buněk bylo použito transmisního elektronového mikroskopu Jeol JEM 1010.

2.4. Metodika analýzy pigmentů

- 1) **Extrakce pigmentů** – bylo použito standardního postupu (Kopecký et al. 2000). Rozrušení buněk sinic bylo prováděno pomocí bolatina v třecí misce a extrakce byla dělána za normálního osvětlení.
- 2) **HPLC chromatografie** – chromatografická separace pigmentů byla dělána na HPLC systému skládajícího se z pump (Beckman 114 A), tj. dodávající systém (Beckman 420) a „photodiode array detektor“ (Waters 991). Zobrazení a vyhodnocení dat bylo pomocí Waters 991 software. Čas a rozlišení vlnové délky byl 2,0 s a 1,4 nm. Průtok byl 1 ml/min. Další postup probíhal podle Kopeckého et al. (2000). Přístroj měří v rozsahu 300 – 750 nm, sledované vzorky byly měřeny v rozsahu 340 – 750 nm a

chromatogramy byly získány při vlnové délce 440 nm (většina pigmentů má při této vlnové délce své maximum).

- 3) **Zpracování** - výstupní data byla zpracována softwarem Microsoft Excel 2000 do grafů .

2.5. Metodika analýzy mastných kyselin

- 1) **Extrakce lipidů z biomasy sinic** – přibližně 80 mg lyofilizované sušiny bylo třeno v třecí misce společně s izopropanolem a pro usnadnění práce se dodávalo malé množství skleněných kuliček a laboratorního písku. Po centrifugaci (4 500 ot/min) byl supernatant kvantitativně převeden do kádinky s horkým methanolem (12 ml) a za stálého míchání byl 3 min vařen. Následně bylo dodáno 20 ml chloroformu a střídavě mícháno (3 min) a ponecháno stát (10 min). V dalším kroku byla směs odstředěna (3 500 ot/min) a odpařena na vakuové odparce (RVO) a převedena do chloroformu.
- 2) **Methylace mastných kyselin v lipidickém extraktu** – k extraktu bylo přidán 1 ml 5% acetylchloridu v methanolu (nutný přebytek methylačního činidla) a pod zpětným chladičem 60 - 70 min vařeno. Dále bylo odpařeno vše na RVO do sucha, vypláchnuto hexanem a několika kapkami H₂O. Horní hexanová vrstva s obsahem methylesterů mastných kyselin převedena do vzorkovnice.
- 3) **Analýza na GC (gas chromatograph)** – methylestery mastných kyselin byly stanovovány na plynovém chromatografu Carlo Erba Mega 5300, kapilární kolona SE- 54, 25 m x 0,32 mm, nosný plyn H₂ o tlaku 40 kPa, teplota injektoru 250 °C, teplota detektoru 270 °C, teplotní gradient 180 °C – 250 °C rychlostí 4 °C /min, split 1:30. Nástřik vzorku byl ~ 5μl.
- 4) **Zpracování** – výstupní data byla zpracována softwarem Microsoft Excel 2000 do grafů.

2.6. Metodika molekulárního zpracování sledovaných kmenů

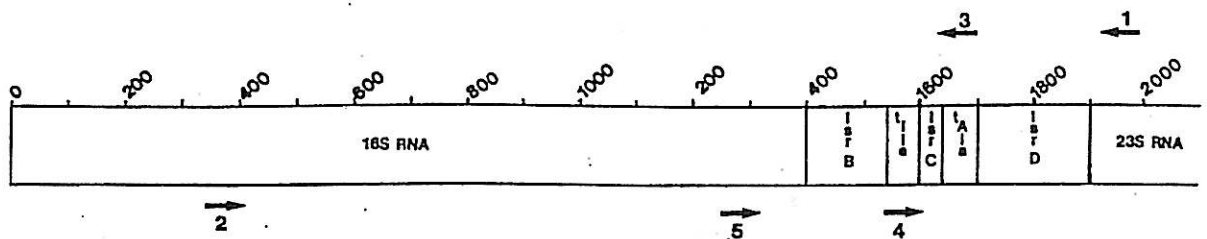
1) Izolace DNA z nárostu sinic na agarové plotně

Pro izolaci byla použita fenol- chloroformová extrakce:

- a) **Dezintegrace buněk** – sinice odebrané z agaru byly suspendovány na třepačce pomocí skleněných kuliček ve 2 ml NET 50 lyzačním pufru (složení: 50mM EDTA+100mM NaCl+10mM TRIS) a bylo přidáno 40 μ l pronázy E (c = 0,25 mg/ml) a 240 μ l sarkosylu (3%). Směs byla inkubována 1 hodinu na ledu. (U kmenů 1 a 11 bylo použito na místo pronázy E proteináza K a nebyla použita inkubace na ledě.)
- b) **Extrakce proteinů fenolem** (pH~7,0) – k lyzátu bylo přidáno stejné množství fenolu, bylo třepáno 10 min. a poté centrifugováno stejný čas na max. otáčky. Bylo odebrána horní fáze (vodná fáze + DNA) a extrakce byla opakována než zmizela proteinová vrstva.
- c) **Extrakce zbylých proteinů a precipitace NK** – k vzorku byl přidán fenol:chloroform (1:1) a opět bylo 10 min. mícháno a centrifugováno. Následně byl přidán pouze chloroform a opakováno. Nakonec bylo přidáno 1/10 octanu sodného 3M (pH= 7,5), dvojnásobek objemu vzorku 96% ethanolu (lab. teplota) a 1 μ l glykogenu. Vzorek byl dán na 10 min. do mrazáku -70°C a dále centrifugován 15 min. při max. rychlosti (13 000/min) a po dotočení byl odsán supernatant a přidán přebytek 70% ethanolu (-20°C) a znovu byl vzorek centrifugován (5 min./13 000ot/min). Supernatant byl odsán a pelet na dně vysušen.
- d) **Resuspenze DNA-** pelet byl rozpuštěn v 50 μ l vody.

2) PCR (polymerázová řetězová reakce)

Pomocí PCR byla amplifikována část ITS o celkové velikosti 1600bp. Pozici tohoto genu vzhledem k 16S RNA a 23S RNA ukazuje obrázek 2.



Obr. 2. Úsek v 16S – 23S rRNA operonu použitý v této práci a místa nasedání užitéch primerů (1,2) (Boyer et al. 2001)

Použity byly primery VRF1 (*116R9) (‘5- CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC –3’) navržené Wilmotte et al. primer VRF2 (*116S0) (5’-GGG GGA TTT TCC GCA ATG GG-3’) podle Nübel et al. (1997). Primery byly vyrobeny firmou Biotech a použita byla sada firmy Promega. PCR reakce proběhla v celkovém objemu 100 μ l ve složení: 4U Taq DNA polymerázy, 10x reakční pufr (10mM Tris-HCl, pH 8,3 , 50 KCl a 1,75mM MgCl₂), 8 μ l dNTP, 4 μ l každého primeru a jako templát bylo použito 2 μ l DNA, ovšem pro každý kmen určité přesné ředění dle zkušenosti (od 1:2 do 1:5). Na 100 μ l bylo doplněno sterilní vodou.

Nastavení reakčních podmínek pro sinice bylo už popsáno (Boyer et al. 2001), pro studované kmeny bylo potřeba hledat a přizpůsobit nasedací teplotu. Nastavení teplot výsledného programu: iniciální denaturace 94°C/1min, anealing 41°C nebo 45°C (podle typu polymerázy)/1 min, 72°C/4 min (35 cyklů) následováno 10-ti minutovou extenzí v 72°C.

PCR produkty byly separovány na 1% agarózovém gelu, velikost PCR produktů byla odvozena na základě porovnání s 1 Kb markrem (GibcoBRL, 0,5 μ l na jamku). K dokumentaci byl použit systém EDAS 120 – Kodak.

3) Izolace PCR produktu z gelu

Izolace byla dělána pomocí kitu [QI Aquick Gel Extraction kit (250)] nebo přímo centrifugací zmraženého agarózového bločku, při kterém se vodný roztok s DNA přefiltroval přes skelnou vatu. Vodný roztok + DNA byl za pomoci vakua, teploty 50°C vysušen a zkoncentrován v 5 μ l sterilní vody.

4) Štípání restričními enzymy

Do 5 µl DNA bylo dáno přibližně 8 U restriktázy, 10x příslušný pufr + BSA a doplněno sterilní H₂O do objemu 20 µl. (Použité restriktázy a pufr jsou v tabulce č. 1). Směs byla inkubována 1 hod při teplotě 37°C.

<i>restriktáza</i>	<i>místo štěpení</i>	<i>Počet štěpných míst u <i>Phormidium autumnale</i></i>	<i>pufr</i>	<i>firma</i>
<i>Hind III (HC)</i>	A/AGCTT	1	R + BSA	PROMEGA
<i>Hae III</i>	GG/CC	6	R + BSA	PROMEGA
<i>Mbo I</i>	/GATC	3	R	PROMEGA
<i>Msp I</i>	C/CGG	6	Y + BSA	FERMENTAS
<i>Rsa I</i>	GT/AC	6	Y + BSA	FERMENTAS
<i>Hinf I</i>	G/ANTC	5	R + BSA	FERMENTAS
<i>Alu I</i>	AG/CT	10	Y + BSA	FERMENTAS
<i>Sau 3A</i>	?	3	Sau 3A	FERMENTAS
<i>Mbo II</i>	GAAGA(N)	5	B + BSA	FERMENTAS

Tab. 2. Seznam použitých restriktáz a pufrů

Naštípaná DNA (20 µl) byla separována na 3% agarózovém gelu 7-10V/cm, velikost jednotlivých fragmentů DNA byla zviditelněna díky ethidium bromidu (v některých případech bylo užito sybr green) a odvozena na základě porovnání s 100 b markerem (GibcoBRL, 0,5 µg na jamastných kyselinu). K dokumentaci byl opět použit systém EDAS 120 – Kodak. K vyhodnocení byl použit program PAUP verze 4.0 b 8. Nastavení podmínek: optimality criterion = distance – minimum evolution; distance measure = Upholt (bootstrap analysis – 100 replikací).

2.7. Statistické zpracování:

Pro porovnání kvantitativních dat (šířka vlákna, délka buněk, šířka vlákna pod kalyptrou a šířka kalyptry) byla použita jednocestná analýza variance v programu STATISTICA 5.5 (anonymus, 1996). Tabulka morfologických dat byla zpracována pomocí metody Cluser analysis implementované taktéž v balíku STATISTICA 5.5; kvantitativní data byla standardizována na interval <0,1>, aby je bylo možné spojit s údaji kvalitativními.

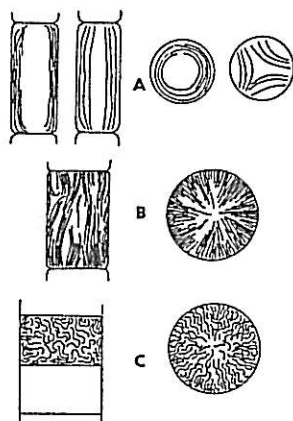
Jako způsob řešení a vyhodnocení byla zvolena metoda Single linkage a Euclidean distance.

Získaná data o procentuálním zastoupení pigmentů a mastných kyselin byla zobrazena pomocí ordinační techniky PCA (Principal Component Analysis) v ordinačním diagramu programem CanoDraw (Šmilauer P.,1992).

3. Výsledky

3.1. Ultrastruktura sledovaných kmenů

Všechny sledované kmeny byly v průběhu let 2000 až 2001 zpracovány (viz metodika) pro TEM (transmisní elektronovou mikroskopii) a byla na nich studována především struktura thylakoidů. U některých kmenů opakovaně. Struktura thylakoidů je jednou z charakteristik, která sinice v ř. Oscillatoriales přesvědčivě zařazuje do správné čeledi (Anagnostidis & Komárek 1988).

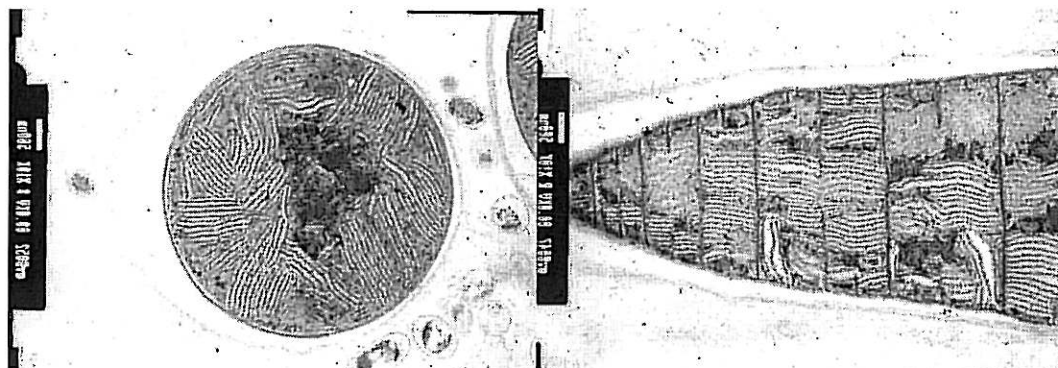


Obr. 3. Hlavní typy struktury thylakoidů ř. Oscillatoriales: A – Pseudanabaceae, B – Phormidiaceae, C – Oscillatoriaceae (orig. Anagnostidis et Komárek 1988)

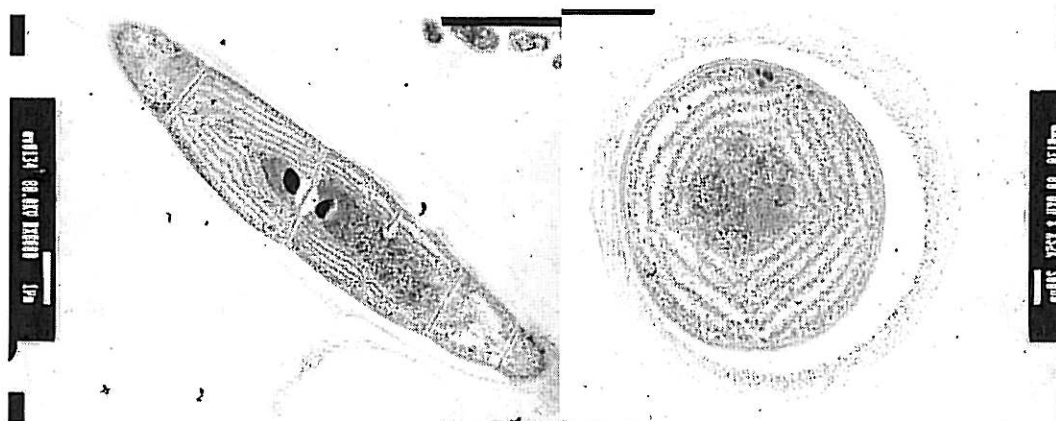
Všechny studované kmeny (PH), na základě struktury thylakoidů, patří do čeledi Phormidiaceae (obr. 4.). Bylo u nich zjištěno radiální uložení thylakoidů (obr. 3.). U kmene *Leptolyngbya sp.* (LPT), který v této práci slouží jako “outgroup”, byla potvrzena příslušnost k čeledi Pseudanabaenaceae. Bylo u něj zjištěno parietální uložení thylakoidů (obr 5.).

Mezi strukturou thylakoidů jednotlivých kmenů (PH) byly zjištěny drobné difference, které nemají taxonomickou hodnotu a pravděpodobně byly výsledkem kultivace a přípravy vzorků.

Na snímcích z TEM je kromě struktury thylakoidů vidět i struktura pochvy, která se také nijak významně mezi jednotlivými kmeny neliší. Naopak síla pochvy se mezi jednotlivými kmeny liší.



Obr. 4. Radiální uložení thylakoidů u kmenů PH (čel. Phormidiaceae; konkrétně kmen PH15), příčný a podélný řez.



Obr. 5. Parietální uložení thylakoidů u kmene LPT (čel. Pseudanabenaceae), příčný a podélný řez.

Výsledky ultrastruktury všech sledovaných kmenů viz příloha (obr. 20. až obr.23.)

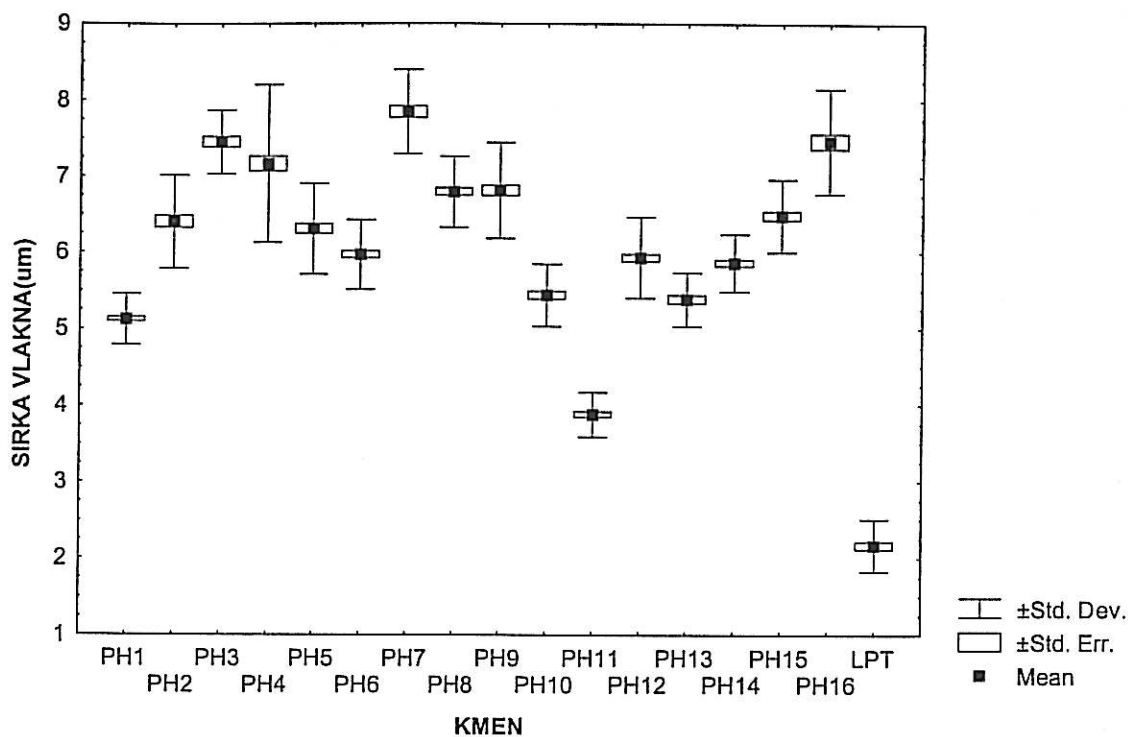
3.2. Morfologie sledovaných kmenů

Sledované kmeny *Phormidium autumnale* s.l. (a *Leptolyngbya* sp.) rostly na Petriho misce s agarem charakteristickým způsobem. Tento tzv. makronárůst byl pro každý

jednotlivý kmen specifický. Celkově byly nalezeny tři vzorce růstu, kterými se jednotlivé kmeny od sebe lišily: 1.) Radiální růst (R), kdy vlákna rostla od středu rovně k okraji; nejméně zastoupený typ (PH1, PH5, PH4?), 2.) prstýnkový růst (P), kdy některá vlákna sinice vytvářela shluky malých i větších „prstýnků“; byl středně zastoupen (PH15, PH10, PH7, PH8, PH9) , 3) vrtulový růst (V), kdy se většina vláken sinice pohybuje protisměru hodinových ručiček a vytvářejí útvar podobný vrtuli, je nejvíce zastoupeným typem (PH16, PH3, PH2, PH6, PH12 ,PH13, PH14, PH11) (viz příloha, obr. 24. a 25.)

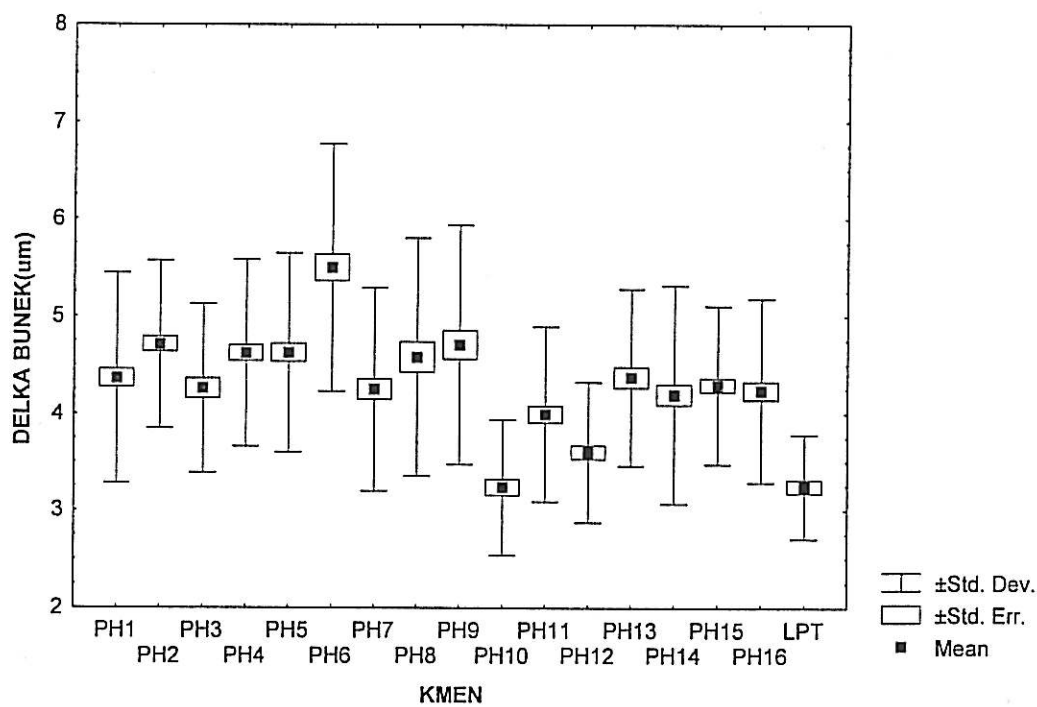
Jednotlivé kmeny byly během dvou let opakovaně pozorovány pomocí světelného mikroskopu.

Z kvantitativních dat byla u nich měřena šířka vlákna, délka buněk, šířka vlákna pod kalyptrou a šířka kalyptry u zralých vláken. Průměrné hodnoty těchto měření jsou shrnuty v tab. 3 (viz příloha). Kmen *Leptolyngbya* sp.(sloužící v této práci jako “outgroup”) nemá kalyptru a proto byl automaticky vyřazen z měření šířky vlákna pod kalyptrou a měření šířky kalyptry. U sledovaných kmenů byla snaha získat co největší počet měření. Přesto byl počet měření u jednotlivých kmenů různý v závislosti na podmínkách pozorování, nebyl však řádově odlišný. Porovnání rozdílů mezi šířkami vláken sledovaných kmenů vyšlo statisticky průkazně ($p \ll 0,001$, viz příloha tab. 5 testováno analýzou variance). Zjištěné rozdíly v šířce vlákna mezi kmeny *Phormidium autumnale* s. l. jsou zobrazeny na obrázku č. 6.



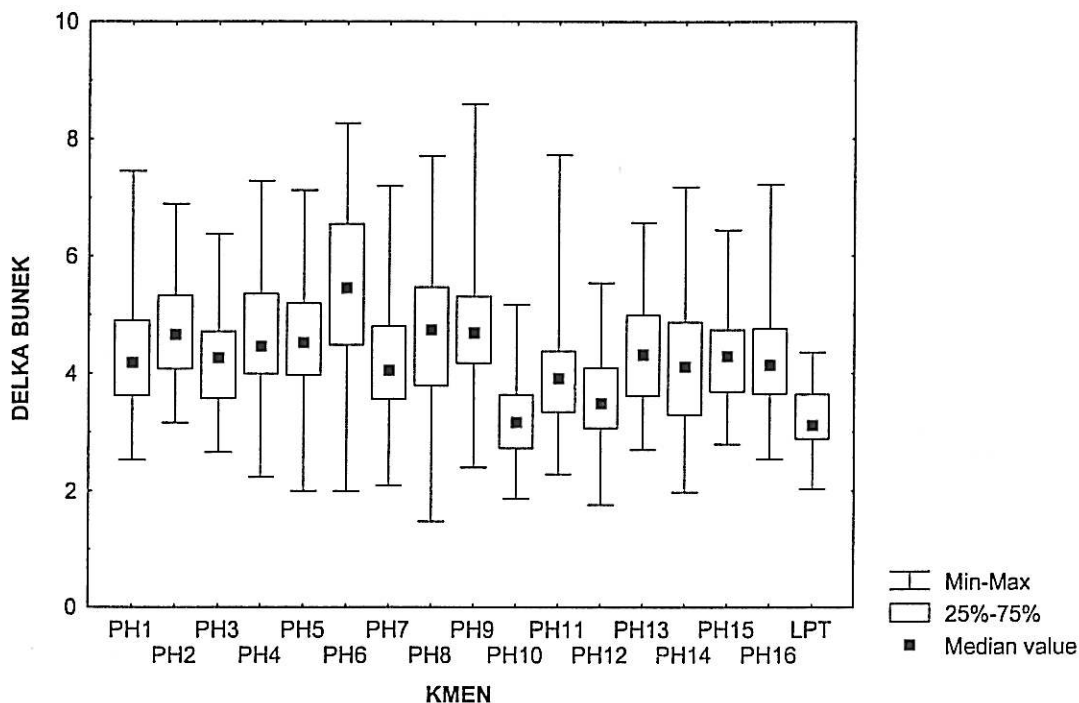
Obr. 6. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě šířky vlákna.

Porovnání rozdílů mezi délkami buněk vyšlo opět statisticky průkazně ($p \ll 0.001$, viz příloha tab.6.). Zjištěné rozdíly jsou zobrazeny na obrázku č. 7.



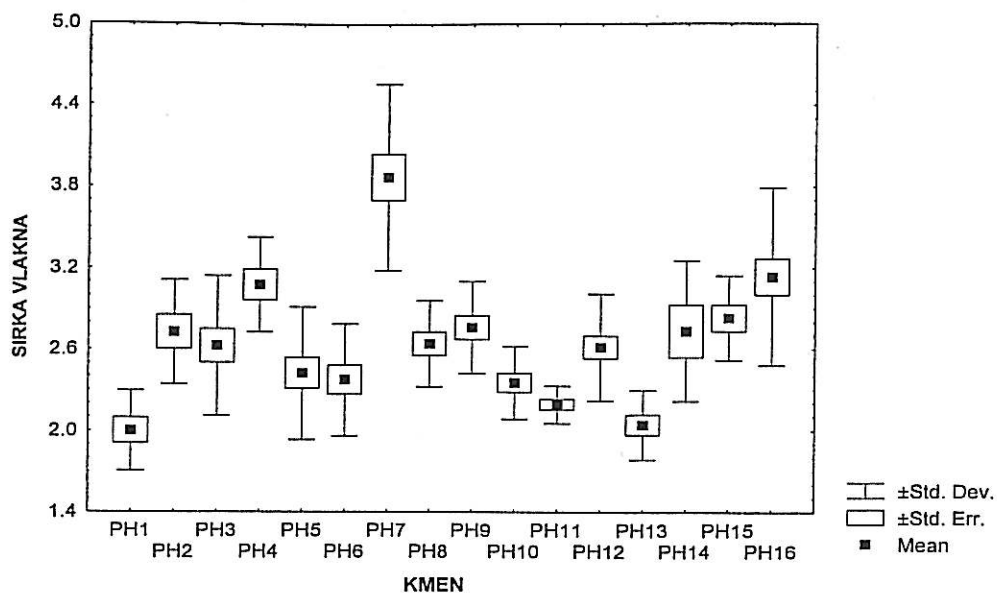
Obr. 7. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě délky buněk.

Pro porovnání délky buněk je zajímavější jejich rozdělení na základě jejich minim a maxim. Buňka ve vláknu roste do určité maximální délky (která může být specifická pro daný kmen) a pak se tato buňka rozdělí a velikost dceřiných buněk může být opět specifická. Vyjádření maxim a minim je na obrázku č. 8.



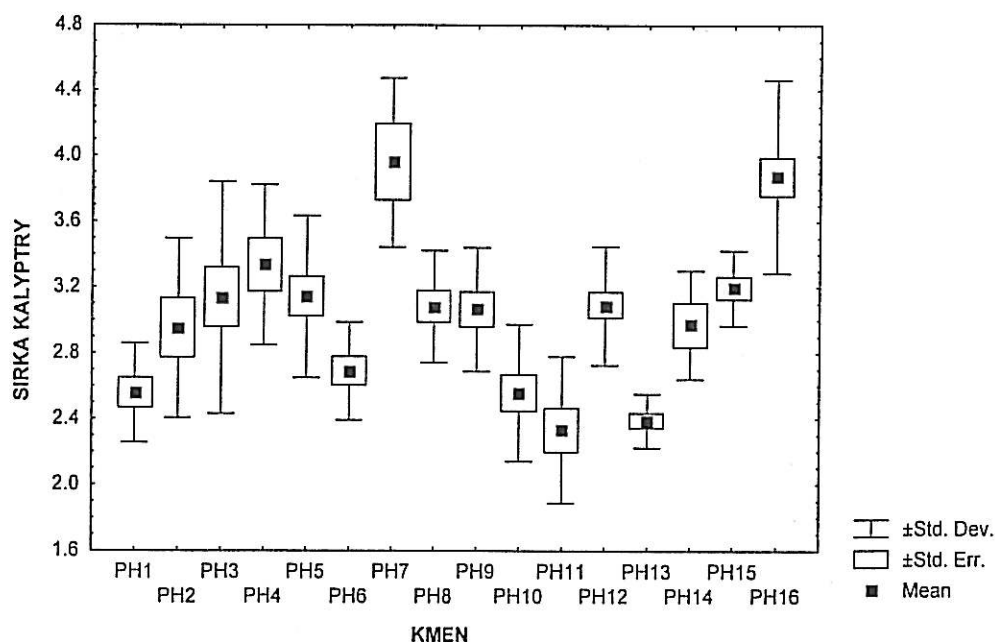
Obr. 8. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě délky buněk.

Počet měření šířky pod kalyptrou a na kalyptře byl nižší, protože obecně počet zralých vláken s vyvinutou kalyptrou je v nárůstu nízký. Porovnání rozdílů mezi šířkami vláken pod kalyptrou vyšlo statisticky průkazně ($p < 0.001$, viz příloha tab. 7). Srovnání kmenů zobrazuje obrázek č. 9.



Obr. 9. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě šířky vlákna pod kalyptrou.

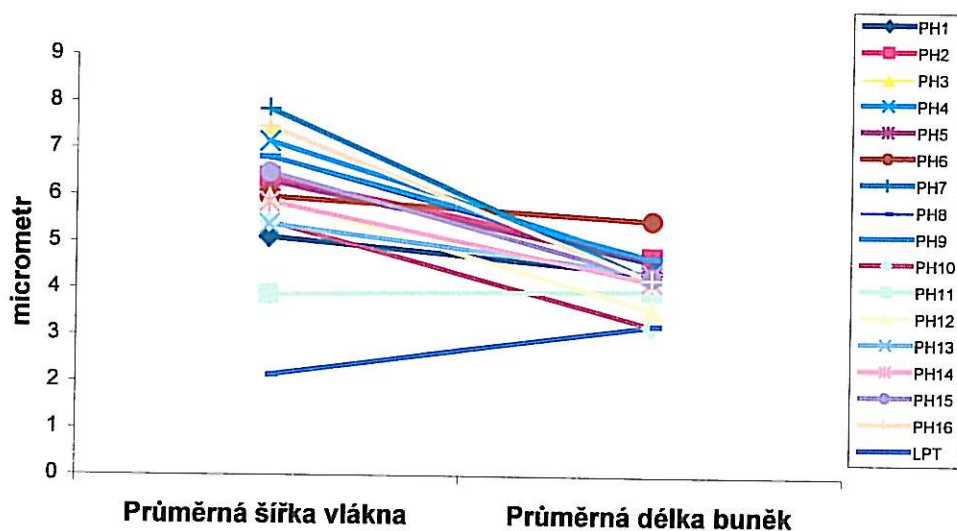
Porovnání rozdílů mezi šířkami kalyptry sledovaných kmenů vyšlo statisticky průkazně ($p < 0.001$, viz příloha tab. 8.). Srovnání kmenů je vidět na obrázku č. 10.



Obr. 10. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě šířky kalyptry.

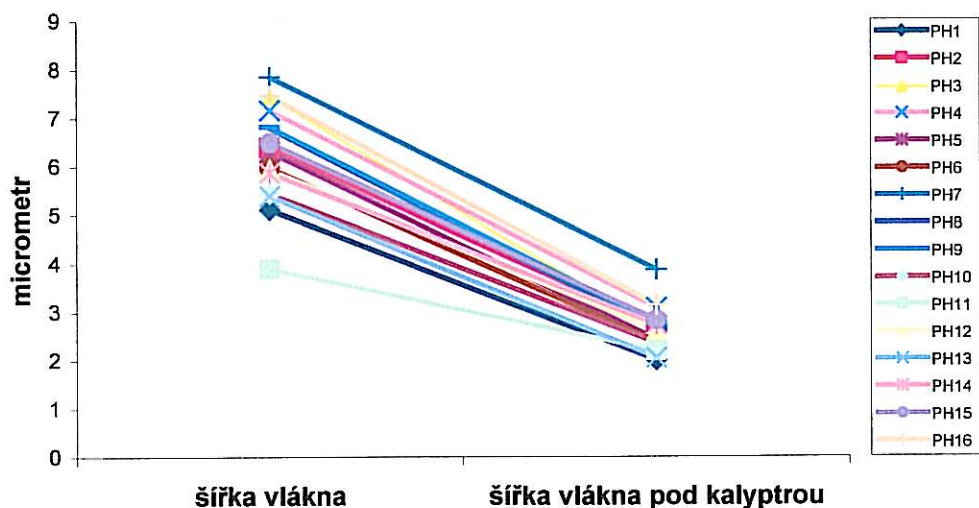
Jak je z diagramů patrné, nejmenší rozdílnost je u sledovaných kmenů v délce jejich buněk. Ostatní měřené charakteristiky jsou rozdílné výrazněji.

Jak bylo předpokládáno, kmen *Leptolyngbya* sp. se ve všech měřeních viditelně odlišuje. Ze sledované skupiny *Phormidium* (PH) se odlišuje rozdílnou šířkou vlákna a šířkou kalyptry kmen PH11 tj. *Phormidium* sp. Šířkou vlákna, kalyptry a vlákna pod kalyptrou se dobře oddělují PH7 tj. *Phormidium amoenum* a PH 16 tj. *Phormidium autumnale*. Průměrnou délkou buněk se od ostatních kmenů oddělují PH10 a PH6 a na základě minim a maxim jsou to kmeny PH10 a PH6, PH8, PH9. Poslední tři jmenovaní mají také největší rozptyl. Kmeny LPT a PH11 se oddělují od ostatních i při porovnání průměrné šířky buňky ku průměrné délce buňky (viz obr. 11.) Tento znak společně s šířkou vlákna je velmi praktický a má dobrý aplikační výstup.

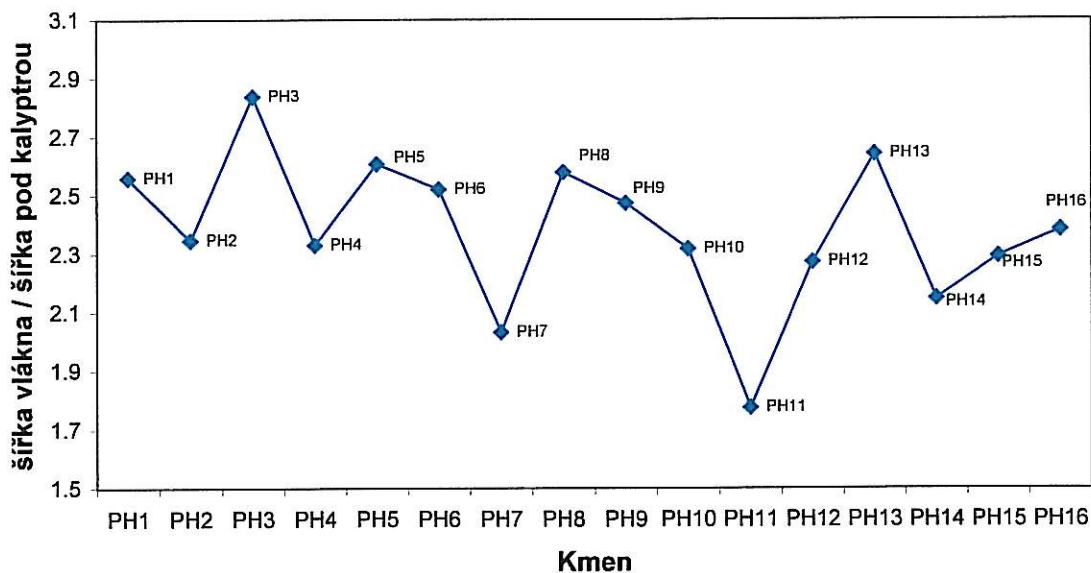


Obr. 11. Grafické vyjádření poměru průměrné šířky a průměrné délky u kmenů *Phormidium autumnale*

Rozdílnost ve velikosti zúžení, vyjádřená jako poměr průměrné šířky vlákna ku šířce vlákna pod kalyptrou, nebyla příliš velká. Kmen PH11 vykazuje nejmenší zúžení a následuje jej kmen PH7. Tyto kmeny se od ostatních liší. Největší zúžení bylo změřeno u kmene PH13 (obr. 12.). Vynesením těchto rozdílů do grafu je vidět na obrázku č.13.

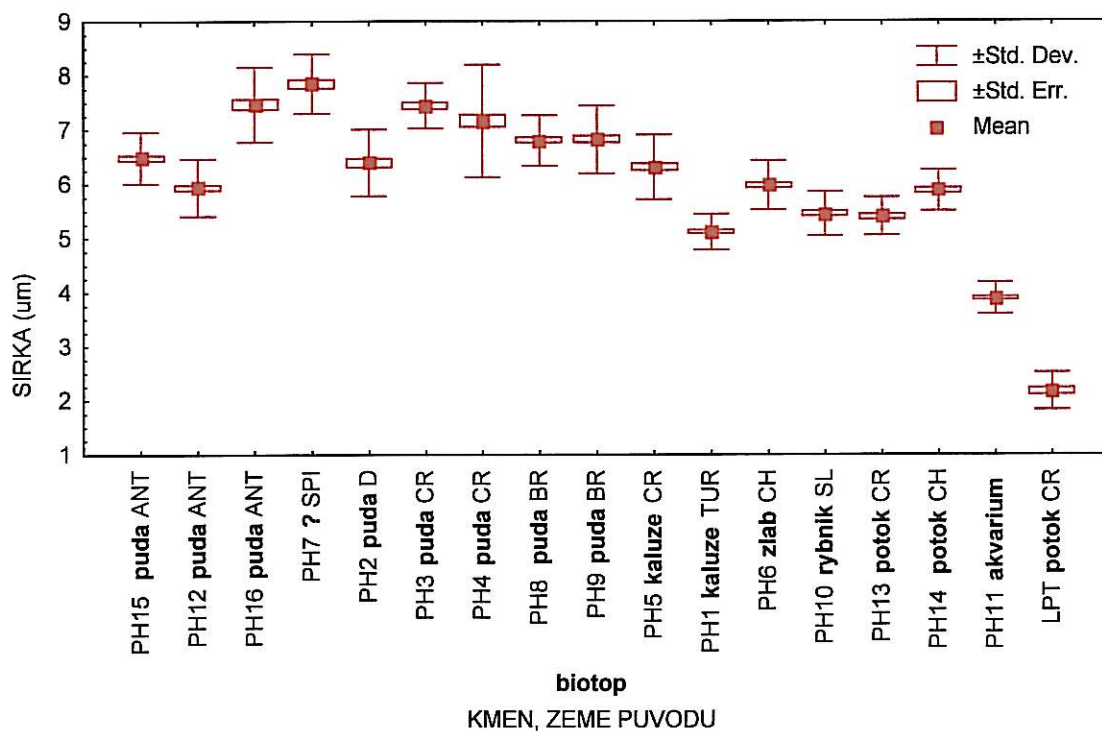


Obr. 12. Velikost zúžení konce vlákna vyjádřená poměrem prům. šířky vlákna a šířky vlákna pod kalyptrou.



Obr. 13. Velikost zúžení vlákna u sledovaných kmenů *Phormidium autumnale*

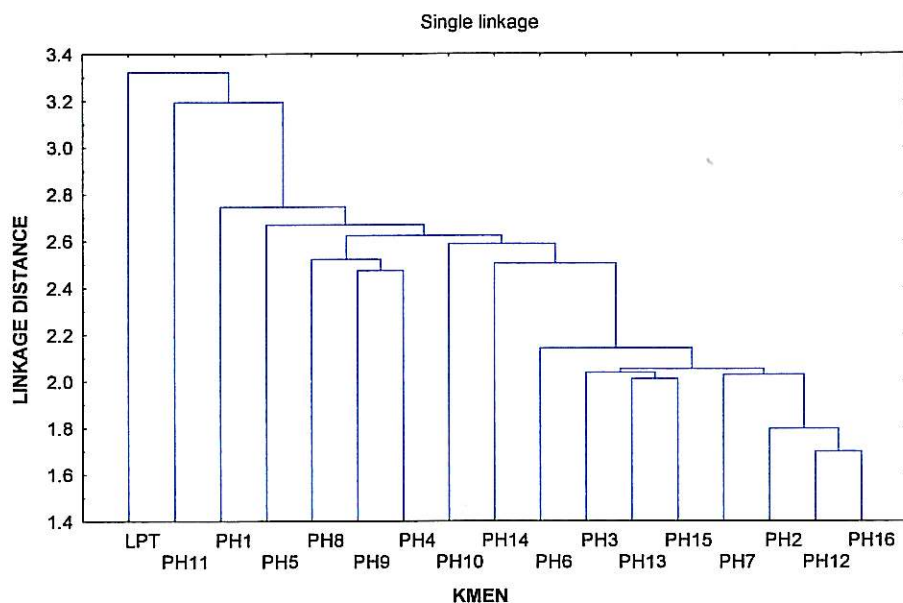
Obr. č. 14 zobrazuje srovnání morfologické vlastnosti (šířka vlákna) podle biotopu, ze kterého každý kmen pochází. Žádná korelace zde nalezena nebyla.



Obr. 14. Seřazení prům. šířky vlákna podle biotopů výskytu (ANT – Antarktida, SPI – Špicberky, D – Německo, BR – Brazílie, TUR – Turecko, CH – Švýcarsko, SL – Slovensko, CR – Česká republika)

Z kvalitativních dat byly u kmenů pozorovány charakteristiky : barva, typ zúžení konce vlákna, ohyb konce vlákna, zaškrcení , spirality, síla pochvy, granulace nad přepážkami a makronárůst (viz příloha, tab. 4.). Tyto znaky byly vybrány na základě literatury (např. Anagnostidis et al. 1988) a vlastního uvážení.

Kvalitativní i kvantitativní data byla zpracována, ve snaze zachytit rozdíly a podobnosti, pomocí Cluster analysis a výsledný diagram vypovídá o nalezených rozdílech či podobnostech (viz obr. 15.). Diagram zpracovaný metodou complete linkage (viz příloha, obr. 31)

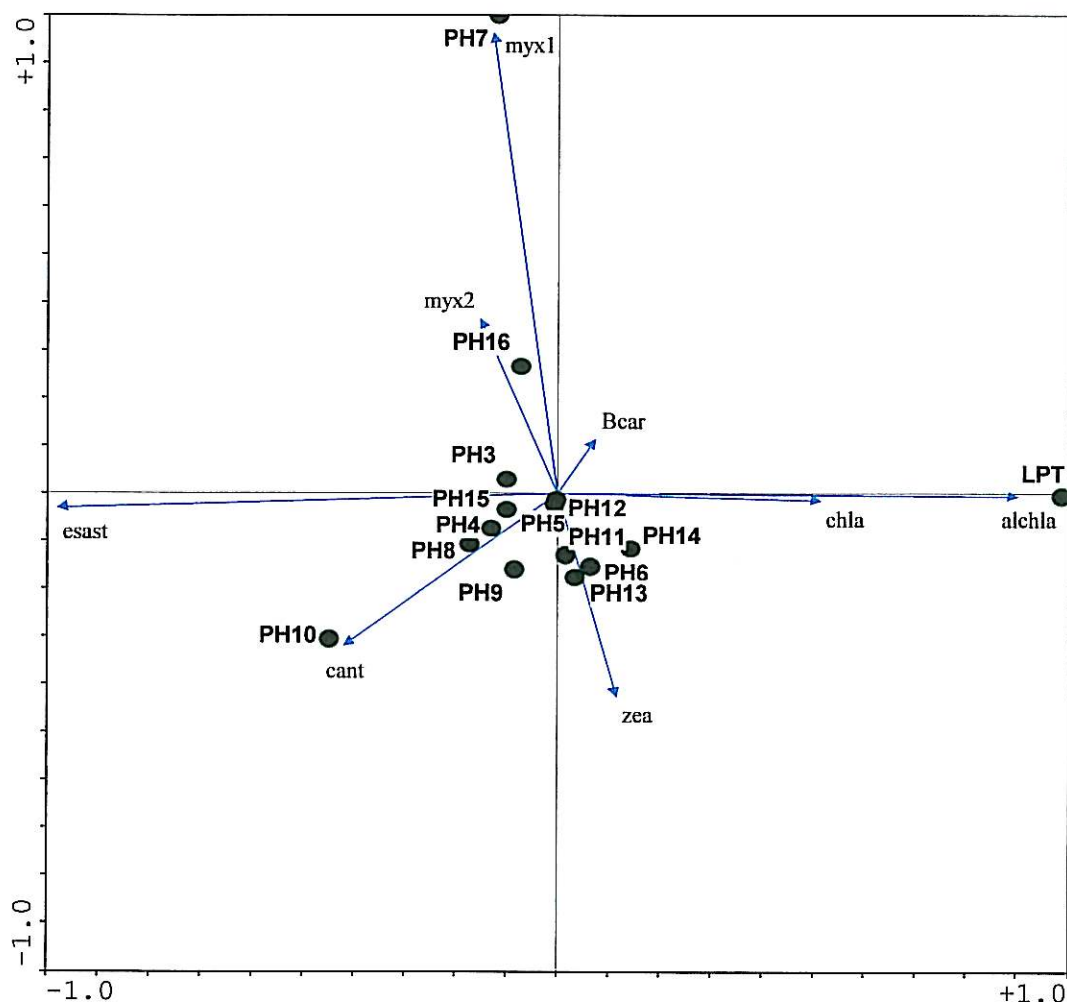


Obr. 15. – Srovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě kvantitativních a kvalitativních dat

3.3. Biochemické analýzy sledovaných kmenů

3.3.1. Analýza pigmentů

Analýzou pigmentů bylo zjištěno, které pigmenty studované kmeny obsahují a jejich procentuální zastoupení. Kmeny PH1 a PH2 nebyly analyzovány (viz diskuse). V kmenech *Phormidium autumnale* byly nalezeny tyto pigmenty (řazeny podle retenčních časů): myxoxanthophyl (absorbční maxima: 465 nm a 510 nm), zeaxanthin(428 nm, 454 nm, 480 nm), alomer chlorophylu a cantaxanthin (472 nm), chlorophyl a (430 nm, 662 nm), estery astaxanthinu , β - caroten (426 nm, 453 nm, 479 nm). Procentuální zastoupení zjištěných pigmentů (viz příloha, tab. 9.). Porovnání procentuálního zastoupení pigmentů u kmenů *Phormidium autumnale* je zobrazeno pomocí ordinačního diagramu (obr. 16.)

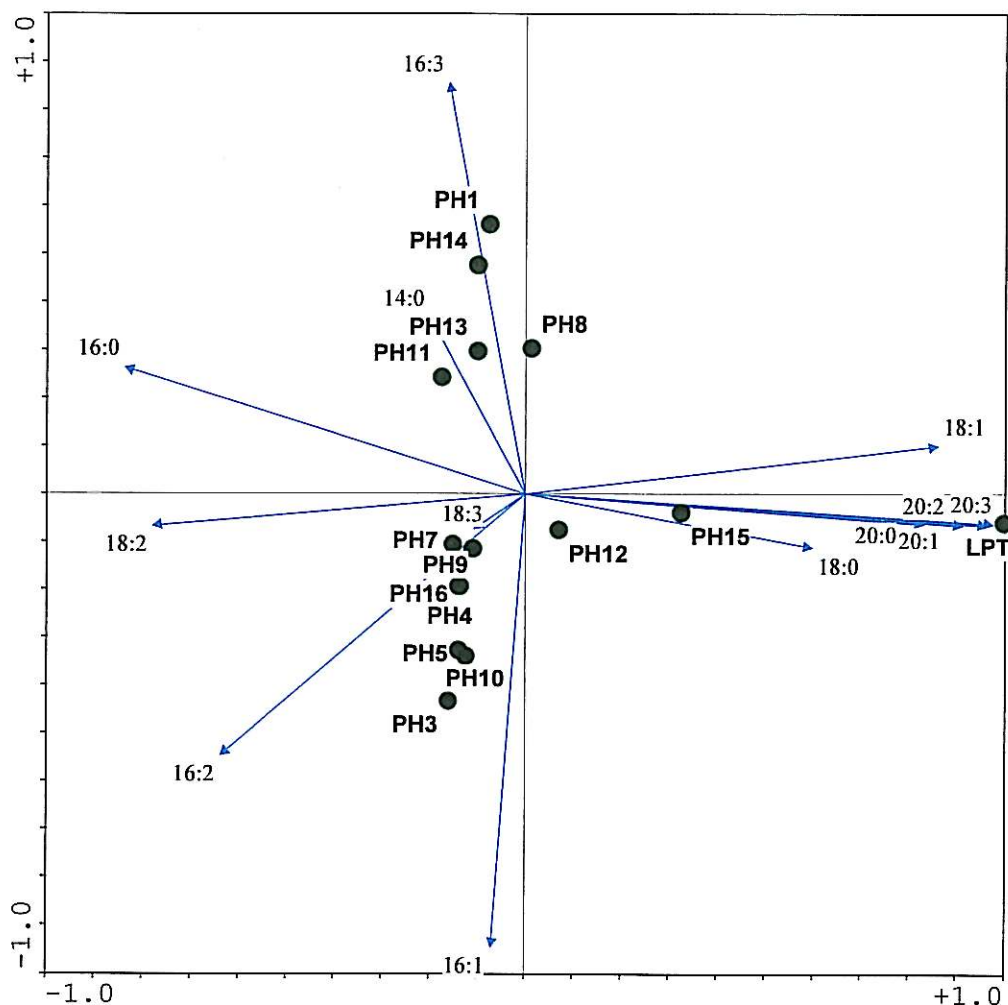


Obr. 16. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě procentuálního zastoupení zjištěných pigmentů.

Vyhodnocení těchto dat pomocí Cluster analysis (viz příloha, obr. 33.)

3.3.2 Analýza mastných kyselin

Analýzou mastných kyselin bylo určeno jaké typy se nachází ve sledovaných kmenech a jaké procentuální zastoupení tam mají. Kmeny PH2 a PH6 nebyly analyzovány (viz diskuse). Byly nalezeny tyto typy mastných kyselin - nasycené: 14:0, 16:0, 18:0 a 20:0; nenasycené: 16:3, 18:3, 20:3, 16:2, 18:2, 20:2, 16:1, 18:1, 20:1. Procentuální zastoupení je v (příloha, tab. 10.). Porovnání procentuálního zastoupení u kmenů *Phormidium autumnale* je zobrazeno pomocí ordinačního diagramu (obr. 17.)

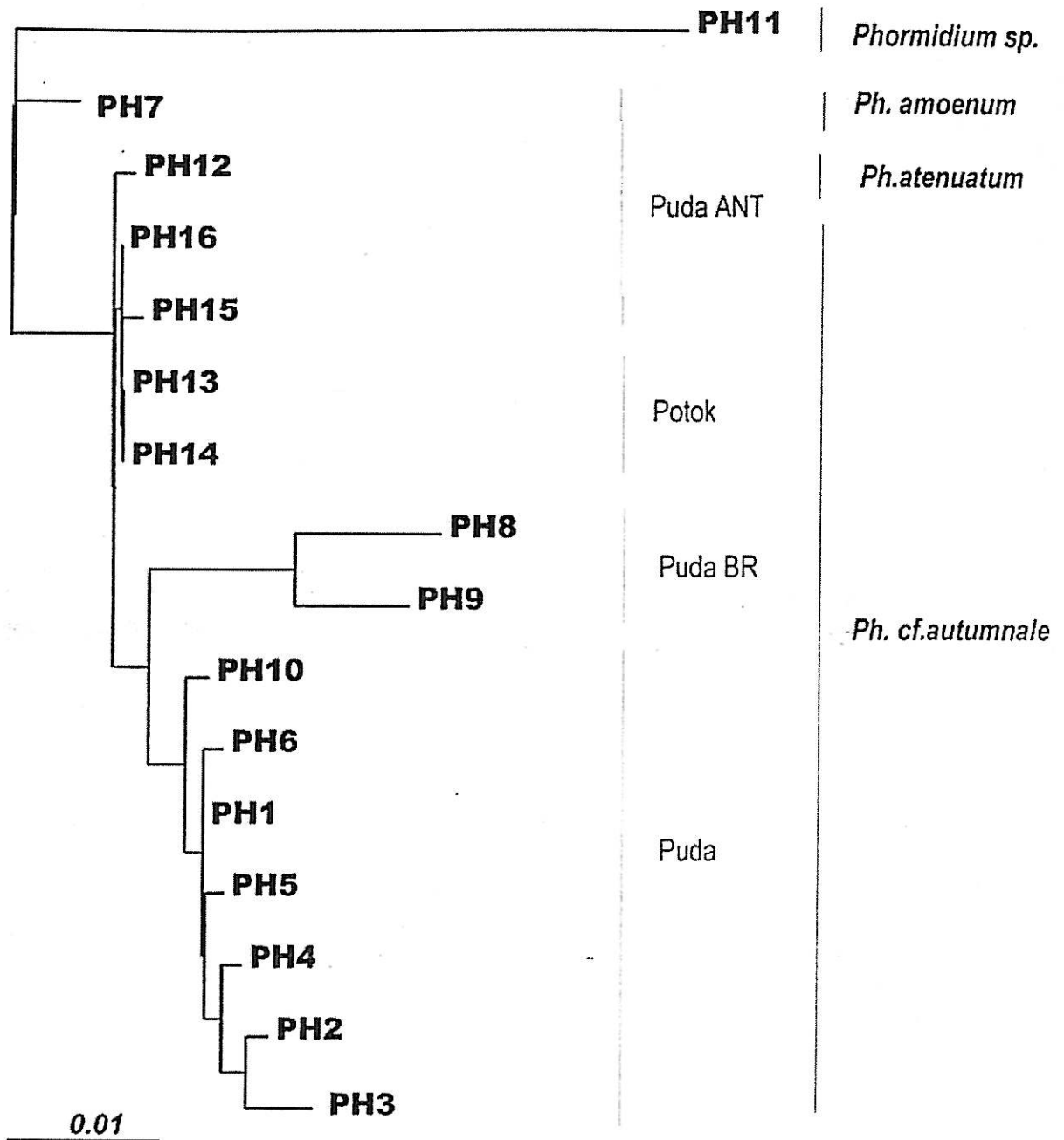


Obr. 17. Porovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě procentuálního zastoupení zjištěných mastných kyselin .

Vyhodnocení těchto dat pomocí Cluster analysis (viz. příloha , obr.32.)

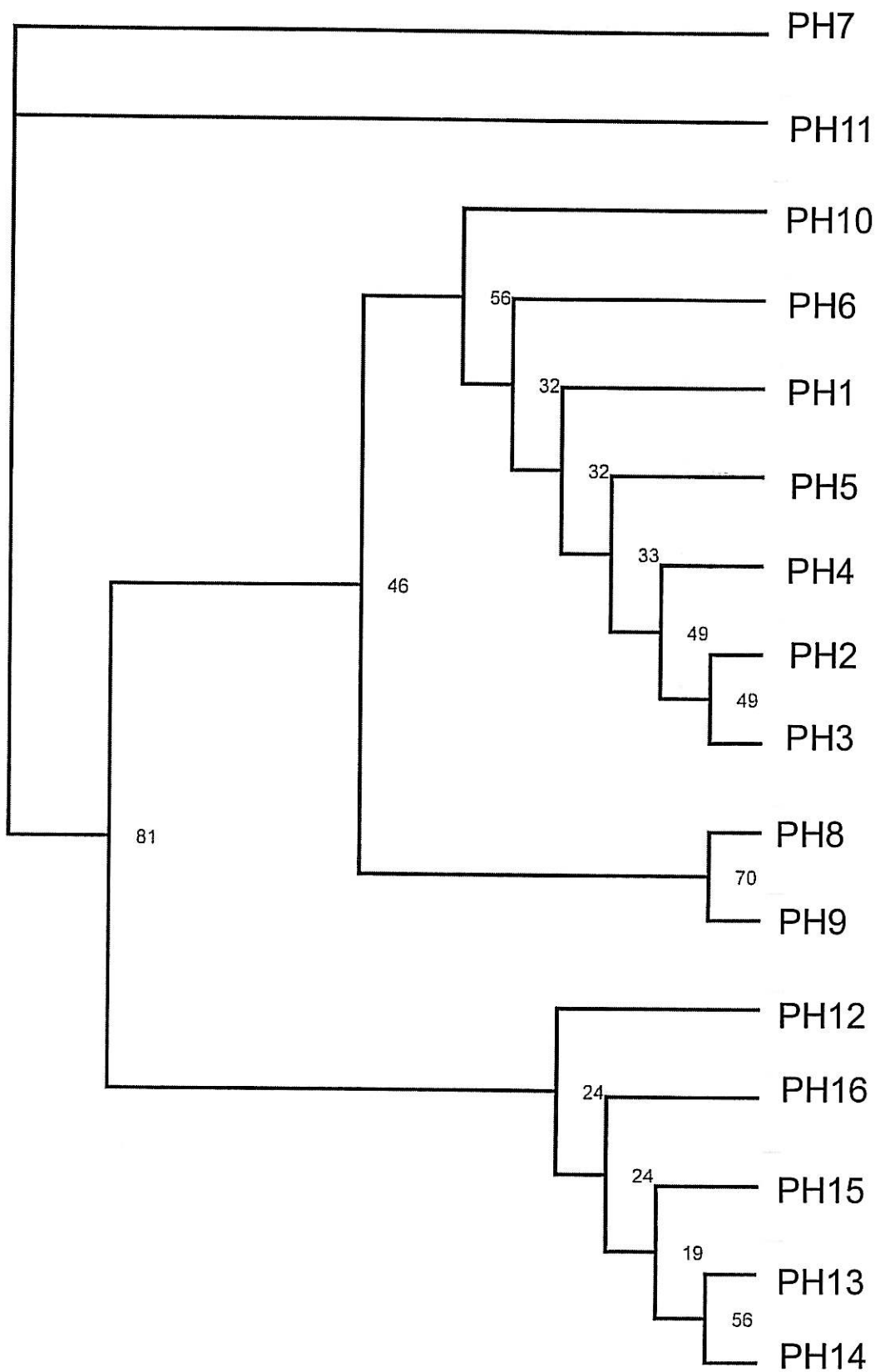
4. Molekulární analýza

Amplifikovaný 16S – 23S ITS byl pro každý kmen (kmen LPT nebyl molekulárně stanovován) štípnán 9 restrikčními enzymy (viz metodika). Pro vyhodnocení rozdílů mezi kmeny byla z výsledků tohoto štěpení vytvořena matice a pomocí programu PAUP v. 4,0b8 a podmínek nastavených pro RFLP (viz metodika) zobrazen diagram vyjadřující fylogenetickou blízkost jednotlivých kmenů. Jako “outgroup” byl nastaven kmen PH11.



Obr. 18. Výsledný dendrogram sledovaných kmenů *Phormidium autumnale* s. l.

Vyjádření procentuální podpory pro umístění kmenů do diagramu ukazuje obr. č. 19.



Obr. 19. Dendrogram vyjadřující procentuální podporu rozdělení kmenů

5. Závěry a diskuse

5.1. Sběr a kultivace

Prvotním úkolem této práce bylo shromáždit co nejvíce kmenů z okruhu druhu *Phormidium autumnale* s. l. , pokud možno vlastním sběrem a udržet je v kultuře. Ukázalo se, že najít v přírodě tyto kmeny s následnou izolací je poměrně obtížné. Typické *Phormidium autumnale* s. s. z tekoucích vod (z jezů) nalezeno bylo, ale nepodařilo se jej trvale kultivovat. Bylo proto nutné použít kmen ze sbírky z Botanického Ústavu AV v Třeboni (CCALA) (PH14). Z této sbírky je i kmen PH 10 a PH 6. Ostatní studované kmeny byly sbírány v rozmezí 2 – 3 let a jsou výsledkem více či méně úspěšné kultivace. Kmeny jsou výrazně náchylné k přerůstání bakteriemi, houbami a to i přes práci v maximálně sterilním prostředí. Vysvětlením může být přežívání bakterií (a asi i spór hub) v pochvách jednotlivých vláken. Rychlost s jakou je kultura znečištěna souvisí také s výraznou motilitou vláken. Pěstované kultury byly napadány roztoči a čerstvé vzorky obsahovaly velké množství háďátek. Sinice jim sloužily jako potrava a kultury byly tímto žracím tlakem decimovány. Odstranit bakterie z kultur se nikdy nepodařilo a proti houbám, roztočům a háďátkům se ukázalo jako účinné časté sterilní přeočkovávání a obalování Petriho misek parafilmem. Díky všudypřítomným bakteriím se nepodařilo vytvořit axenické kultury. Castenholz (1992) udává, že méně než 5% sinic je úspěšně kultivováno a jen malá část z nich je axenická. Pro molekulární analýzy se podařilo získat primery specifické pro sinice a nebylo tudíž nutné mít axenické kultury. Získané kmeny z různých geografických oblastí a biotopů měly odlišné nároky na kultivace. Především antarktické a arktické druhy byly (ze začátku) obtížně kultivovatelné. Ze získaných druhů v blízkosti *Phormidium autumnale*, jako *Ph. favosum*, *Ph. setchellianum*, *Ph. pseudopristleyi*, *Ph. amoenum*, *Ph. attenuatum*, nakonec přežily jen poslední dva jmenované druhy. Obtížnost kultivace tkví právě v konfliktu mezi odlišnými nároky kmenů na kultivaci a snahou udržet alespoň částečně srovnatelné podmínky pro všechny studované kmeny. Vliv kultivace na biochemii sinic (De Loura et al. 1986) i morfologii (Komárek 1972) je znám. Navíc se zdá, že srovnatelné podmínky kultivace unifikují u kmenů, patřící k jednomu genotypu, řadu vlastností, které v původním biotopu byly odlišné a dochází k tomu poměrně rychle (Šabacká 2002).

5.2. Ultrastruktura

Transmisní elektronová mikroskopie potvrdila na základě stavby thylakoidů zřejmou příslušnost všech sesbíraných kmenů k čel. Phormidiaceae. U všech řezů PH kmenů bylo zjištěno radiální uspořádání thylakoidů. U Kmene LPT ("outgroup") bylo zjištěno parietální uspořádání. Anagnostidis et al. (1988) počítal hustotu thylakoidů a snažil se i tento znak použít jako důkaz různosti kmenů. Mezi pozorovanými kmeny v této práci byly také patrné rozdíly mezi kmeny: např. PH3 má jasně hustší uspořádání thylakoidů než ostatní kmeny a kmeny PH6 a PH14 mají i strukturálně jiné thylakoidy (viz příloha, obr. 20. – 23.) Kmen PH 14 byl nařezán znovu a výsledek potvrdil jiný tvar thylakoidů. Zdá se však, že vliv na tyto detaily ve struktuře thylakoidů mají spíše příprava vzorku či kultivace. Podobně se zdá, že i struktura a síla pochvy jsou velmi variabilní a nejde je brát jako trvalý znak, vhodný k odlišení kmenů od sebe. Totéž platí pro jiné ultrastrukturní znaky (např. množství polyfosfátových či škrobových zrn).

5.3. Molekulární analýza

Klasifikace založená pouze na pozorování morfologických a cytologických struktur nemusí nutně odrážet průběh evoluce (Rudi et al. 1997). V této práci byla proto použita metoda RFLP ve snaze zjistit příbuzenské vztahy mezi sledovanými kmeny. Rozdělení kmenů na základě této metody ukazuje jasně tři bazální větve. Kmen PH11, který zde sloužil jako "outgroup", kmen PH7 a ostatní kmeny. Skupina ostatních kmenů byla, za vysoké procentuální podpory (81%), rozdělena na vysloveně půdní typy a na typy z tekoucích vod plus kmeny z Antarktidy. V těchto dvou skupinách jsou si kmeny velmi příbuzné a rozdělení do dendrogramu je na malé procentuální podpoře a může být náhodné. Ve skupině půdních typů se oddělují, ovšem na nízké procentuální úrovni (45%) kmeny z Brazílie (PH8 a PH9) a toto rozdělení není podpořeno žádnou z klasických metod. Zajímavé je, že rozdělení (s podporou 81%) na dvě skupiny kmenů nemá také podporu v žádné doplňující analýze dělané v této práci. Jako vysvětlení jsou možné jen dva náhledy, buď toto rozdělení (tyto odlišnosti) na molekulární úrovni nelze

klasickými metodami (morfologie, biochemie, ultrastruktura) zjistit, (podobně studie na r. *Leptolyngbya*, Payne et al. 2001) nebo metoda RFLP je příliš citlivá a rozděluje kmeny na úrovni nižší než druh popř. byla udělána jiná chyba. Bylo by dobré u těchto kmenů provést sekvenaci 16S RNA.

Odlišení kmene PH11 bylo očekáváno. Jeho morfologická odlišnost je viditelná a jde o *Phormidium* sp. (tedy kmen, který do skupiny *Phormidium autumnale* s. l. – group nepatří). Při výběru kmenů do této práce to nebylo zřejmé. Nicméně kmen posloužil výborně jako druhý “outgroup”. Je zajímavé sledovat tento kmen i v dalších srovnáních. Dále se ukázalo jako zajímavé, že *Phormidium amoenum* (kmen PH7) a *Phormidium attenuatum* (kmen PH12), tedy druhy svým počátečním určením předpokládané jako nejvzdálenější, dopadly v analýzách a srovnáních odlišně. Kmen PH7 vychází, ve většině srovnání odlišně, naproti tomu kmen PH 12 vychází ve skupině velmi podobných typů *Phormidium autumnale*. Otázka je, zda kmen PH7, určený jako *Phormidium amoenum* je skutečně tento druh. Šířka vlákna *Phormidium amoenum* je udávána 2,5 – 5 μm a výskyt teplé oblasti (tropy), ale i Čechy (Anagnostidis & Komárek in press). Námi sledované *Ph. amoenum* je ze Špicberk a jeho průměrná šířka vlákna je 7,85 μm . V paralelní práci Šabacké (2002), která studovala vliv odlišných světelných a tepelných podmínek na sinice, bylo zjištěno, že sinice rostoucí za jiných tepelných a světelných podmínek měli statisticky průkazně odlišnou šířku vlákna. Je tedy možné, že šířka vlákna kmene *Phormidium amoenum* ze Špicberk je výsledkem právě jiných okolních podmínek (než např. v tropech). Zde ovšem nastává závažná otázka jestli je šířka vlákna ještě stále vhodný znak pro rozlišení do druhů a co vlastně je vhodný znak. Jelikož se tento kmen na základě metody RFLP odlišuje od skupiny *Phormidium autumnale*, zda se mi rozumné tento druh pojmenovat nově a nebo přehodnotit diagnózu druhu *Phormidium amoenum*.

Zajímavé je rozdělení těchto kmenů podle biotopů nebo země jejich původu. Kmeny podobných biotopů vyšly blízko sebe i přesto, že sledované kmeny jsou geograficky velmi rozdílné. Lehtimäki et al. (2000) konstatuje, že geograficky rozdílné kmeny r. *Nodularia* jsou si velmi blízce příbuzné. Podobné výsledky byly získány také u r. *Microcystis* (Neilan et al. 1997a). Zvláštní je pouze zařazení půdních kmenů z Antarktidy (u kmenů PH15 a PH16 se neví přesná charakteristika místa jejich nálezu) ke kmenům

z potoků. Toto rozdělení není podpořeno žádnou z dalších analýz (morfologie, biochemie, ultrastruktura).

5.4. Morfologie

Na základě podnětu článku Thomase (1969) a vlastních dřívějších pozorování byly kmeny srovnávány také podle makronárustu sinice na Petriho misce s agarem. V průběhu dvou let, kdy byly kmeny kultivovány, bylo provedeno mnoho přeočkování a charakter makronárustu zůstal stále stejný. Nejvíce převládal typ popsáný jako typický (a asi myšleno i jediný typ) pro *Phormidium autumnale* (Thomas 1969). Jde o charakteristické vrtulovité točení vláken proti směru hodinových ručiček tzv. typ "V". Čím byl koncentrovanější agar, struktura vláken byla výraznější. I v tomto bylo potvrzeno studium Thomase (1969). Ovšem některé kmeny si udržovaly charakteristickou strukturu, která se od výše popsané liší. Pro kmeny PH5 a PH1 byla charakteristická radiální struktura („R“). Oba tyto kmeny jsou z vysychajících kaluží, jeden z Turecka a druhý z Čech. Kmen PH4 má přechodový charakter makronárustu, je na pomezí „R“ a „V“ struktury. Je to půdní typ z Čech. V dendrogramu analýzy RFLP vychází tyto kmeny také vedle sebe. Pro kmeny PH8, PH9 (BR), PH10 (CH), PH15 (ANT), PH7 (SPI) byla typická prstýnkovitá struktura („P“). Sinice na agaru tvořila prstýnky, jejichž hustota se během přeočkovávání různě měnila a lišila se i mezi kmeny. Zdá se, že tyto kmeny jsou opět z ekologicky podobného prostředí. Jde o málo, ale stále zaplavenou půdu či litorál rybníka. Bohužel většina těchto kmenů byla získána prostřednictvím jiné osoby a přesná charakteristika odebíraného místa není známa. Struktura makronárustu na pomezí „V“ a „P“ byla zjištěna u kmene PH11. U kmene LPT byla struktura makronárustu odlišná, tato odlišnost byla způsobena pravděpodobně užší šířkou vlákna. Zdá se, že makronárůst souvisí s biotopem, kde určitý kmen roste a vypovídá o něm, ale pro klasifikaci do druhů je tento znak příliš variabilní. Pro určení ekotypů je to znak dobrý.

Jak ukázaly výsledky, na základě kvantitativních znaků lze kmeny poměrně dobře od sebe odlišit. Šířka vlákna byla považována vždy za konzervativní znak (Kann et Komárek 1970; Anagnostidis et al. 1988; Komárek 1972) a zjištěné výsledky za objektivní (na

rozdíl od kvalitativních znaků). Práce M. Šabacké (2002) to dost zpochybňuje. Délka buněk, další ze znaků, který byl měřen, je používán pro morfologické odlišení různých kmenů už méně. Srovnání kmenů podle průměrné délky buněk je velmi zkreslující, a to i při velkém počtu měření. Z praktického hlediska totiž nikdy přesně nevíme, v jaké fázi růstu jsme buňku změřili. Dobrou výpovědní hodnotu mají maximální a minimální délky konkrétního kmene. Maximální délka vypovídá, kam až může buňka u konkrétního kmene dorůst a minimální délka vypovídá o velikosti buňky těsně po rozdělení. Tyto hodnoty by měly být poměrně stálé. V této práci byla měřena také kalyptra a šířka vlákna pod kalyptrou. Šířka kalyptry je stálý znak, ale je nutno měřit pouze zralá vlákna. Počet měření je tím dost omezený.

Rozdíly mezi sledovanými kmeny ve všech výše zmiňovaných znacích vyšly statisticky průkazně. Statistické srovnání bylo děláno bez kmene LPT (Leptolyngbya), ale grafické vyjádření je včetně tohoto kmene. Kmen LPT se ve všech měřeních výrazně odlišoval a tím potvrdil, že použití tohoto kmene jako "outgroup" bylo správné. Z výsledků vyplývá, že kmeny, které byly na základě metody RFLP odlišené na první a druhé bazální úrovni od ostatních, jsou odlišeny i na základě morfologického srovnání. Ze sledovaných kmenů jde jen o dva kmeny. Kmen PH 11, který se viditelně odlišuje, a který podle dalších morfologických znaků vychází mimo okruh druhu *Phormidium autumnale*. Jde o *Phormidium* sp., které je užší a nevytváří klasickou kalyptru, což ukazují i výsledky ze srovnání šířky vlákna a kalyptry (obr. 6. a obr. 10.) a navíc rozdíl mezi šířkou vlákna a šířkou vlákna pod kalyptrou, neboli velikost zúžení, byla u tohoto kmene zjištěna nejmenší (obr. 12.). Tedy pouze u kmene PH11 a kmene LPT byla zjištěna průměrně větší délka buněk než jejich šířka. Tento znak je obvyklý v čeledi Pseudanabaenaceae, u rodu *Phormidium* (u kmene PH 11 je potvrzena radiální struktura thylakoidů) je tento znak méně častý a vylučuje zařazení tohoto druhu do okruhu druhu *Phormidium autumnale* s. l.

Druhým odlišným kmenem je kmen PH7, který je ve všech měřených znacích širší než ostatní kmeny (kromě délky buněk). Výjimkou je pouze kmen PH16, který vychází v těchto měřeních dost stejně. Ovšem kmen PH16 byl molekulární analýzou zařazen mezi velmi si podobné kmeny *Phormidium autumnale*. Ani pomocí kombinace kvalitativních a kvantitativních znaků nelze tyto dva kmeny odlišit, na rozdíl od kmene PH 11, který i podle těchto znaků vychází odděleně, jak metodou single linkage (obr. 15.), tak metodou

complete linkage (viz příloha, obr. 31.). Rozpoznání těchto dvou kmenů (dvou blízkých druhů : autumnale a „amoenum“ (viz diskuse 5.3.) na úrovni světelného mikroskopu není možné.

U ostatních kmenů (kromě LPT, PH11 a PH7) nebylo potvrzeno, na základě morfologie, rozdělení do dvou skupin, jako to rozdělila molekulární analýza. Výsledná skupina kmenů, která vznikla spojením kvalitativních a kvantitativních dat, ukazuje, že mezi těmito druhy je rozdílnost velmi malá a rozhodně nepostačuje k rozdělení do druhů. Tyto kmene jsou více či méně odlišné morfo a ekotypy (včetně kmene PH12, určeného jako *Phormidium attenuatum*)

Morfologická data nekorelují s biotopy a místy původu téměř vůbec (obr. 14.). Kmeny z různých biotopů se odlišují pouze mírně a nejvýrazněji je to vidět u výše zmiňovaného makroskopického vzhladu kolonie. V ostatních kritériích je nejednotnost např. půdní kmene mají rozdíl v šířce vlákna až 2 μm , kmene z kaluží 1 μm a potoční kmene 0,5 μm . Opět se zdá, že šířka spíše závisí na podmínkách konkrétního místa. Srovnání kmenů pomocí kvalitativních dat (viz příloha, tab. 4) je v taxonomických studiích poměrně časté (Anagnostidis et al. 1988), přestože jde o velmi subjektivní posouzení. Výběr srovnávaných znaků musí být velmi citlivá a promyšlená záležitost, založená na předešlém studiu a přípravě. V praxi to často není tak snadné. I v této práci se vypovídací hodnota jednotlivých znaků různí a toto srovnání bylo bráno jen jako doplňkové. Přesto toto srovnání spojené s kvalitativními znaky vyjádřené na obr. č.15 oddělilo LPT kmen a kmen PH11. Naopak PH7, PH16 byly tímto srovnáním zahrnuty do skupiny velmi podobných druhů.

5.5. Biochemie

Analýza pigmentů a mastných kyselin byly zamýšleny jako metody, které přinesou doplňující informace k základní molekulární a morfologické studii. Citlivost těchto analýz na podmínky přípravy a kultivaci je známá (Hirschberg et Chamovitz 1994). Přesto jsou různé biochemické analýzy v taxonomii používány (např. produkce nodularinu Lehtimäki et al 2000), např. i k rozlišení na úrovni rodů (Skulberg et al. 1985). I v této práci byla snaha pokusit se o srovnání na úrovni biochemie a skutečně bylo potvrzeno , že kvalita i kvantita (procentuální zastoupení) pigmentů dobře slouží

k rozlišení rodů. Kmen LPT byl na obou úrovních odlišný (viz příloha, tab. 9.; obr. 33.). Analýza pigmentů (karotenoidů a chlorofylu a) může být pro rozlišení na nižší taxonomické úrovni problematická až zavádějící. Absolutně to však říci nelze, přesto, že v této práci se výsledky této metody neshodují s ostatními výsledky a nedávají potřebnou doplňující informaci. Např. Suda et al. (2001) zahrnuje analýzu pigmentů (fykobilinů) do skupiny metod, které slouží k rozlišení kmenů r. *Planktotrix* na nižší úrovni než rodové.

Poměr karotenoidů a chlorofylu a (viz příloha, tab. 9.) vychází pro kmeny z podobných biotopů či oblastí jinak a není vidět žádnou souvislost. Shluky kmenů v ordinačním diagramu jsou nelogické a jen potvrzují, že data, ze kterých je tento diagram odvozen, nemají pro tuto taxonomickou úroveň dobrou vypovídací hodnotu. Odděluje se pouze kmen LPT. Velmi zajímavé je, že při opakování stejné analýzy u stejného kmene vychází výsledky odlišně (viz příloha, chromatogram č.3 a chromatogram č.3a). Není jisté, zda jde o složení pigmentů stresovaného kmene nebo skutečně o odlišné složení pigmentů. Fresnedo et al. (1991) uvádí hlavní karotenoidy zastoupené u sinic: β -carotene, nostoxanthin, echinenon (unikátní pro sinice), myxoxanthophyl a zeaxanthin. Hirschberg et Chamovitz (1994) nezmiňují nostoxanthin a přidávají canthaxanthin. V této práci nebyl zjištěn echinenon, ostatní hlavní karotenoidy dle Hirschberga & Chamovitze (1994) byly zjištěny. Navíc byly zjištěny estery astaxanthinu a alomer chlorofylu a. Ovšem determinace pigmentů na základě retenčních časů a tvaru křivky je subjektivní a může být nepřesné. Především v případě determinace málo běžného pigmentu může dojít k jeho opomenutí či zahrnutí do šumu. Kmeny PH1 a PH2 při analýze pigmentů nebyly analyzovány pro jejich nedobrou stav v kultivaci, obdobně tomu bylo při analýze mastných kyselin u kmenů PH2 a PH6. Při kultivaci bylo obtížné synchronizovat růst kmenů tak, aby ve stejném období měli podobné optimální podmínky.

Velmi podobně je to u analýzy mastných kyselin, jak v případě jejich determinace, tak kvantitativních výsledků. Při klesající teplotě by mělo být vyšší procentuální zastoupení nenasycených mastných kyselin (Baasch 1984). Výsledky procentuálního zastoupení nenasycených mastných kyselin u kmenů z Antarktidy a Arktidy, kultivované při 9 °C, se vůči ostatním kmenům nijak neliší, ale mezi sebou se liší docela viditelně (viz příloha tab. 10). Strádání nedostatkem dusíkem (De Loura et al. 1986) i světelné podmínky (Döhler & Datz 1980) ovlivňují složení mastných kyselin. Změny ve složení mastných

kyselin, způsobené těmito podmínkami pro srovnání na rodové úrovni nehrají takovou roli, jako pro srovnání na nižší taxonomické úrovni. Analýza mastných kyselin se ukázala jako výhodná pro studium jednoho kmene testovaného při více podmínkách (těchto studií je nejvíce). I přes tyto výsledky se Nübel et al.(1998) přiklání k použití více přístupů, které mohou doplnit základní studii, i když připouští, že to může být v některých případech kontraproduktivní .

6. Souhrn

Pomocí molekulární analýzy (metody RFLP) a klasických analýz (morfologie, biochemie a ultrastruktura) bylo zjištěno, že všechny studované kmeny z okruhu *Phormidium autumnale* (podle fenotypových kritérií) patří do čeledi *Phormidiaceae*, Kmen LPT (čel. *Pseudanabaenaceae*), který v této studii byl použit jako "outgroup" byl ve všech srovnáních odlišný (včetně analýz biochemických). Ze skupiny kmenů r. *Phormidium* byl odlišný od ostatních kmen PH11 a to na základě molekulárních a morfologických srovnání. Tento kmen nepatří do okruhu druhu *Phormidium autumnale* a nebyl následně určený na druhové úrovni (*Phormidium* sp). Kmen PH 7 určený jako *Phormidium amoenum* byl na základě analýzy pigmentů (to je ale diskutabilní) a metody RFLP oddělen od ostatních kmenů, ovšem na základě morfologie odlišný nebyl (i když u něj byla zjištěna největší průměrná šířka vlákna). Navíc jde asi o jiný druh než *Phormidium amoenum*. Je možné uvažovat, zda už to není morfotyp *Phormidium autumnale* s. l. Molekulární analýzou oddělené (81%) dvě skupiny kmenů *Phormidium autumnale* (PH12,13,14,15,16) a (PH1,2,3,4,5,6,10,9,8), nebyly jinou analýzou potvrzeny. Kmeny PH8 a PH9 se odlišují (45%) také na základě molekulární analýzy, ale morfologicky rozlišitelné nejsou. Rozlišení do druhu by mělo být vždy podpořeno morfologií a molekulární analýzou. V případě podpory jen jednoho kritéria, jde o morfotypy a ekotypy, jejichž taxonomické označení je dosud sporné.

Tedy kmeny morfologicky odlišitelné jsou jasně odlišené i na úrovni molekulární (LPT,PH11). Ostatní méně morfologicky odlišitelné kmeny jsou rozlišeny na molekulární úrovni s malou procentuální podporou a všechny tyto kmeny by měly být považovány (včetně *Phormidium attenuatum*) za morfotypy patřící do skupiny *Phormidium*

autumnale s. l. - group. Tyto skupiny mohou být velmi široké a zdá se zbytečné je více dělit na druhy. Ovšem stanovit co je druhový znak je otázka konvence a u sinic snad i otázka definice druhu.

Biochemické analýzy se ukázaly jako nevhodné pro taxonomické srovnávání na této úrovni z důvodů citlivosti pigmentů a mastných kyselin na změny podmínek při kultivaci a na přípravě vzorku .

Makroskopický vzhled kolonie sinice je zajímavým znakem charakterizujícím biotop dané sinice, nikoli dobrým znakem pro taxonomické rozdělení na jakékoli úrovni. Závěrem lze tedy konstatovat, že *Phormidium autumnale* s. l. – group je druh se širokou ekologickou a morfologickou variabilitou, který se rozpadá na velké množství eko – a morfotypů, mezi nimiž zatím nebyly nalezeny jakékoliv jasné hranice a charakteristická kritéria.

V posledním vydání Bergey's manuál (2001) byl rod *Phormidium* zcela vynechán. Předpokládám, že příčinou je absence kmenů *Phormidium* ve sbírkách a málo experimentálních prací na tomto rodě. Nicméně já si myslím, také na základě této práce, že výskyt rodu *Phormidium* v systému sinic je oprávněný. Všechny analýzy dělané v této práci rod *Phormidium* výrazně odlišily od rodu *Leptolyngbya*.

7. Literatura

- Anagnostidis, K. & Komárek, J.** (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3 – Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol./Algol. Stud.* **50 – 53**: 327 – 472.
- Anagnostidis, K., and Komárek, J.** (1985): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1. Introduction. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **71**: 291 – 302.
- Anagnostidis, K., Economou – Amilli, A. & Makris, K.** (1988): On the morphotypes of *Phormidium boryanum* (Bory ex Gom.) Anagn. et Kom. and *Phormidium janthiphorum* (Fior. – Mazz. ex Gom.) Elenk. A taxonomic consideration. *Arch. Hydrobiol./ Algol. stud.* **50 – 53**: 71 – 91.
- Anonymous** (1996): *Statistika for Windows*. [Computer program manual] – Statsoft, Tulsa, OK.
- Asencio Martinez, A., Schmit C., Hoffmann L.,** (1998) : Taxonomy of the genus *Scytonema* : Morphological, biochemical and molecular approaches. - Abstract of 14-th IAC Symposium, Lammi, Finland.
- Baasch, K.H., Kohlhase, M. & Pohl, P.** (1984): Axenic mass culture of prokaryotic and eukaryotic microalgae and lipid production: influence of the temperature and of the nitrate concentration in the nutrient medium. *Dev. Plant Biol.* **9**: 587 – 590.
- Bosli-Pavoni, M.** (1970): Über die Verleitung von Phormidien in modellfliessgewässern (abstr.). In: Zehnder A. *Schweiz z. Hydrol.* **32**: 486
- Boyer, S.L., Flechtner V. R. & Johansen J. R.** (2001): Is the 16S – 23S r RNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* **18** (6): 1057 – 1069.
- Carr, N. G. & Whiton, B. A.** ed. (1973): *The biology of bluegreen algae*. Blackwell Sci. Publ., Oxford – London – Edinburgh – Melbourne, 676pp.
- Carr, N. G. & Whiton, B. A.** ed. (1973): *The biology of Cyanobacteria*. Bot. monographs 19, Blackwell Sci. Publ., Oxford – London – Boston - Edinburgh – Melbourne, 686pp.
- Castenholz, R. W.** (1992): Species usage, concept and evolution in the cyanobacteria (blue – green algae). *J. Phycol.* **28**: 737 – 745.
- Castenholz, R. W.** (2001): Phylum B.X. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone D. R. & Castenholz R. W. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, sec. ed. Springer, 473 – 599pp.
- Castenholz, R.W. & Waterbury, J.B.** (1989a): Oxygenic photosynthetic bacteria, group I. Cyanobacteria, p. 1710 – 1728. In Staley J. T., Bryant M.P., Pfennig N. & Holt J.G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Davey, M. C. & Clarke K. J.** (1992): Fine structure of terrestrial cyanobacterial mat from Antarctica. *J. Phycol.* **28**: 199 – 202.
- Davey, M. C. & Rothery, P.** (1993): Primary colonization by microalgae in relation to spatial variation in edaphic factors on Antarctic fellfield soils. *J. Ecology* **81**: 335 – 343.
- De Loura, I.C., Dubacq, J.P. & Thomas, J.C.** (1986): The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of Cyanobacteria. *Plant Physiol.* **83**: 838 – 843.

- Döhler, G. & Datz, G.** (1980): Effect of light on lipid and fatty acid composition of Cyanobacteria *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Z Pflanzenphysiol.* Bd. 100: 427 – 435.
- Drouet, F.**, (1981): Revision of the *Stigonemataceae* with a summary of classification of the blue – green algae. - *Beih. Nova Hedwigia*, 66. – Vaduz: Cramer. *In* Turner, S., *Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria*. *Plant Syst. Evol.*, Suppl. 11: 13 – 52.
- Fork, D. C., Murata, N. & Sato, N.** (1978): Effect of growth temperature on lipid and fatty acid composition, and the dependence on temperature of light-induced redox reactions of cytochrome f and of light energy redistribution in the thermophilic blue – green alga *Synechococcus lividus*. *Plant Physiol.* 63: 524 – 530.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. & Jurtshuk, jr. P.** (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *J. of Syst. Bacteriol.* 42: 166 – 170.
- Fresnedo, O., Gomez, R. & Sera, J.L.** (1991): Carotenoid composition in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*, Effect of nitrogen starvation. *FEBS Letters* 282: 300 – 304.
- Fritsch, F. E.** (1945): *The structure and reproduction of algae*, II. – The Univ. Press, Cambridge, 939pp.
- Garcia-Pichel, F., López-Cortéz, A. & Nübel, U.** (2001): Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Appl. And Envir. Microbiology* 67: 1902 – 1910.
- Geitler, L.** (1932): *Cyanophyceae*. *In*: Rabenhorst's *Kryptog.* – Fl. 14, Akad. Verlagsges., Leipzig, 1196pp.
- Geitler, L.** (1960): *Schizophyceen*. Gebr. Borntraeger, Berlin, 131pp.
- Gomont, M.**, (1892): *Monographie des Oscillariées*. – *Ann.Sci.Nat., Bot.* 7, Ser.15: 263 – 368, 16: 91 – 264.
- Hayes, P.K. & Barker, G.L.A.** (1997): Genetic diversity within Baltic Sea populations of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J Phycol.* 33: 919 – 923.
- Herdmann, M., Iteman I., Rippka, R. & Tandeau de Marsac, N.** (1998) : The phylogeny of cyanobacteria . - Abstract of 14-th IAC Symposium, Lammi, Finland.
- Hernández – Mariné, M.** (1996): Electron microscopic characterization of *Microcoleus chthonoplastes* Thur.(Cyanobacteria). *Arch. Hydrobiol./Algol. Stud.* 83: 347 – 365.
- Hirschberg, J. & Chamovitz, D.** (1994): Carotenoids in Cyanobacteria. *In* Bryant. D. A. (Ed.): *The molecular biology of Cyanobacteria*, pp. 559 - 579, The Netherlands: Kluwer
- Hoiczky, E.** (1998): Structural and biochemical analysis of the sheath of *Phormidium uncinatum*. *J. Bacteriology* 180: 3923 – 3932.
- Hoiczky, E.** (2000): Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriology* 182: 1191 – 1199.
- Hoiczky, E. & Baumeister, W.** (1995): Envelope structure of four gliding filamentous Cyanobacteria. *J. Bacteriology* 177: 2387 – 2395.
- Honda D., Yokota A. & Sugiyama J.** (1999): Detection of seven major evolutionary lineages in Cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Evol.* 48: 723 – 739.

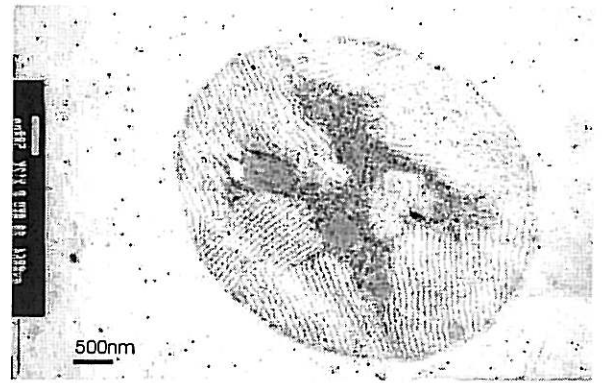
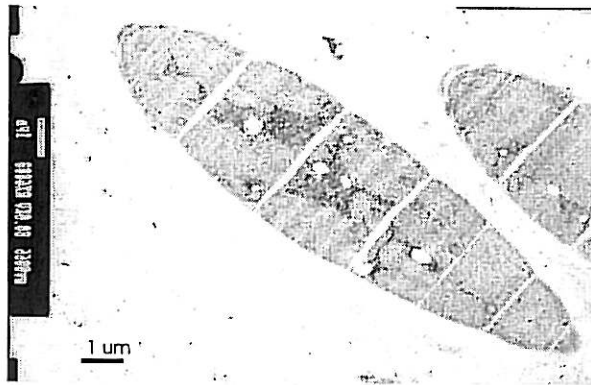
- Ishida, T., Yokota, A., Sugiyama, J. (1997): Phylogenetic relationship of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**: 237 – 241.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N., & Herdman, M. (2000): Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* **146**:1275-1286.
- Kann, E. & Komárek, J. (1970): Systematisch-ökologische Bemerkungen zu den Arten des Formenkreises *Phormidium autumnale*. - 5.Symposium über Cyanophytensystematik, Hydrologie, 495 – 518..
- Komárek, J. (1972): Temperaturbedingte morphologische Variabilität bei drei *Phormidium* – Arten (Cyanophyceae) in Kulturen. *Preslia* **44**: 293 – 307.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. (in press) : Cyanoprokaryota - 2, Oscillatoriales. Süswasserflora von Mitteleuropa, Spectrum – Verlag, Heidelberg.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. *Arch. Hydrobiol./ Algol. Stud.* **56**: 247 – 345.
- Komárek, J. & Kaštovský, J. (2002): Combined molecular and phenetic aspects of the modern phylogenetic classification of cyanobacteria.
- Kopecký, J., Schoefs, B., Loest, K., Štys, D. & Pulz, O. (2000): Microalgae as a source for secondary carotenoid production: a screening study. *Arch. Hydrobiol./Algological Studies* **98**: 135 – 168.
- Lehtimäki, J., Lyra, Ch., Suomalainen, S., Sundman, P., Rouhiainen, L., Paulin, L., Salkinoja – Salonen, M. & Sivonen, K. (2000): Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic method. *Inter.J. of System. and Evolut. Microbiology* **50**: 1043 – 1053.
- Li R. & Watanabe, M.M. (1998) : The taxonomic studies on water-bloom forming species of *Anabaena* (Cyanobacteria) based on morphological, physiological, biochemical and genetic characteristic. - Abstract of 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria, Beaufort, USA.
- Nelissen, B., De Baere, R., Wilmotte, A. & De Wachter, R. (1996): Phylogenetic relationship of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J. Mol. Evol.* **42**: 194 – 200.
- Nelissen, B., Wilmotte, A., De Baere, R., Haes, F., Van De Peer, Y., Neefs, J.M. & De Wachter, R. (1992): Phylogenetic study of cyanobacteria on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 206 – 210.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Kühl, M. & Muyzer, G. (1998): Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic Phototrophs in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 422 – 430.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Appl. And Environ. Microbiol.* **63**: 3327 – 3332.
- Nultsch, W. (1961) : Der Einfluss des Lichts auf die Bewegung der Cyanophyceen. I. Phototaxis von *Phormidium autumnale*. *Planta (Berlin)* **56** : 632 - 647 .
- Nultsch, W. (1962) : Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung der Cyanophyceen. II. Photokinesis bei *Phormidium autumnale*. *Planta (Berlin)* **57** : 613 -623.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M. M. (1998): 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 119 – 124.
- Palinska, K.A., Liesack, W., Rhiel, E. & Krumbein, W.E. (1996): Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial

- taxonomy demonstrated on *Merismopedia* – like isolates. Arch. Microbiol 166: 224 – 233.
- Payne, M.,C.,Johansen, J.,R.& Boyer, S.,L (2001): Taxonomic resolution of *Leptolyngbya* (Cyanophyta) utilizing the 16S rRNA gene sequence. – J. Phycol.,suppl. 37: 40
- Pfister, P. (1993): Seasonality of macroalgal distribution patterns within the reach of a gravel stream (Isar, Tyrol, Austria). Arch. Hydrobiol. 129: 89 – 107.
- Rippka, R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M & Stanier R. Y. (1978): Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gener. Microbiol. 111: 1 – 61.
- Rippka,R, Waterbury, J.,B. & Stanier, R.Y. (1981): Isolation and purification of Cyanobacteria : some general principes. - In Starr, M.,P.,Stolp, H.,Trüper, H.,G.,Balows, A. & Schlegel, H.,G.(eds.) : The Prokaryotes, vol.1, Springer Verlag, Berlin, 212-220.
- Rudi, K., O. M. Skulberg, F. Larsen & Jakobsen K. S. (1997): Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. Appl. And Envir. Microbiology, 63: 2593 – 2599.
- Skulberg,O. M. & R. Skulberg (1985): Planktic species of *Oscillatoria* (Cyanophyceae) from Norway. Characterization and classification. Arch. Hydrobiol./ Algol Stud. 38/39: 157 – 174.
- Spurr, A. R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.
- Stam, W.T. & Holleman, H.C. (1979) : Cultures of *Phormidium*, *Plectonema*, *Lyngbya* and *Synechococcus* (Cyanophyceae) under different conditions; their growth and morphological variability. Acta Bot. néerl. 28: 45-66.
- Stam, W.T. & Holleman, H.C. (1975): The influence of different salinities on growth and morphological variability of a number of *Phormidium* strains (Cyanophyceae) in culture. Acta Bot. Néerl. 24 : 379 - 390 .
- Stanier, R. Y. & Van Niel, C. B. (1962): The concept of the bacterium. Arch. Microbiol. 42: 17 – 35.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen–Bazire,G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). – Bacteriol. Rev. 35: 171-205.
- Staub, R. (1961): Ernährungphysiologisch–autökologische Untersuchungen an den planktonischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. – Schweiz. Z.Hydrol. 23: 82 – 198.
- Suda, S., Watanabe, M. M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai W., Nopartnaraporn N., Liu Y. & Day J.G. (2001): Taxonomic revision of waterbloom-forming species of Oscillatorioid Cyanobacteria. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol (in press).
- Šabacká, M. (2002): Adaptační změny na třech vybraných kmenech sinic. Bakalářská diplomová práce, Biologická fakulta JČU, 46pp.
- Šmilauer P. (1992): CANODRAW users guide v. 3.0. – Microcomputer Power, Ithaca, NY.

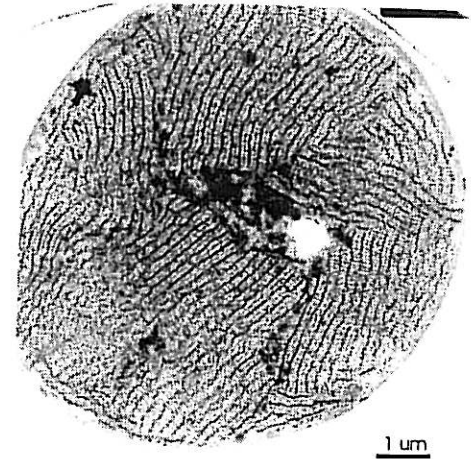
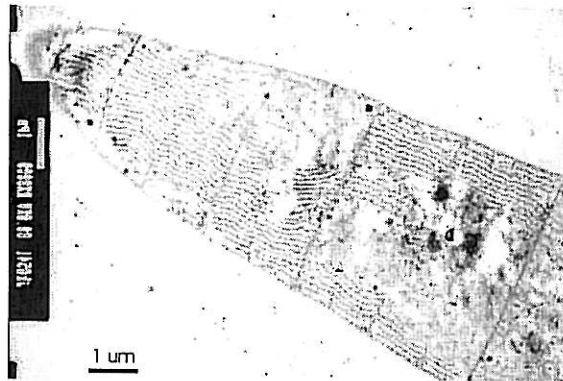
- Thomas, E. A.** (1969): Beobachtungen über das Wandern von *Phormidium autumnale* und *Oscillatoria princeps* auf Agar. 5. Symposium über Cyanophytensystematik, Hydrologie, 523 – 531.
- Turner, S.** (1997): Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Syst. Evol., Suppl.* 11: 13 – 52.
- Ward, D.M., Bateson, M.M., Weller, R. & Ruff – Roberst, A.L.** (1992): Ribosomal RNA analysis of microorganism as they occur in nature. *Adv. Microb. Ecol* 12: 219 – 286.
- Wilmotte, A. & Golubić, S.** (1991): Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta / Cyanobacteria. *Archiv. Hydrobiol., Suppl.* 92 *Algol. Stud.* 64: 1 – 24.
- Wilmotte, A.** (1994): Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. *In* Bryant, D. A. (Ed.): *The molecular biology of Cyanobacteria*, pp. 1 – 25, The Netherlands: Kluwer.
- Wilmotte, A., Turner, S., van de Peer, Y. & Pace, N.R.** (1992): Taxonomic study of marine Oscillatoriacean strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J. Phycol* 28: 828 – 838.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G. & De Wachter, R.** (1993): Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ("*Mastigocladus laminosus* HTF") strain and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* 317: 96 – 100.
- Woese, C.R.** (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221 – 271.
- Wolk C. P.** (1973): *Physiological and cytological chemistry of blue-green algae.* Academic Press, London – New York, 459pp.
- Wood, A.M. & Townsend, D.** (1990): DNA polymorphism within the WH7803 serogroup of marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 26: 576 – 585.

PŘÍLOHY

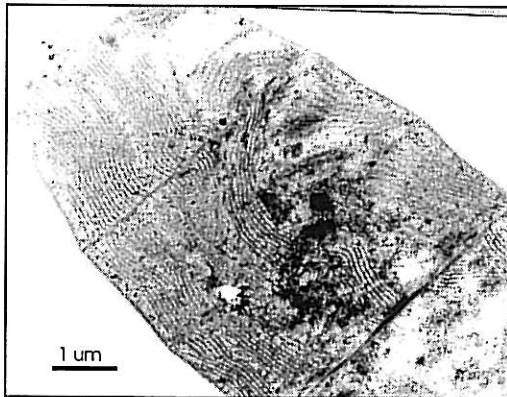
PH1



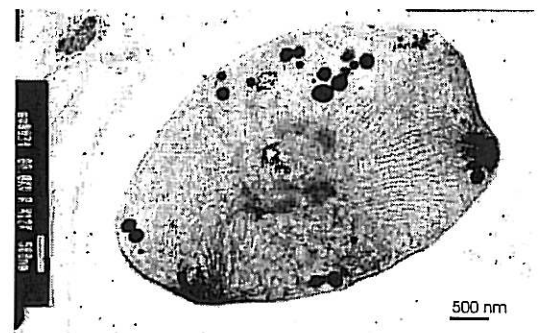
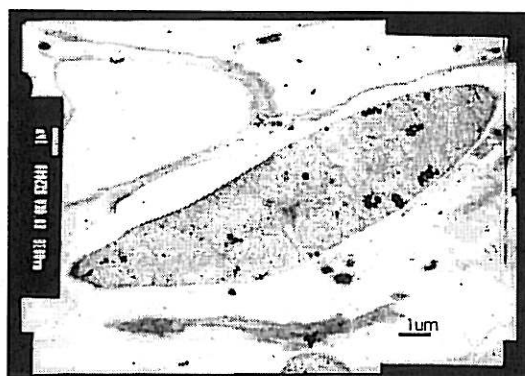
PH2



PH3

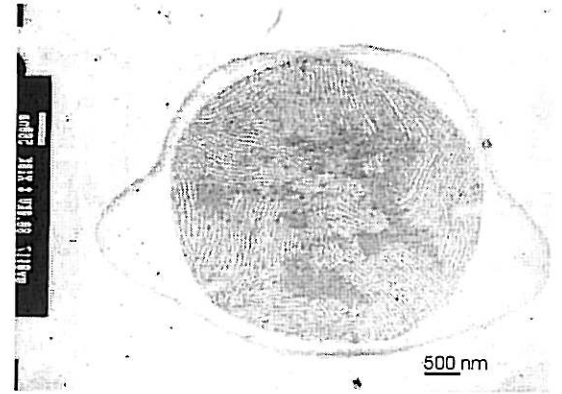
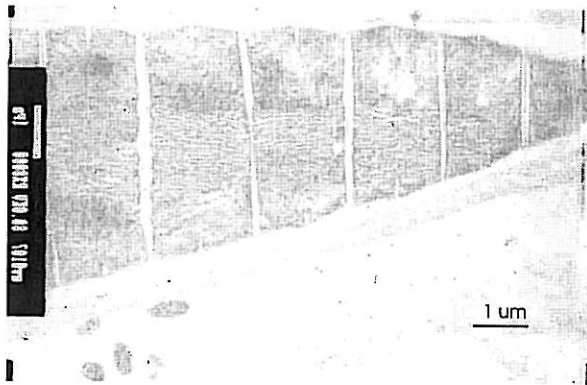


PH4

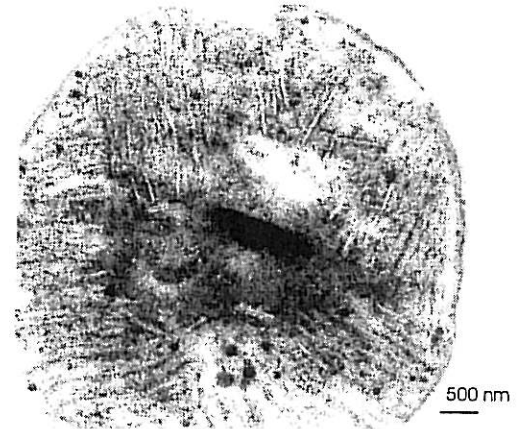
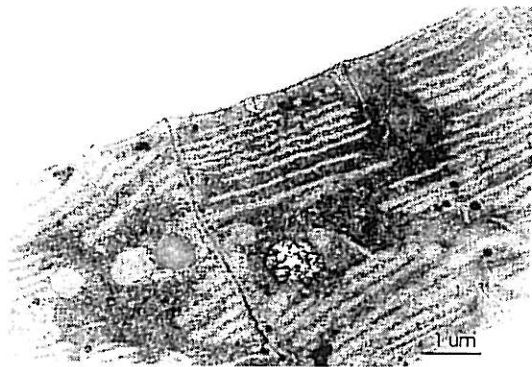


Obr. 20. Sledované kmeny *Phormidium autumnale*, podélný a příčný řez (ultrastruktura)

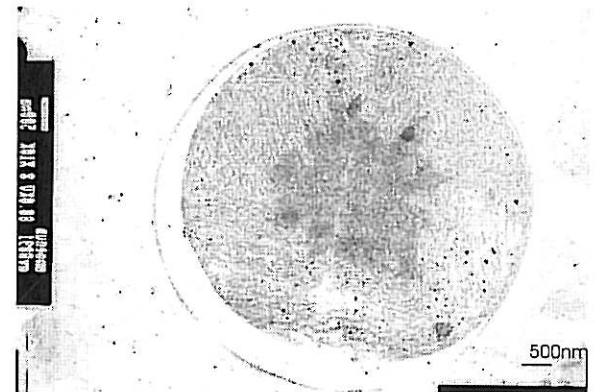
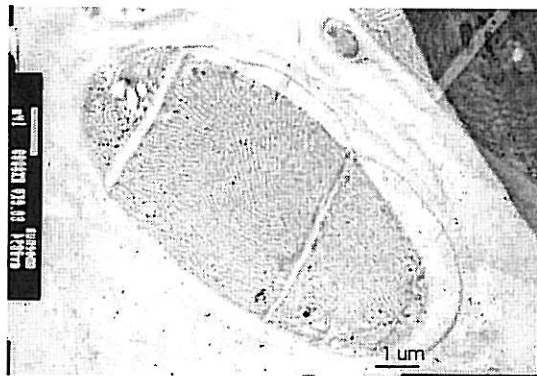
PH5



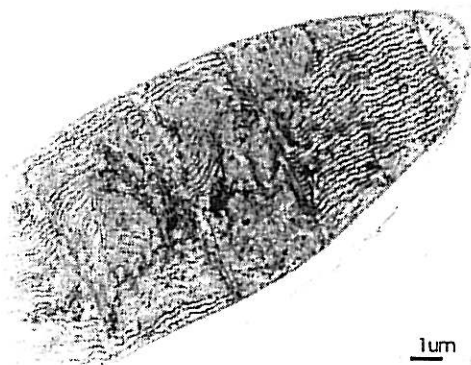
PH6



PH7

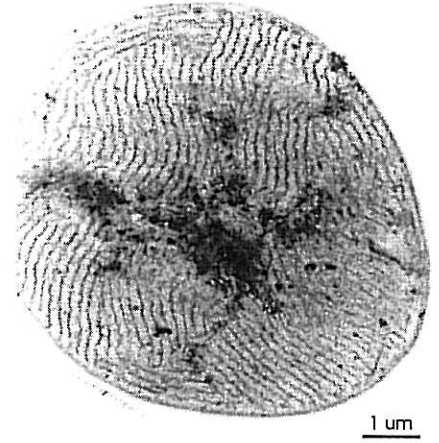
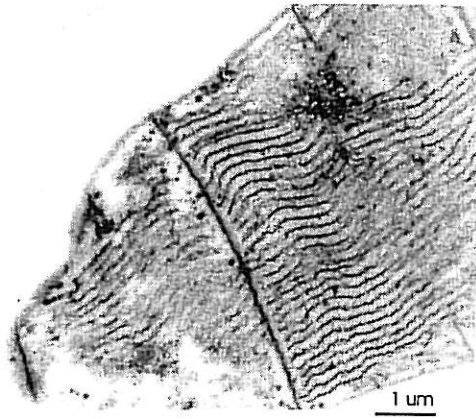


PH8

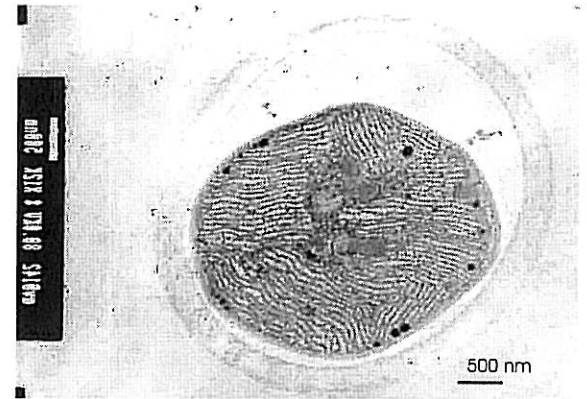
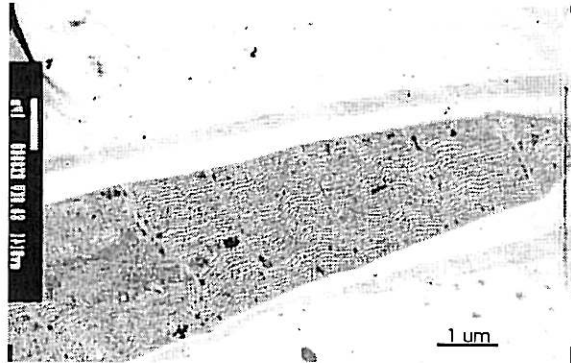


Obr. 21. Sledované kmeny *Phormidium autumnale*, podélný a příčný řez (ultrastruktura)

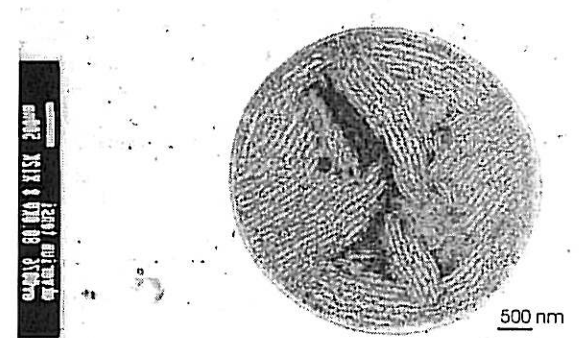
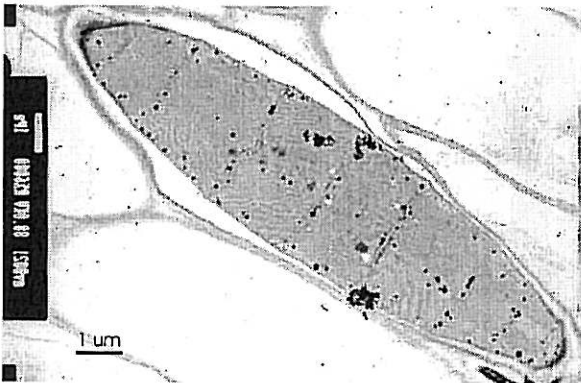
PH9



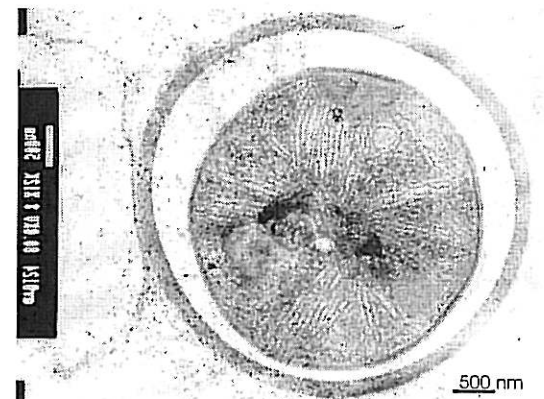
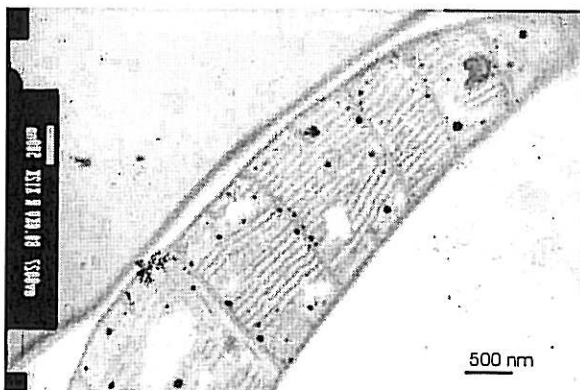
PH10



PH11

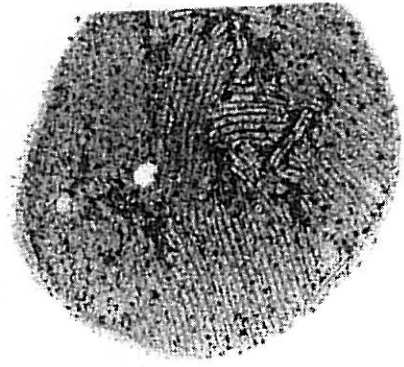
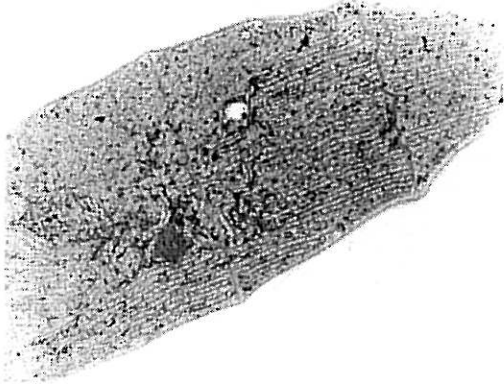


PH12

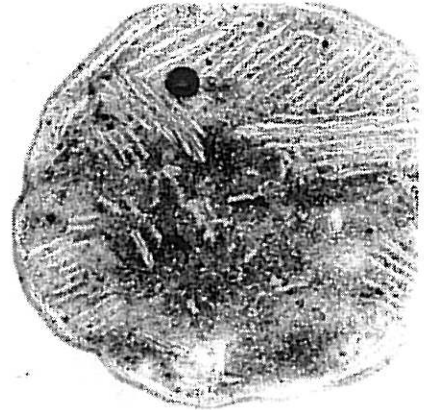
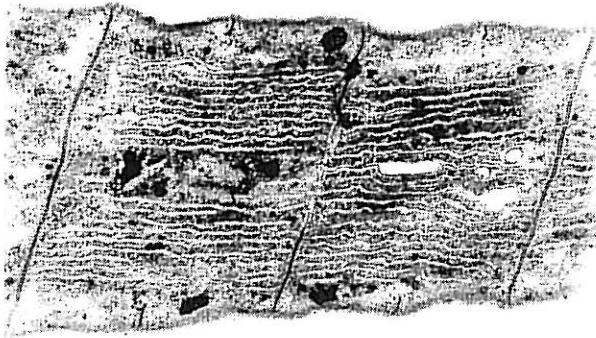


Obr. 22.. Sledované kmeny *Phormidium autumnale*, podélný a příčný řez (ultrastruktura)

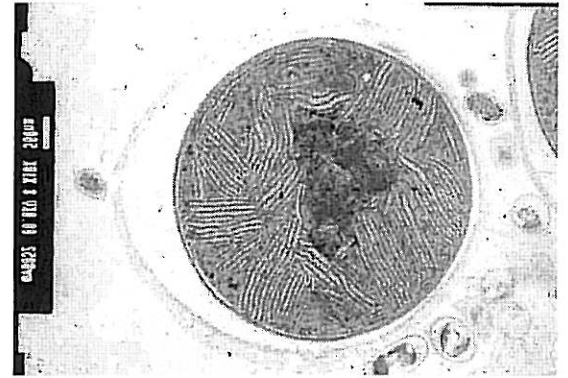
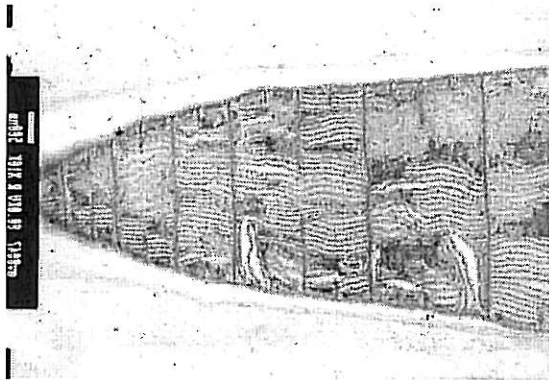
PH13



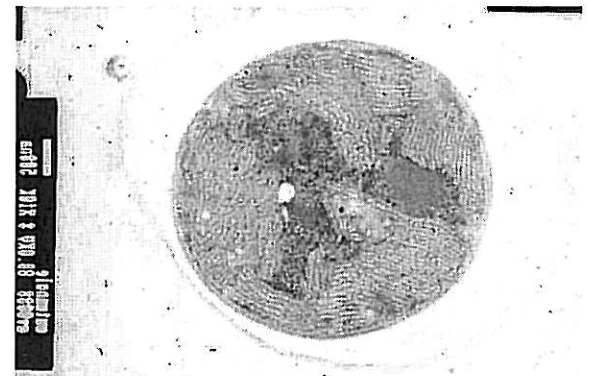
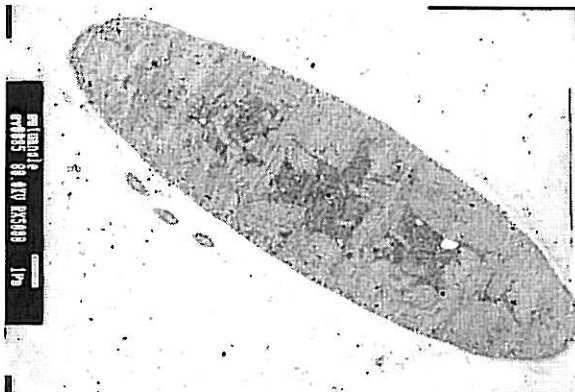
PH14



PH15



PH16



Obr. 23. Sledované kmeny *Phormidium autumnale*, podélný a příčný řez (ultrastruktura)

Tab. 3. Tabulka kvantitativních (naměřených) morfologických znaků *Phormidium autumnale* s.l.

Kmen	Průměrná šířka vláčna	Průměrná délka buněk	Min. délka buněk	Max. délka buněk	Prům.šířka vlákna pod kalyptrou	Prům. šířka kalyptry
PH1	5.11	4.36	2.52	7.45	2.00	2.56
PH2	6.39	4.71	3.15	6.89	2.73	2.95
PH3	7.45	4.25	2.65	6.38	2.62	3.14
PH4	7.16	4.62	2.23	7.28	3.07	3.34
PH5	6.31	4.62	1.99	7.12	2.42	3.14
PH6	5.97	5.5	1.99	8.26	2.37	2.69
PH7	7.85	4.24	2.09	7.19	3.86	3.96
PH8	6.8	4.57	1.47	7.71	2.64	3.08
PH9	6.82	4.7	2.4	8.58	2.76	3.07
PH10	5.44	3.23	1.86	5.17	2.35	2.56
PH11	3.88	3.99	2.28	7.73	2.19	2.33
PH12	5.94	3.59	1.75	5.53	2.61	3.09
PH13	5.39	4.37	2.7	6.57	2.04	2.39
PH14	5.87	4.19	1.97	7.17	2.74	2.97
PH15	6.49	4.29	2.79	6.44	2.83	3.20
PH16	7.47	4.23	2.53	7.22	3.14	3.88
LPT	2.16	3.24	2.03	4.35		

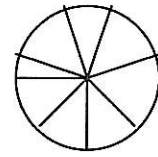
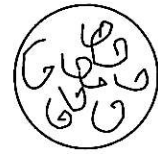
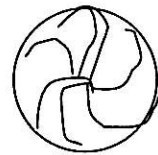
Legenda:

Kmeny z: půdy
kaluže
rybníku
potoku
jiné

Tab. 4. Morfologické charakteristiky sledovaných kmenů *Phormidium autumnale* s.l.

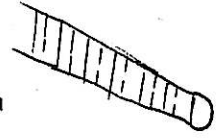
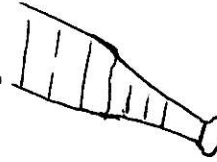
Kmen	Barva	Zúžení konce vlákna	Ohyb konce vlákna	Zaškrčení	Spiralita	Síla pochvy	Granulace nad přepážkami	Makronárůst
PH16	šedomodrá	1, dobře, často	ano	občas	ne	slabá	občas, výrazná	V
PH15	šedozelená	1, dobře, málo	ano	občas	ne	slabá	ne	P
PH4	šedomodrá	1, dobře, často	málo	občas	ne	silnější	častá, nevýrazná	R?
PH3	zelenomodrá	1, dobře, často	ano	občas	ne	silnější	občas, nevýrazná	V
PH2	šedomodrá (až do zelena)	1, odlišná, často	neviděl	občas	ne	slabá	téměř ne	V
PH9	šedoolivová	1, dobře, často	málo	občas	ne	silnější	častá, výrazná	P
PH12	šedomodrá	1, dobře, málo	ano	občas	ne	slabá	téměř ne	V
PH7	tmavě šedomodrá	1?, dobře, málo	ano	občas	ne	slabá	občas, výrazná	P
PH8	šedoolivová	1, dobře, málo	neviděl	občas	ano	silnější	občas, výrazná	P
PH5	šedoolivová	1, dobře, často	ano	často	ne	slabá	občas, nevýrazná	R
PH1	šedomodrá	1, dobře, často	neviděl	často	ano	silnější	často, výrazná	R
PH6	šedá	1, dobře, málo	ano	občas	ano	slabá	občas, výrazná	V
PH10	zelenomodrá	1, dobře, málo	neviděl	občas	ne	silnější	ne	P
PH13	šedozelená	1, dobře, často	ano	občas	ne	slabá	občas, nevýrazná	V
PH14	tmavě šedoolivová	1, dobře, málo	ano	občas	ano	silnější	často, výrazná	V
PH11	šedomodrá až do zelena	2, odlišná,	málo	pseud- anabenální	ano	slabá	uprostřed, často, výrazná	V?
LPT	zelenomodrá	není	ne	pseud- anabenální	ne	slabá	jen dvě zrna, větší	?

Makronárůst: V



Zúžení konce vlákna: R

2



Summary of all Effects; design: šířka
1-KMEN

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p - level
1	15	67,07111	1170	0,308841	217,1700	0,0000

Tab. 5. Statistický výstup testování analýzou variance rozdílů šířek u sledovaných kmenů *Phormidium autumanle*

Summary of all Effects; design: délka
1-KMEN

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	15	67,07111	1170	0,308841	217,1700	0,0000

Tab. 6. Statistický výstup testování analýzou variance rozdílů v délce buněk u sledovaných kmenů *Phormidium autumanle*

Summary of all Effects; design: pod kalyptrou
1-KMEN

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	15	3,046676	205	0,199195	15,29498	0,0000

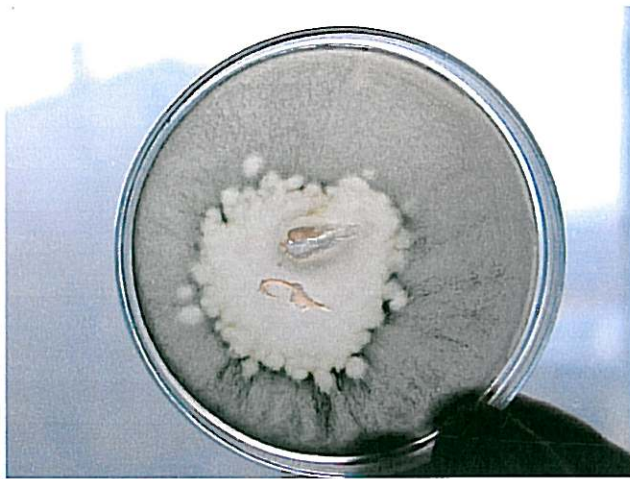
Tab. 7. Statistický výstup testování analýzou variance rozdílů šířek vlákna pod kalyptrou u sledovaných kmenů *Phormidium autumanle*

Summary of all Effects; design: kalyptra
1-KMEN

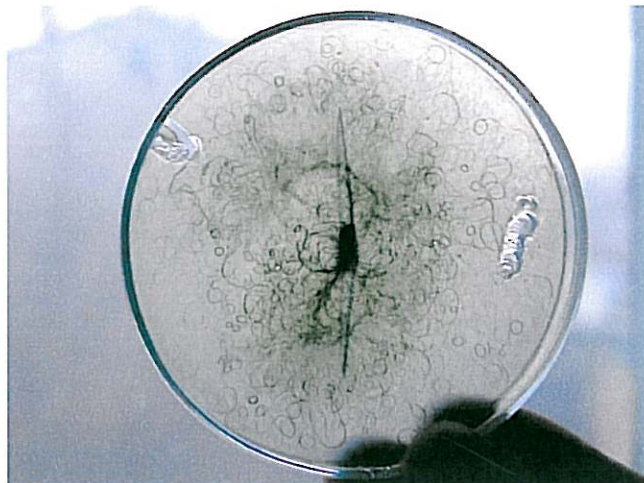
	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	15	2,714646	185	0,202729	13,39051	0,0000

Tab. 8. Statistický výstup testování analýzou variance rozdílů šířek kalyptry u sledovaných kmenů *Phormidium autumanle*

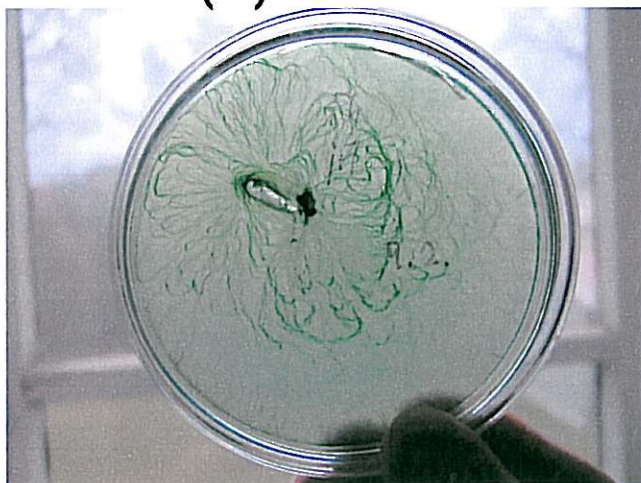
PH1 (R)



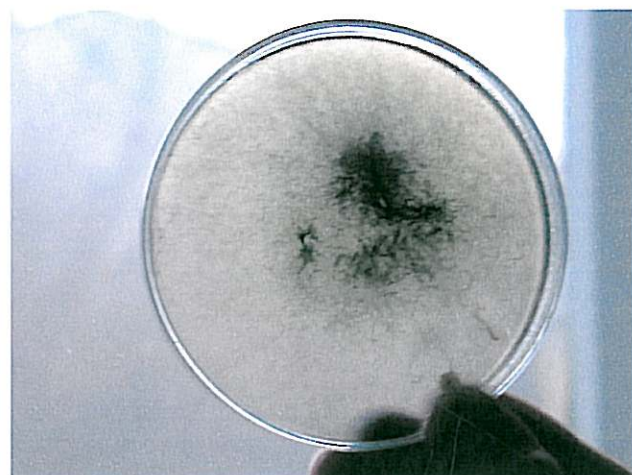
PH2 (V)



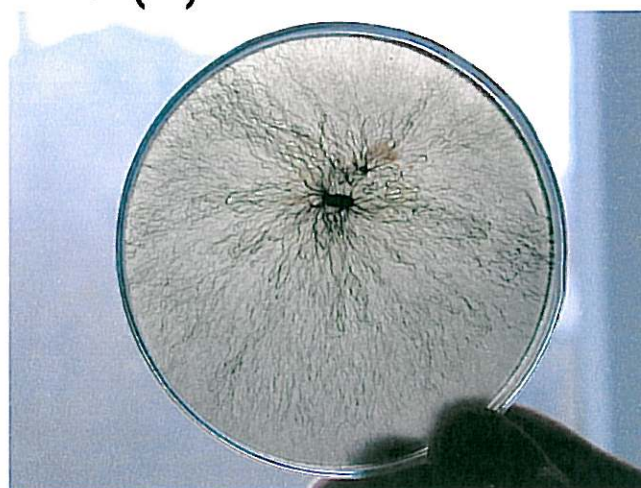
PH3 (V)



PH4 (R?)

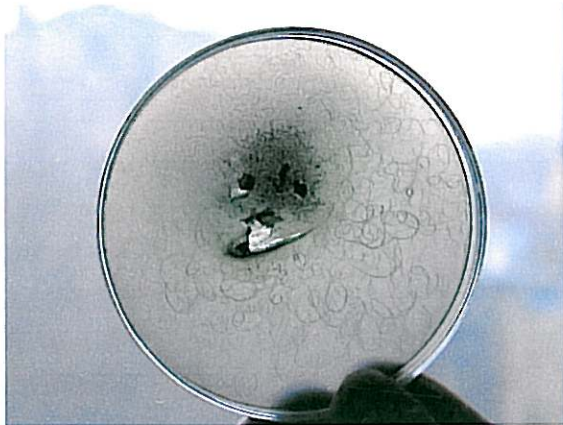


PH5 (R)



Obr. 24. Typy makronárustu sledovaných kmenů *Phormidium autumnale*

PH6 (V)



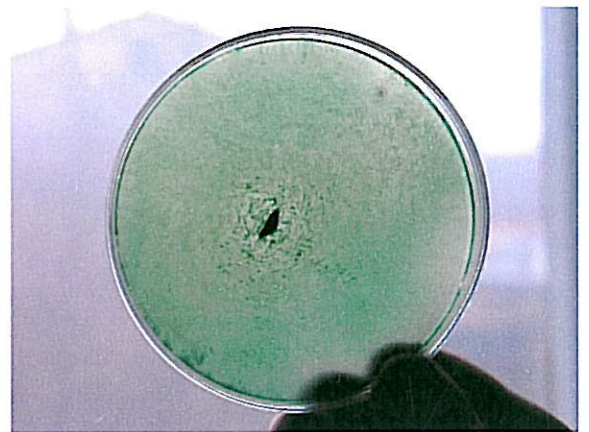
PH8 (P)



PH9 (P)



PH10 (P)



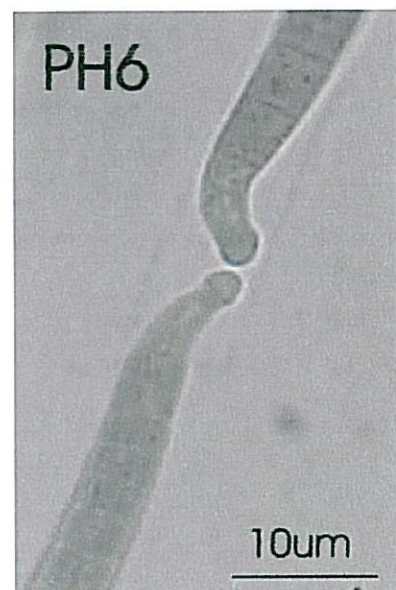
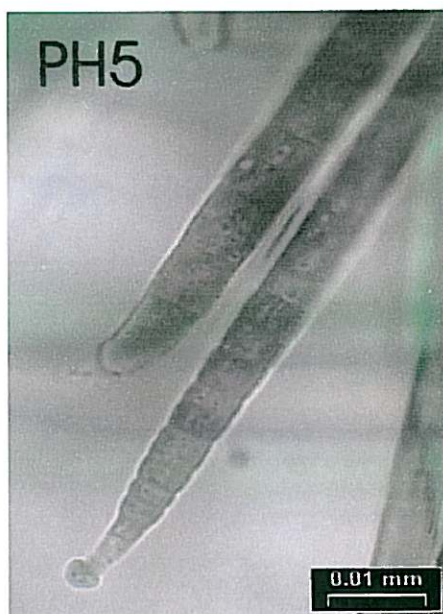
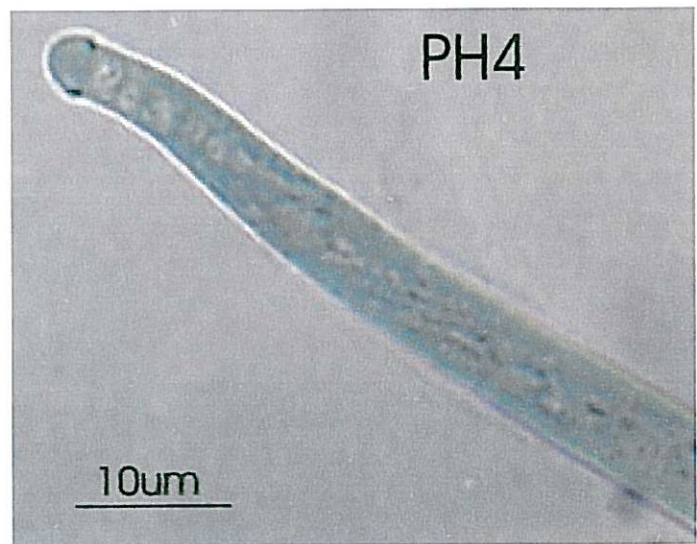
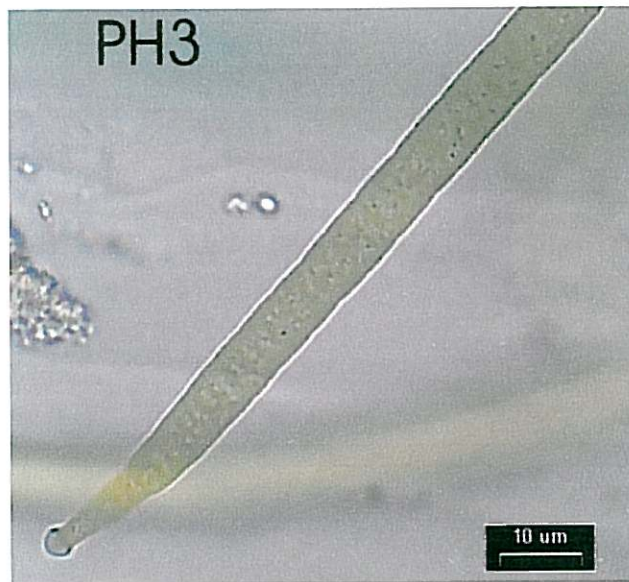
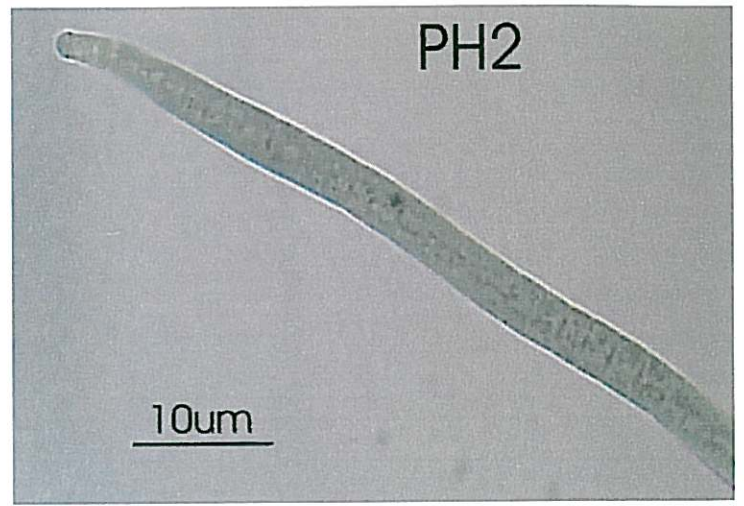
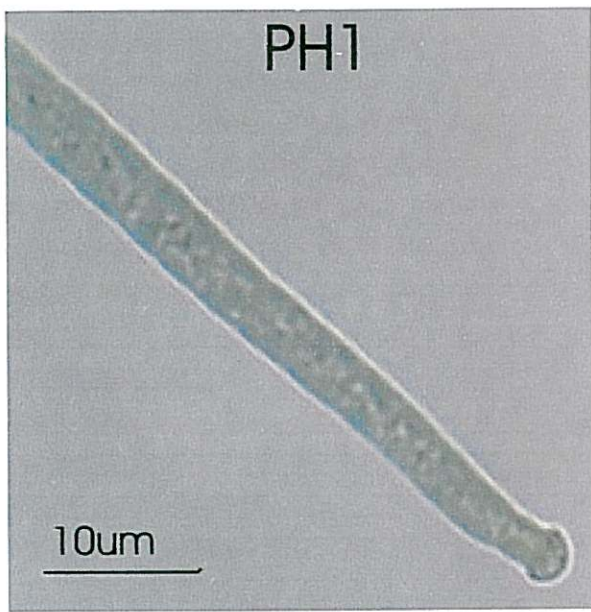
PH13 (V)



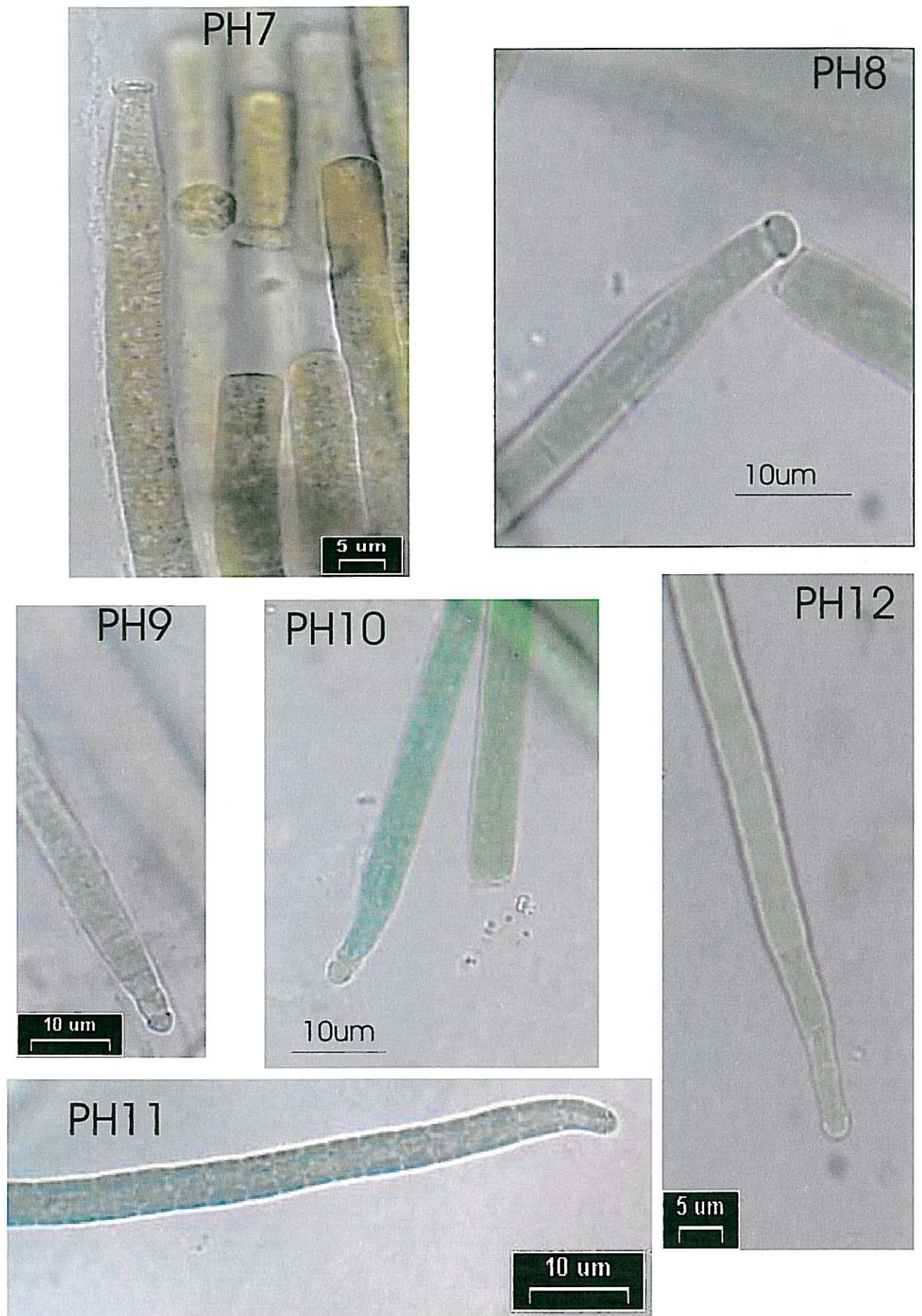
PH14 (V)



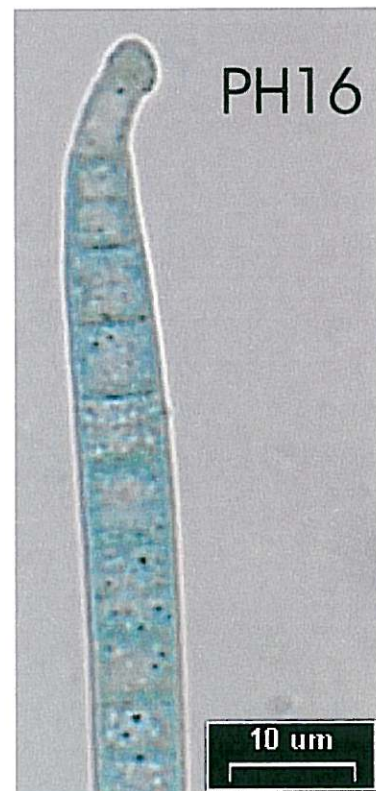
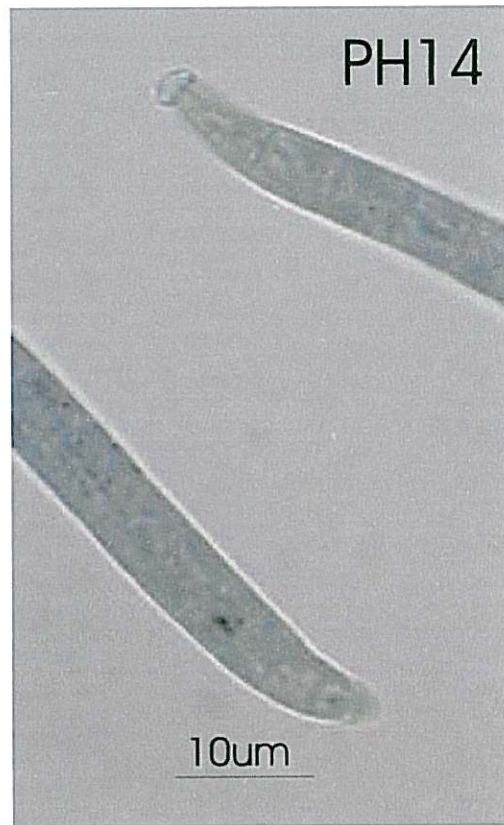
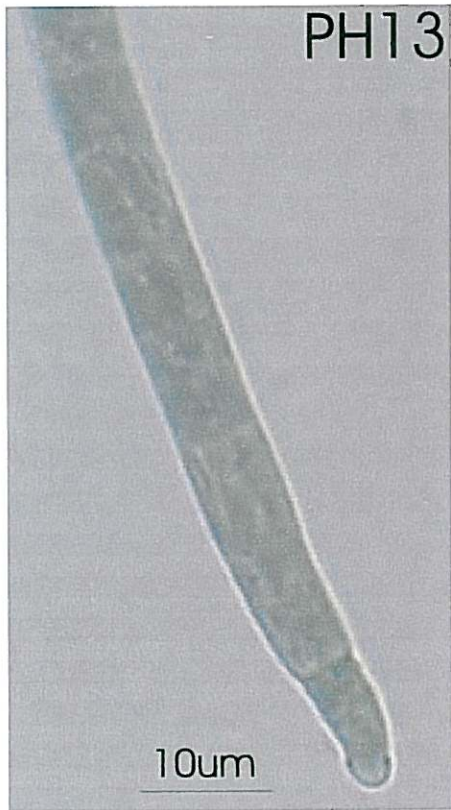
Obr. 25.. Typy makronárustu u sledovaných kmenů *Phormidium autumnale*



Obr. 26. Sledované kmeny *Phormidium autumnale* (konec vlákna)

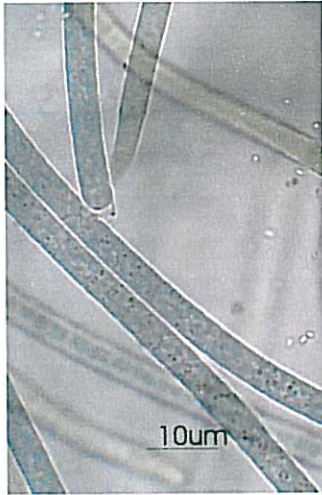


Obr. 27. Sledované kmeny *Phormidium autumnale* (konec vlákna)

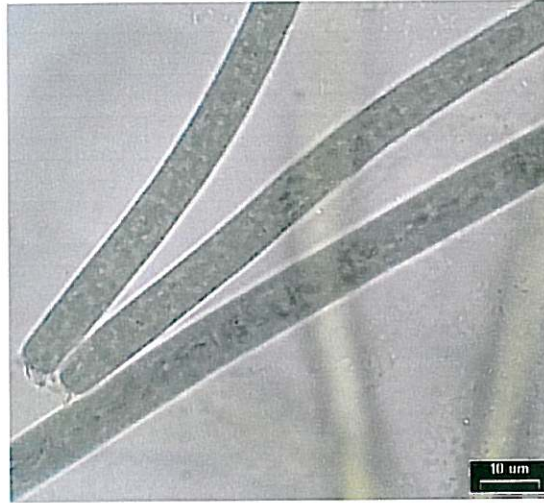


Obr. 28.. Sledované kmeny *Phormidium autumnale* (konec vlákna)

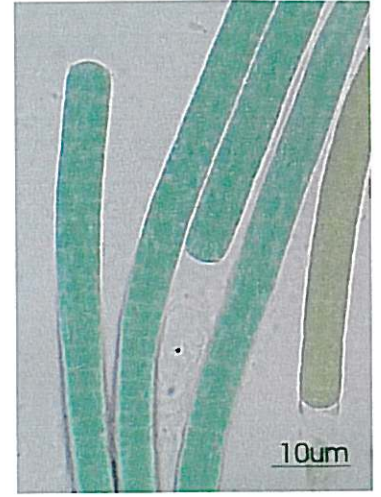
PH1



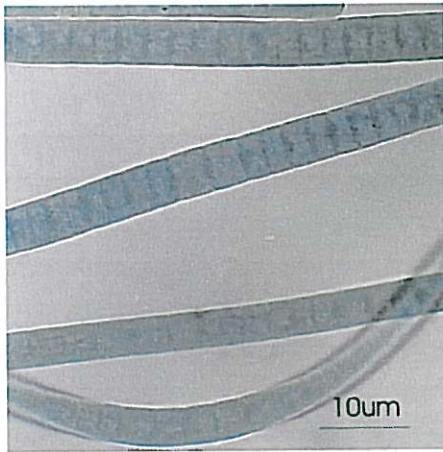
PH2



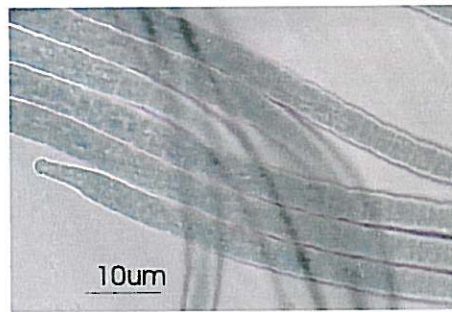
PH3



PH4



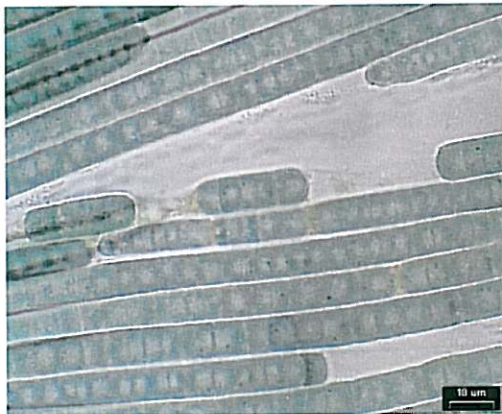
PH5



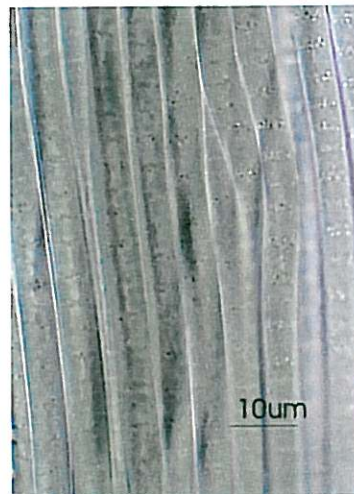
PH6



PH7



PH8

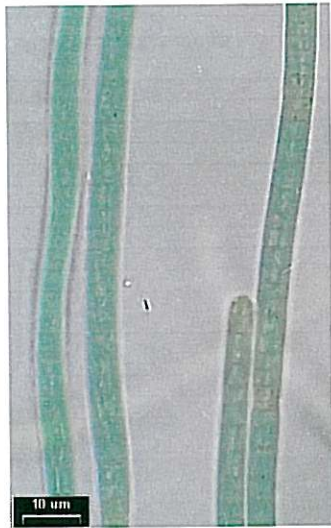


PH9

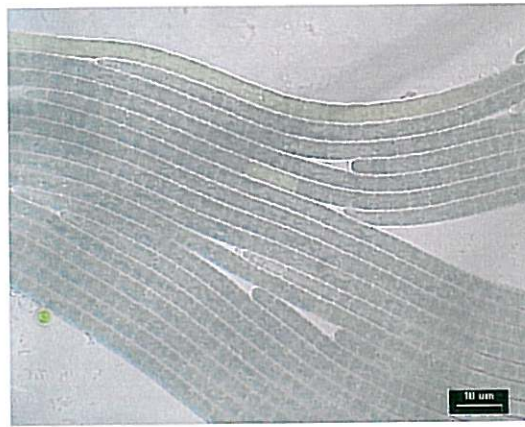


Obr. 29. Sledované kmeny *Phormidium autumnale* (vlákno)

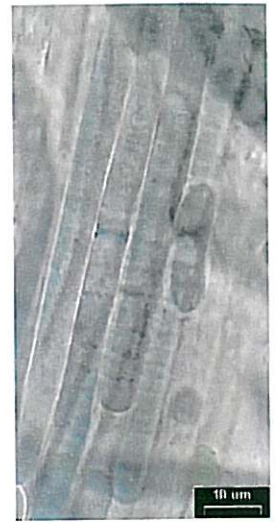
PH10



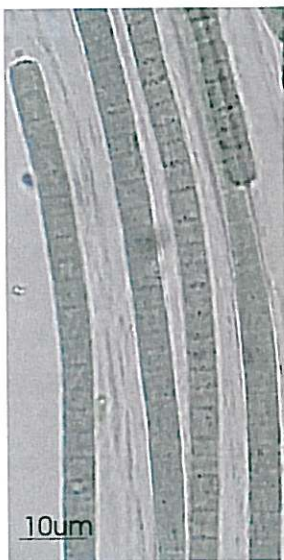
PH11



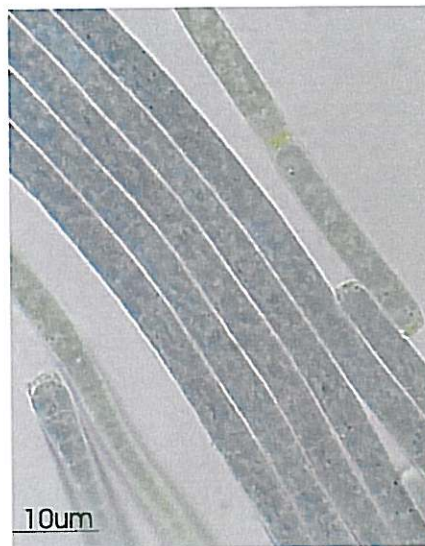
PH12



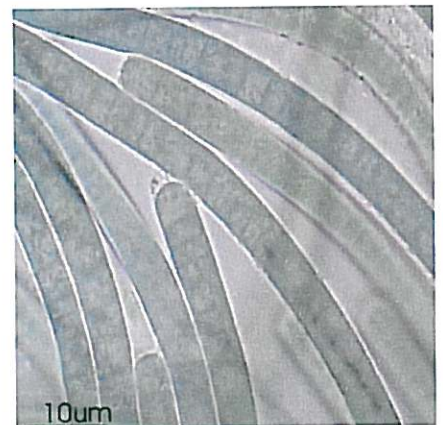
PH13



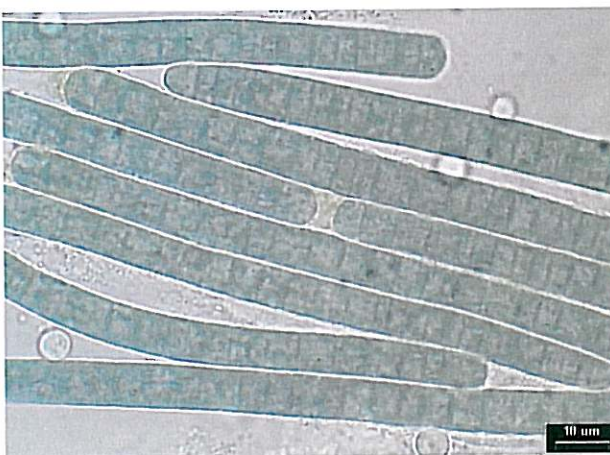
PH14



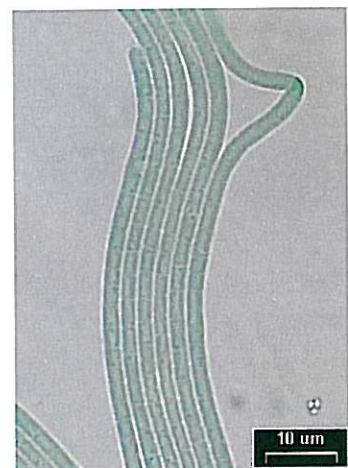
PH15



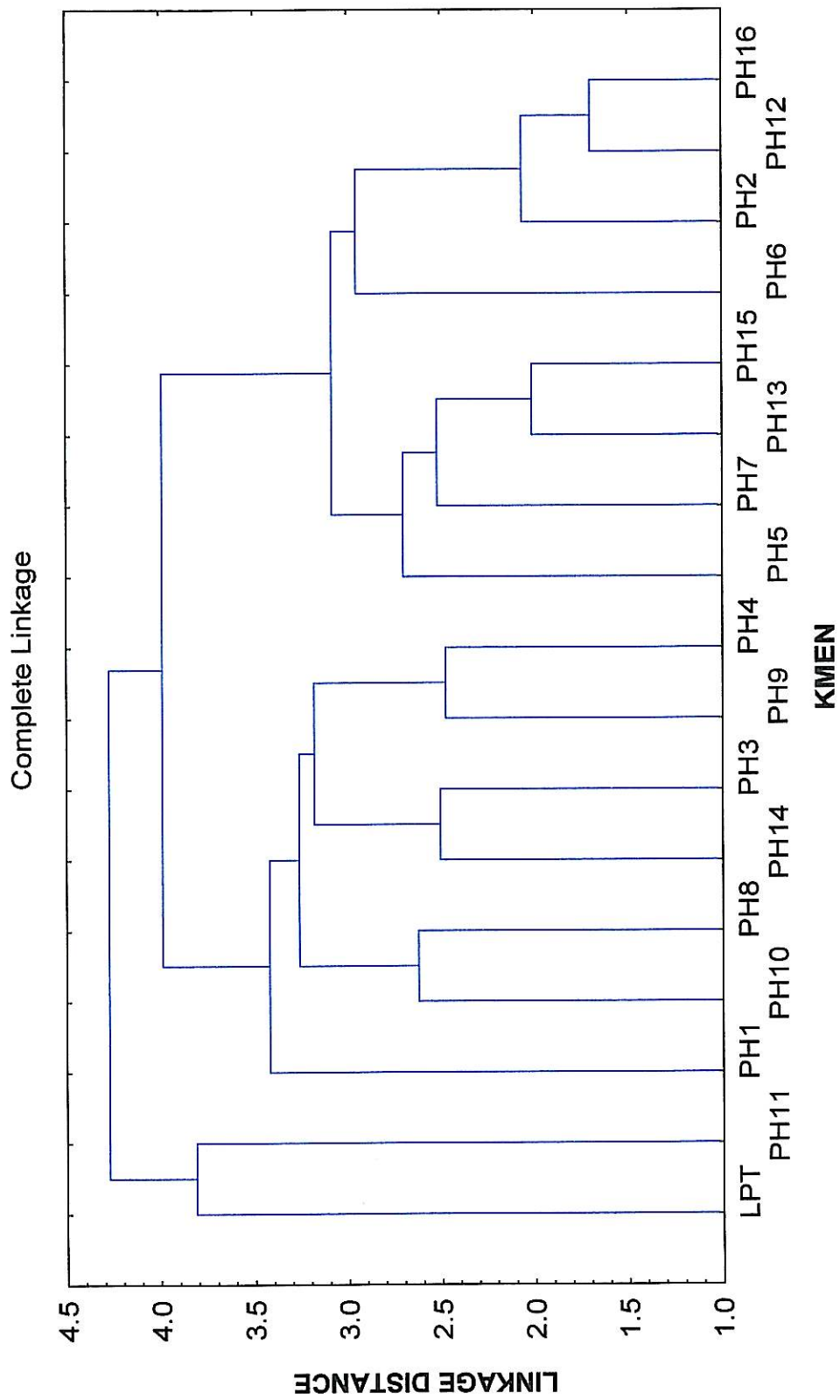
PH16



LPT



Obr. 30. Sledované kmeny *Phormidium autumnale* (vlákno)



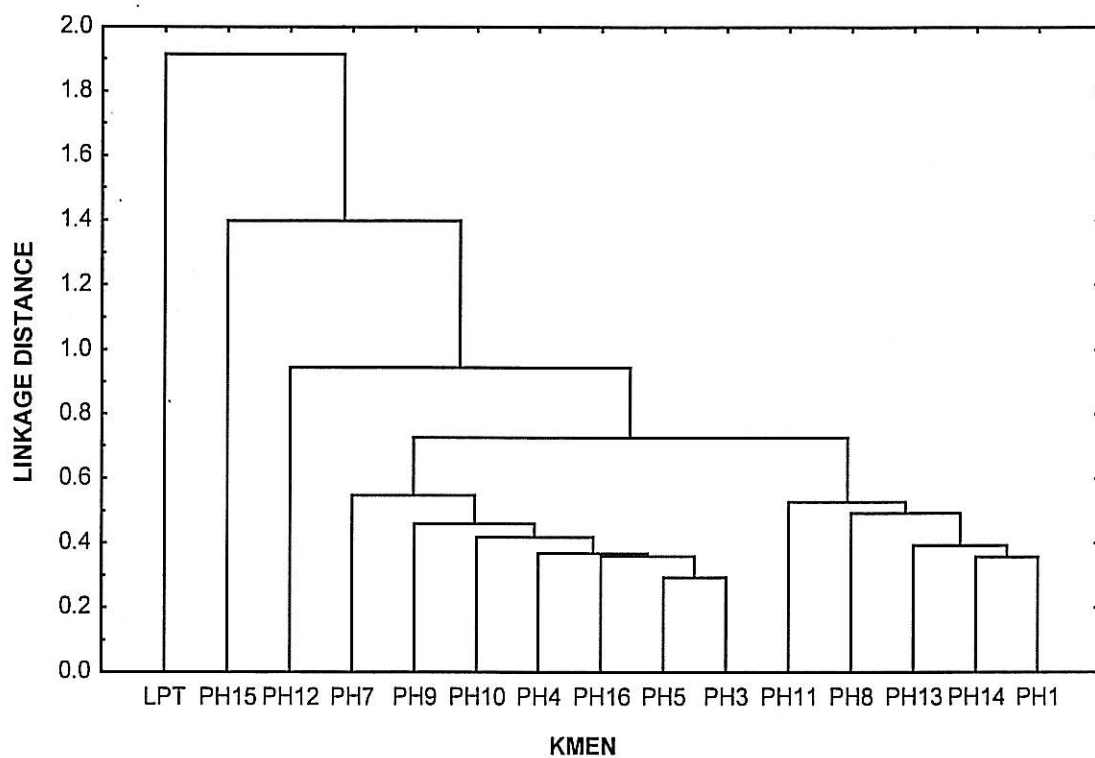
Obr. 31. Srovnání kmenů *Phormidium autumnale* na základě kvantitativních a kvalitativních dat

KMEN	NASYCENÉ MK					NENASYCENE									
	14:0	16:0	18:0	20:0	Souhrn	16:3	18:3	20:3	16:2	18:2	20:2	16:1	18:1	20:1	Souhrn
PH1	12.9	23.8	3.8		40.5	14.2	34.6		4.0	6.0		0.3			49.1
PH3	6.8	22.6	3.0		32.4	1.2	24.8		10.0	20.1		11.1			67.2
PH4	16.7	31.6	2.9		51.2	2.1	22.0		8.6	8.6		7.2			48.5
PH5	5.9	21.6	3.7		31.2	2.1	33.3		11.4	13.5		8.3			68.6
PH7	9.0	23.7	5.1		37.8	7.1	19.4		7.7	18.7		9.0			61.9
PH8	17.0	28.0	4.2		49.2	7.0	27.0		3.1	9.1		2.3	1.9		50.4
PH9	24.7	19.7	5.2		51.6	1.5	24.2		5.5	14.4		4.5			50.1
PH10	4.5	21.4	2.4		28.3	1.7	38.8		18.5	6.3		6.1			71.4
PH11	7.8	34.0	3.7		45.5	5.6	12.7		6.4	28.3		1.1			54.1
PH12	3.8	14.2	17.2		35.2	6.8	29.9		12.1	7.9		5.1	2.5		64.3
PH13	13.0	28.2	2.8		44.0	6.9	25.2		7.4	15.5		1.2	0.8		48.5
PH14	9.5	33.4	2.6		45.5	10.7	27.9		5.2	9.5		0.5	0.3		54.1
PH15	8.1	25.4	5.6	9.7	48.8	5.1	20.1	1.9	8.1	8.2	3.6	3.1		0.6	50.7
PH16	10.7	26.7	5.1		42.5	2.3	25.1		13.2	11.5		5.1			47.2
LPT	6.8	4.9	10.8	5.8	28.3	1.5		2.5	1.2	1.6	12.6	3.4	22.1	3.9	47.8

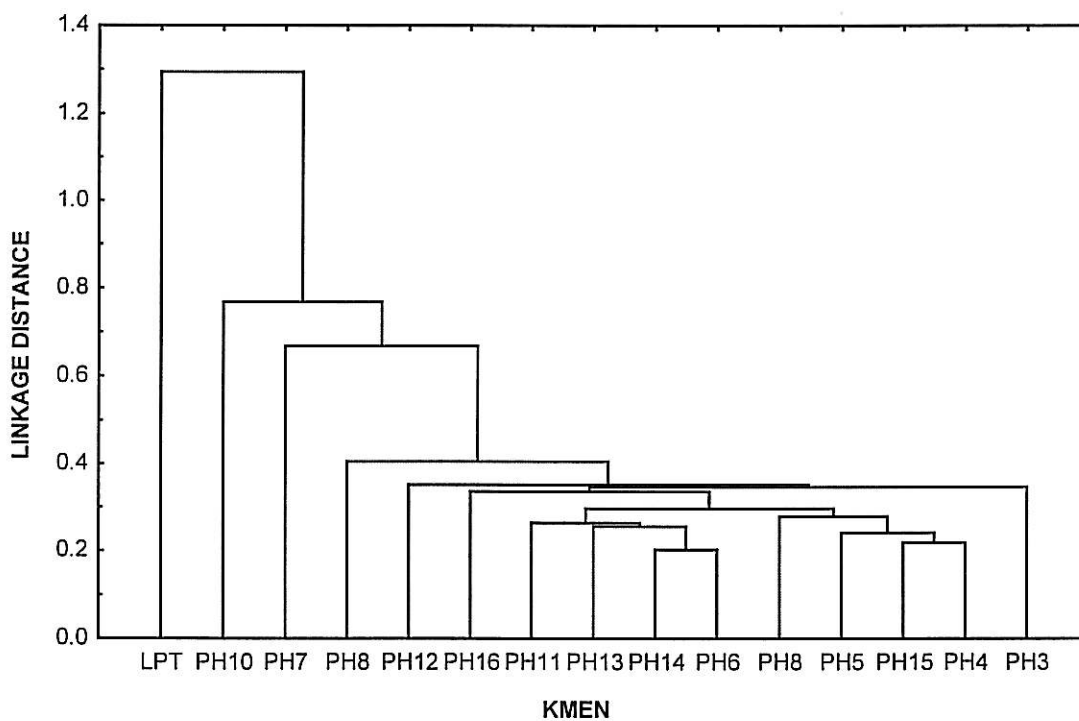
Tab. 9. Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmenů *Phormidium autumnale*

KMEN	MYXOXANT. 1	MYXOXANT. 2	ZEAXANT.	CANTAXANT.	ESTERY ASTAXANT.	β - CAROTEN	SOUHRN KAROTENOIDŮ	ALOMER CHL A	CHL A
PH3		17.8	8.9		10.4	14.8	51.9		47.9
PH4		6.9	9.3		13.1	19.4	48.7		51.1
PH5		7.1	7.6		7.4	30.5	52.6		47.2
PH6		13.9	29.4		5.3	13.4	62.1		37.7
PH7	6.7	19.9	7.3		8.8	16.4	59.1		40.7
PH8		10.3	15.4		15.5	17.6	58.8		41.0
PH9		12.1	12.7	1.1	7.9	19.3	53.2		46.6
PH10		15.1	9.1	6.0	23.9	9.3	63.5		36.3
PH11		6.5	15.7		7.0	26.3	55.5		44.3
PH12		26.2	17.5		6.6	14.9	65.2		34.6
PH13		8.6	24.9		6.4	18.6	58.6		41.2
PH14		13.9	22.9		3.6	12.3	52.7		47.1
PH15		9.9	10.0		11.1	26.6	57.6		42.2
PH16	0.9	12.4	12.2		9.0	22.2	56.8		43.0
LPT		10.0	10.1			16.4	36.5	10.0	53.3

Tab. 10. Procentuální zastoupení pigmentů u kmenů *Phormidium autumnale*



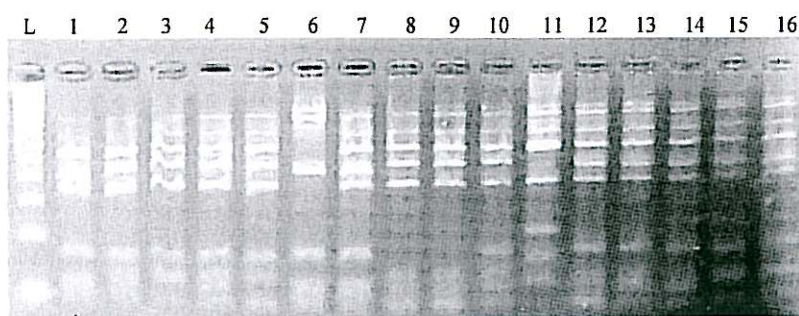
Obr. 32. Rozdělení sledovaných kmenů *Phormidium autumnale* do skupin na základě analýzy mastných kyselin (metoda single linkage)



Obr. 33. Rozdělení sledovaných kmenů *Phormidium autumnale* do skupin na základě analýzy pigmentů (metoda single linkage)

Hinf I

PH



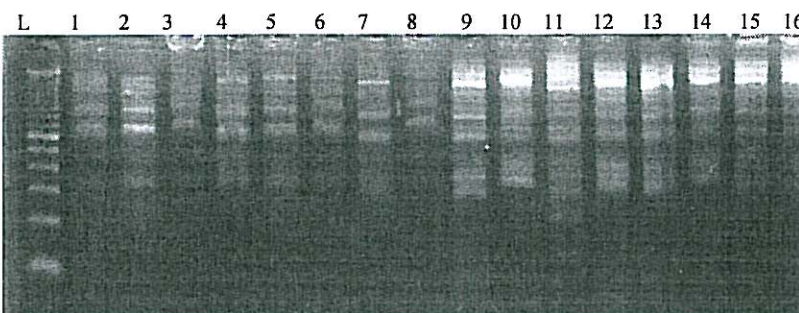
Rsa I

PH



Mbo II

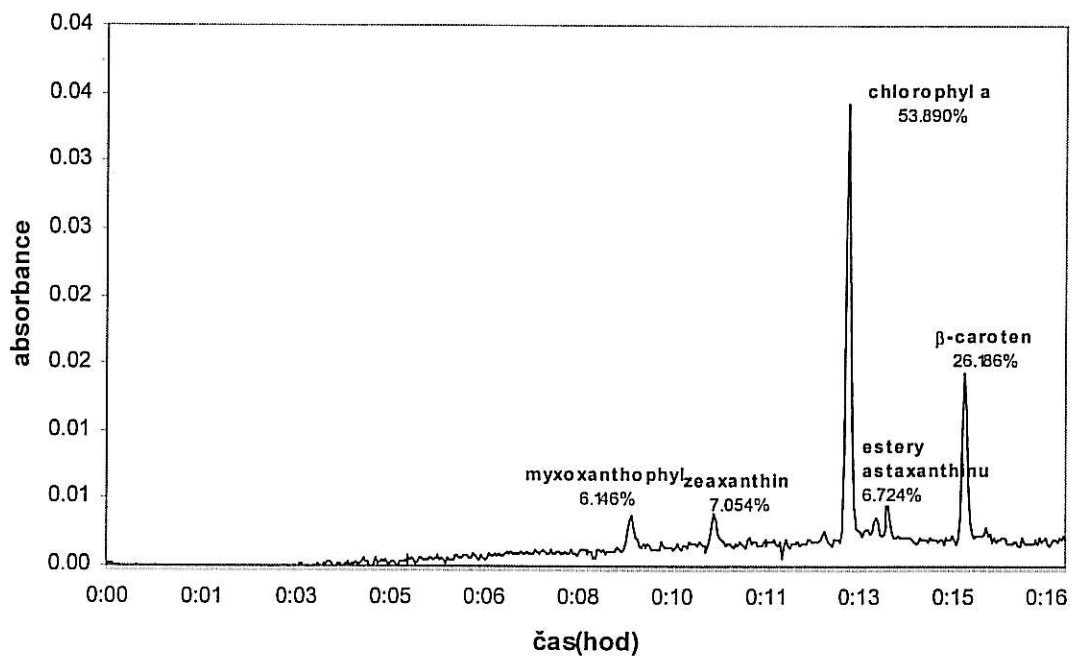
PH



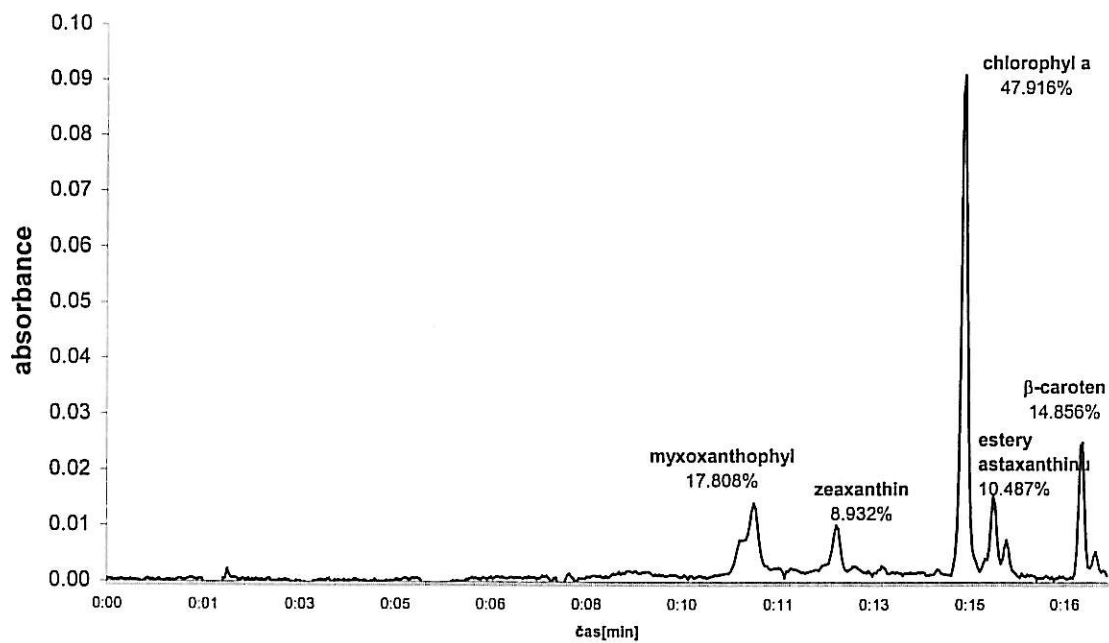
L – marker 100b (ladder)

Obr. 34. Ukázka naštipání 16 –ti sledovaných kmenů třemi vybranými restričními enzymy (Hinf I, Rsa I, Mbo II)

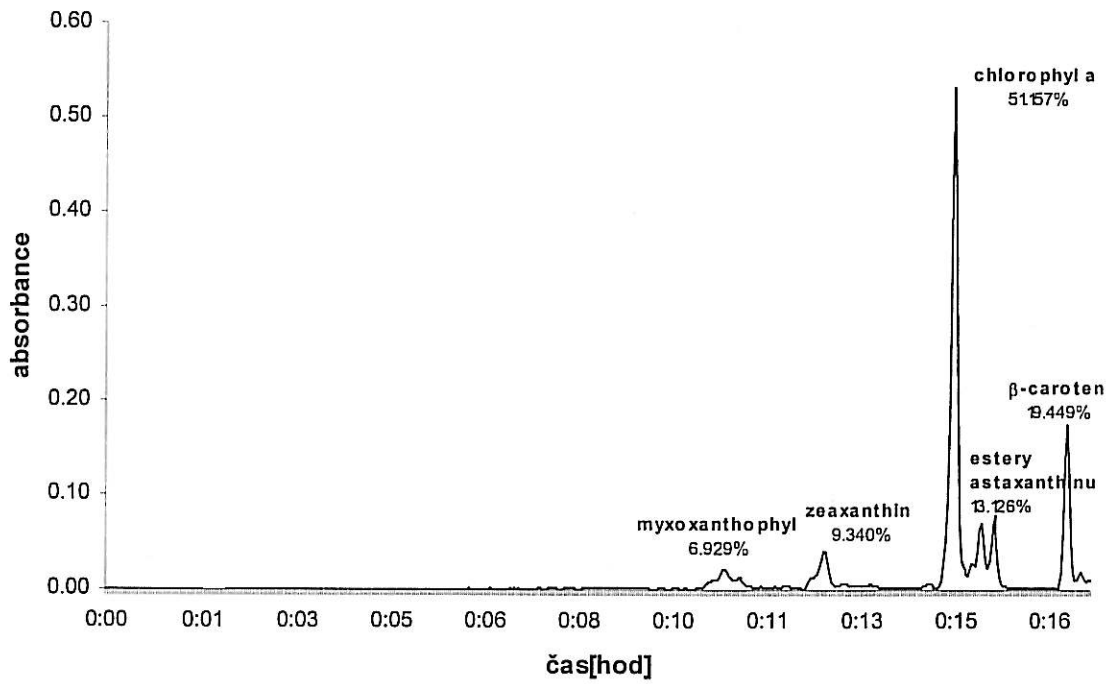
**CHROMATOGRAMY PIGMENTŮ A MASTNÝCH
KYSELIN**



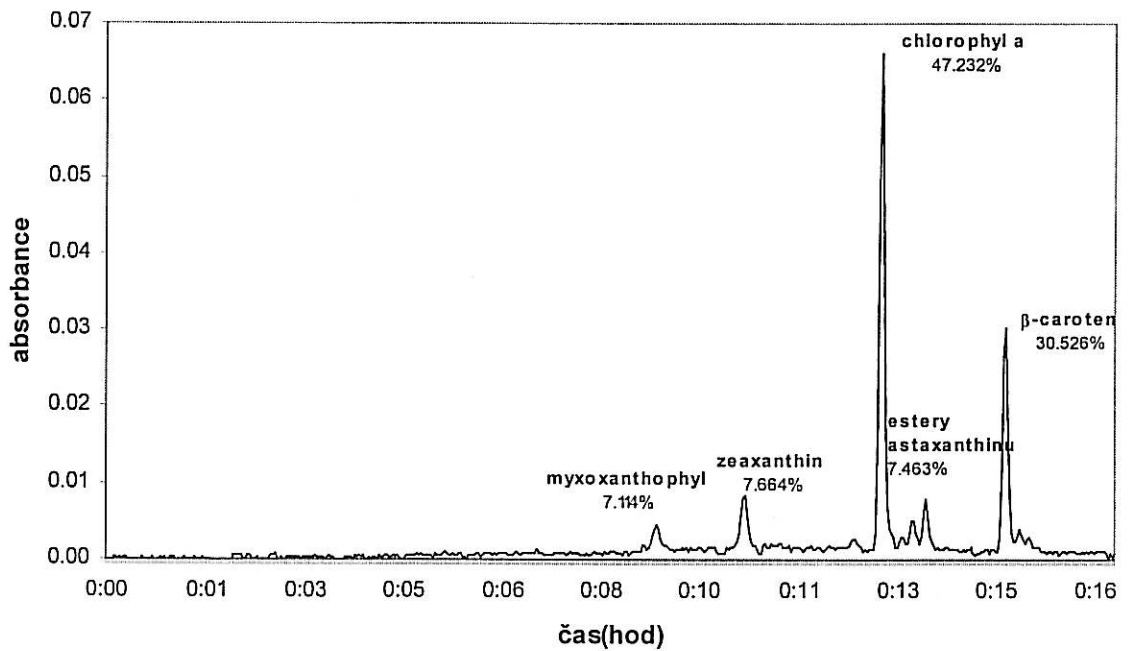
Chromatogram č.3 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH3



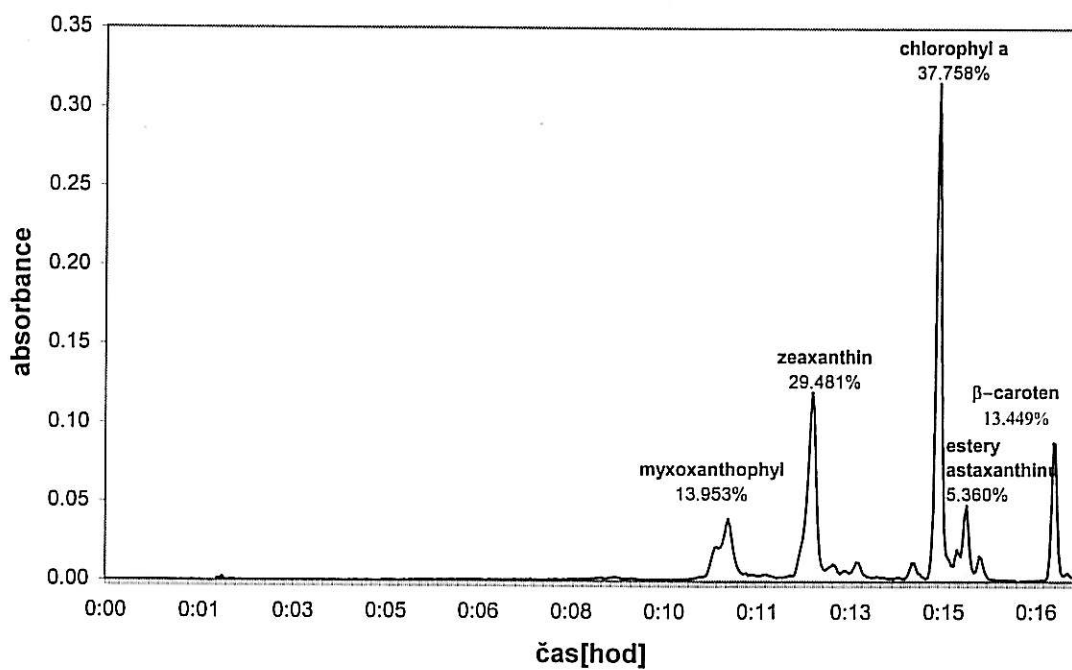
Chromatogram č.3a : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH3



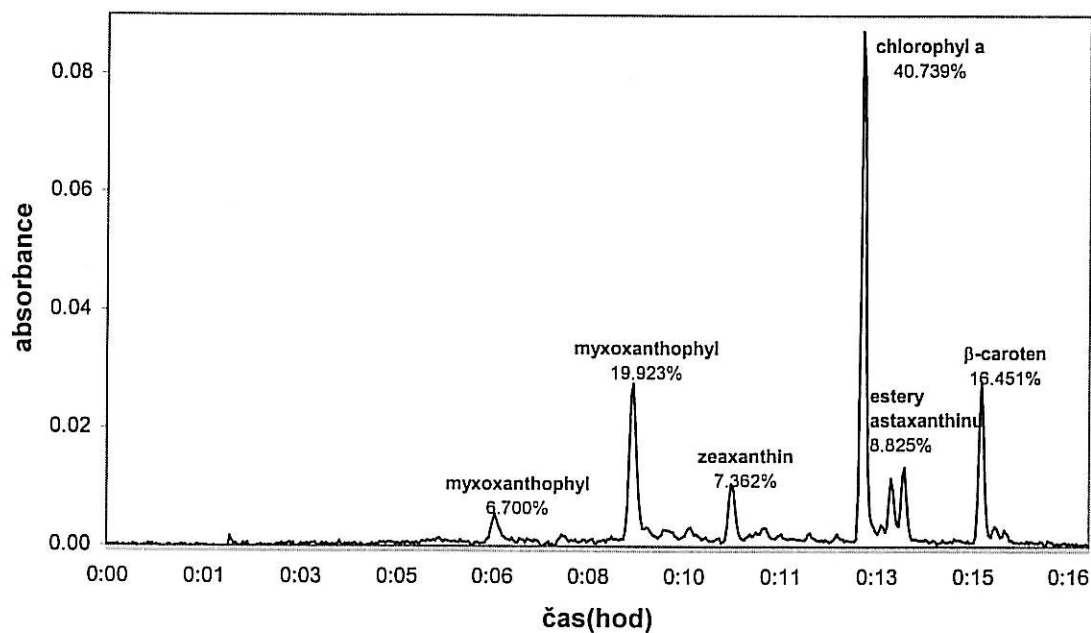
Chromatogram č.4 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH4



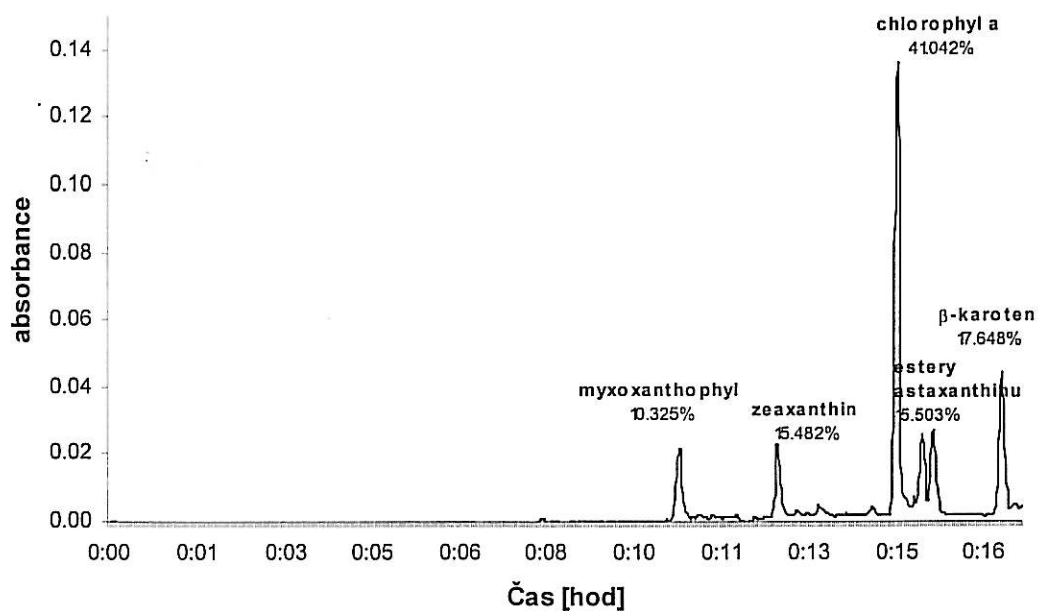
Chromatogram č.5 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH5



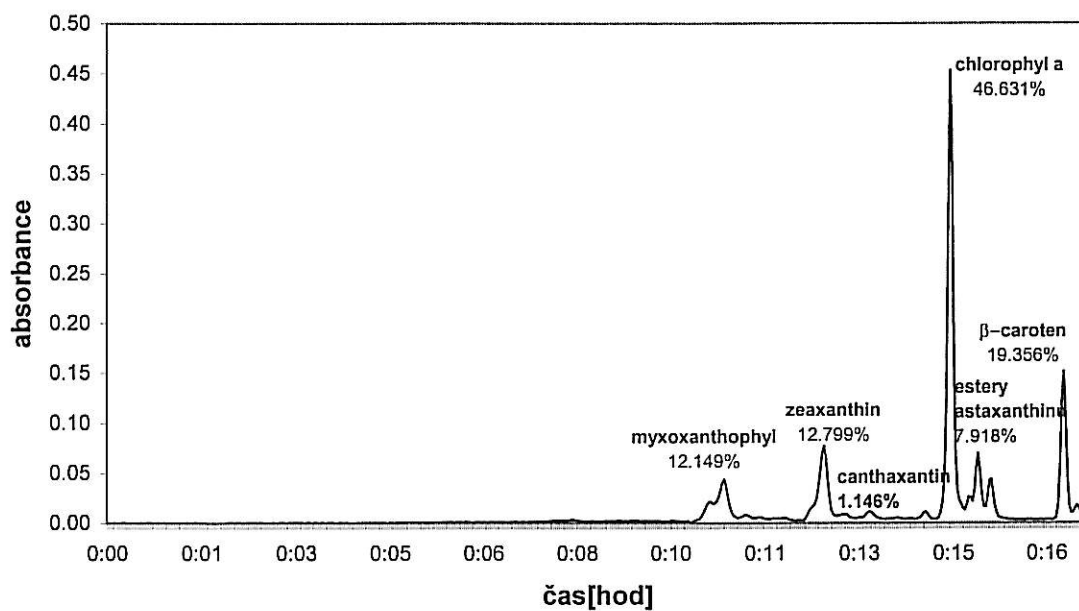
Chromatogram č.6 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH6



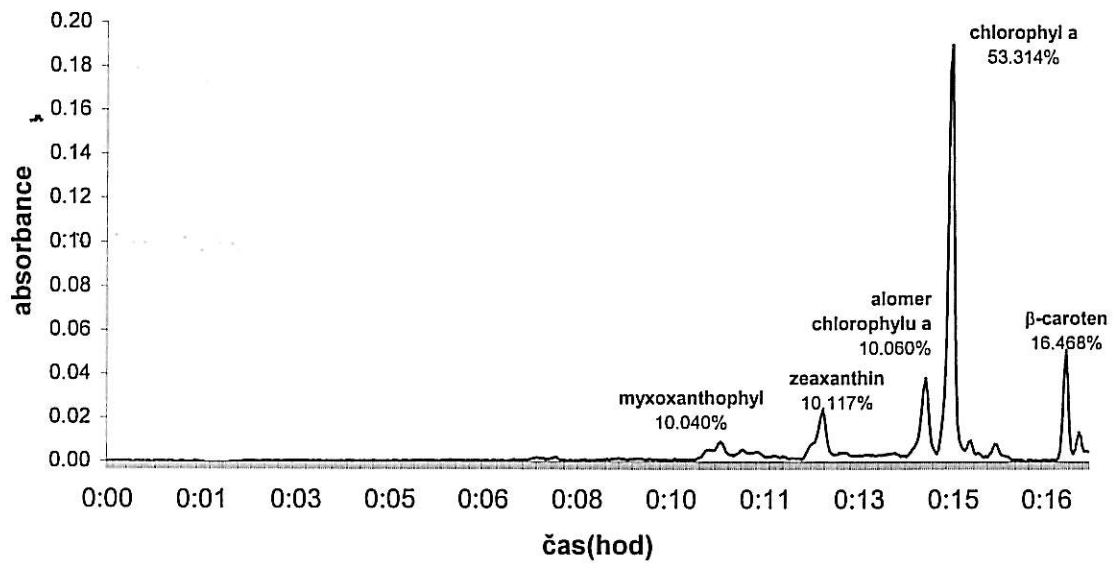
Chromatogram č.7 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH7



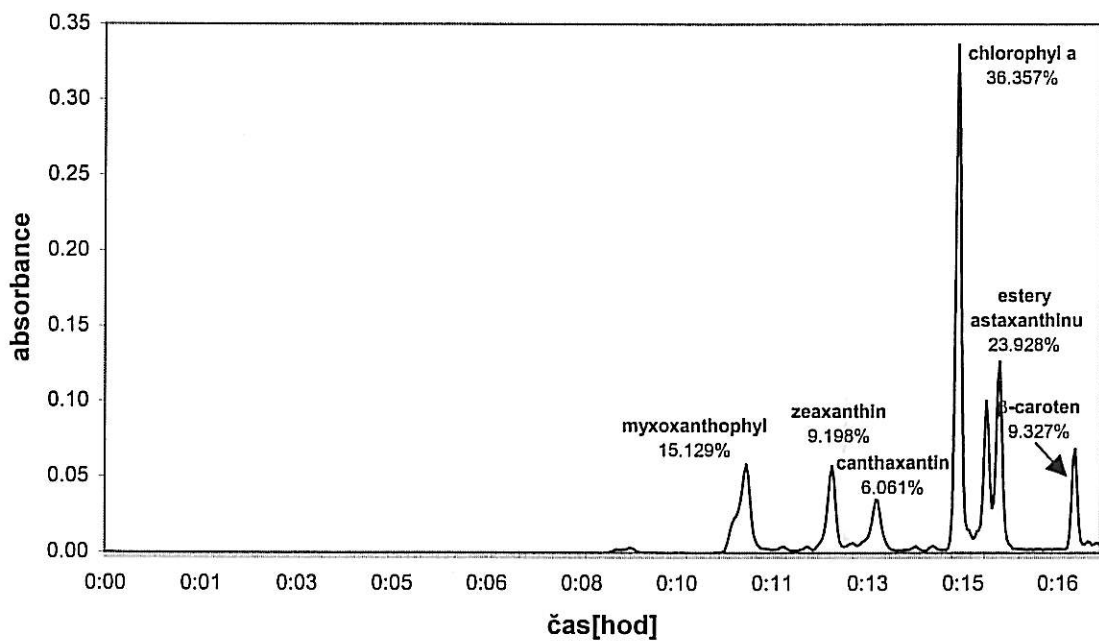
Chromatogram č.8 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH8



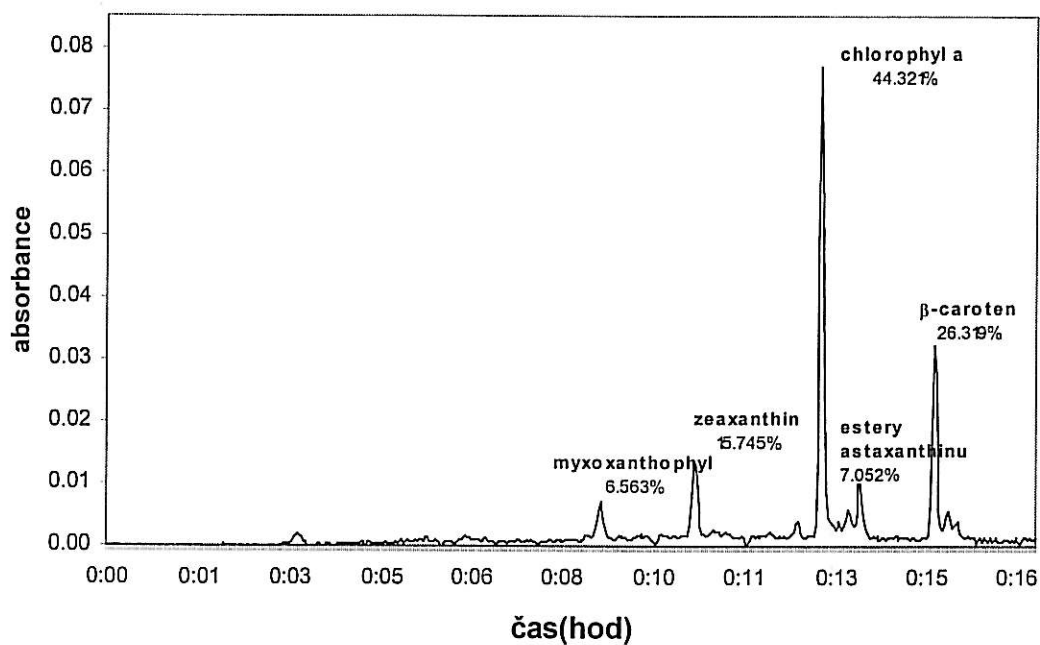
Chromatogram č.9 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH9



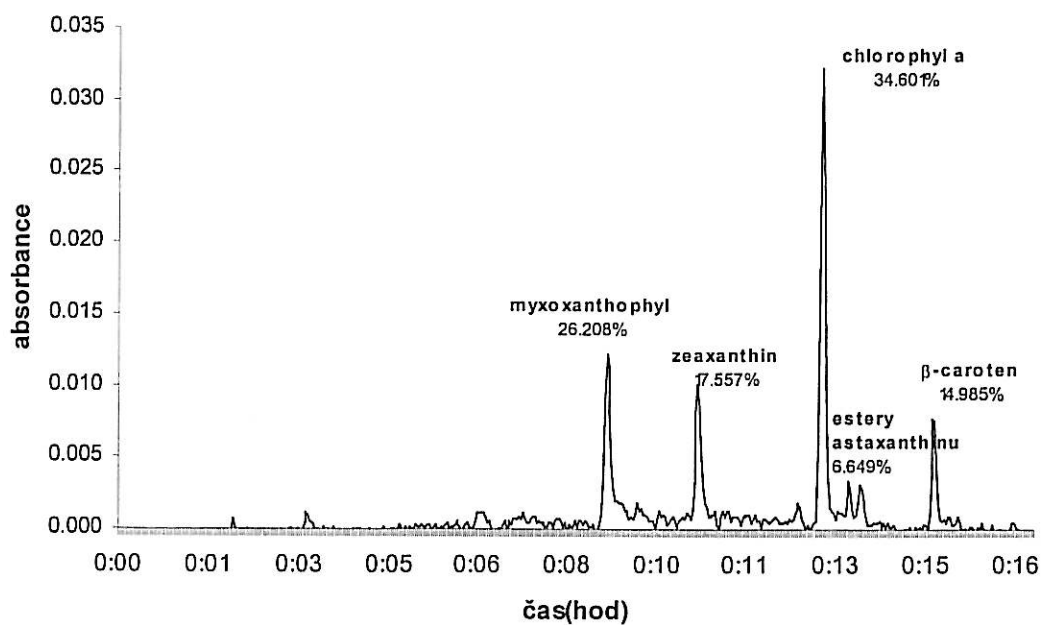
Chromatogram č.17 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene LPT



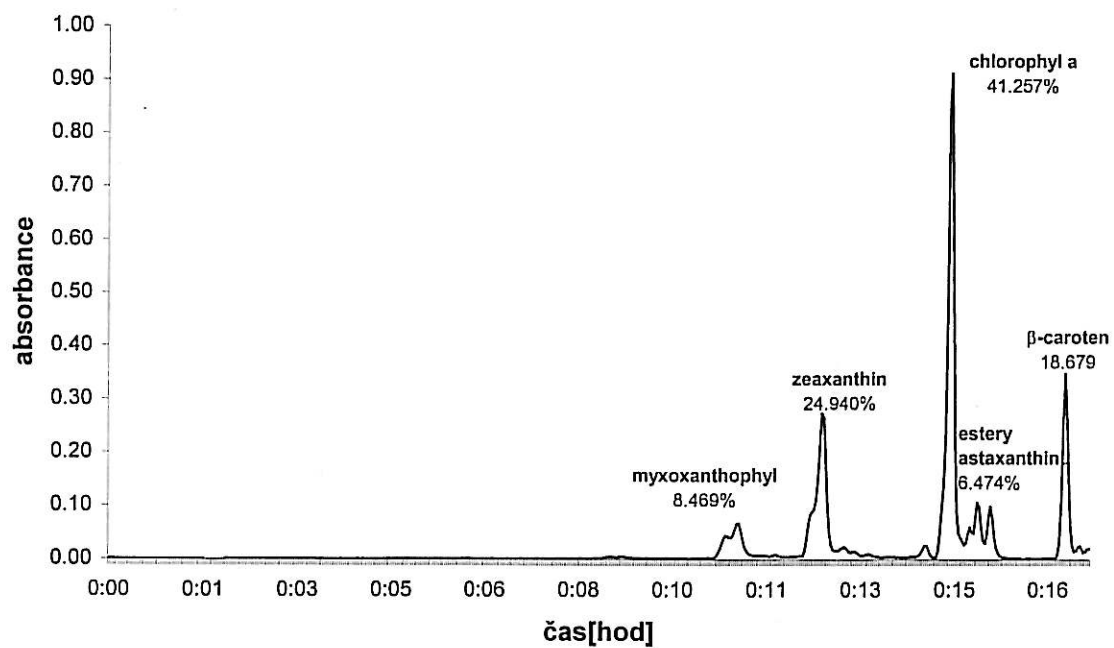
Chromatogram č.10 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH10



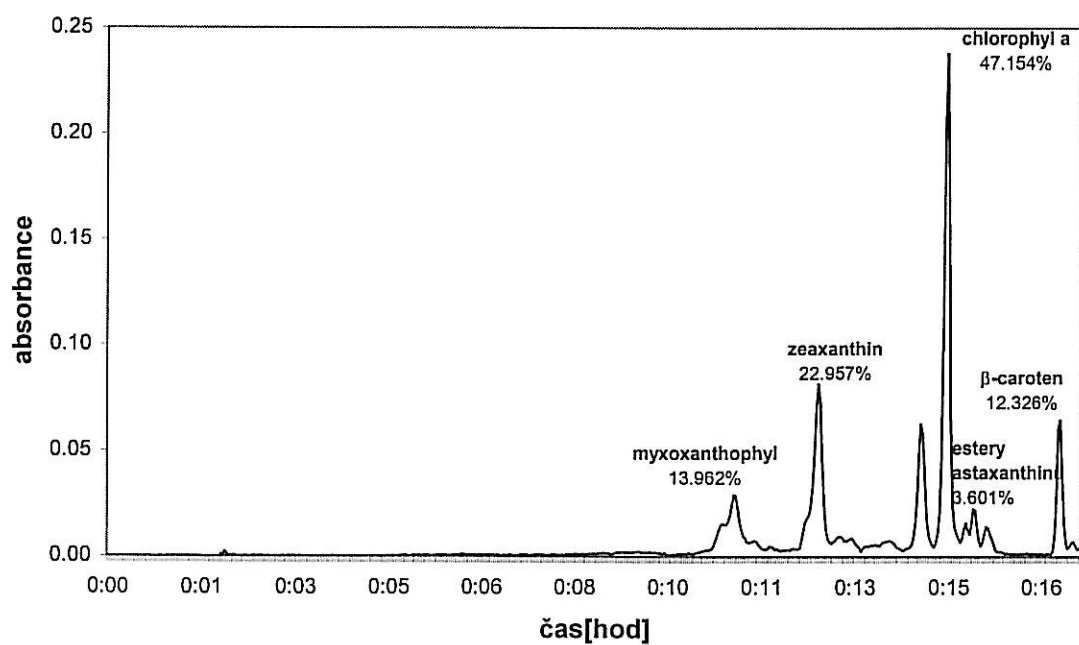
Chromatogram č.11 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH11



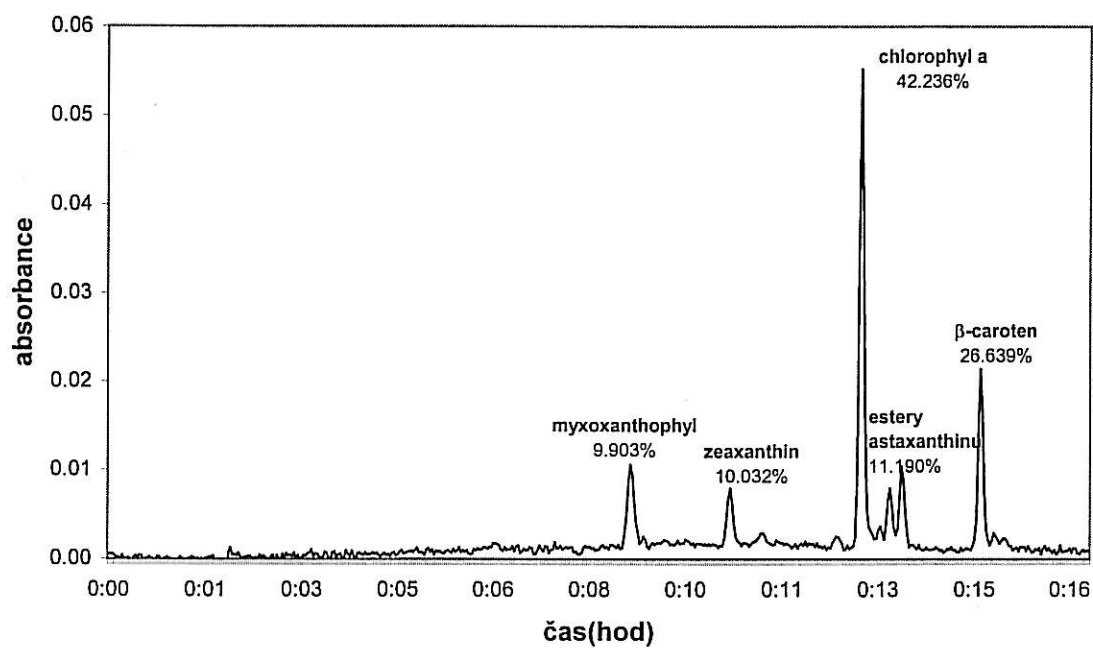
Chromatogram č.12 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH12



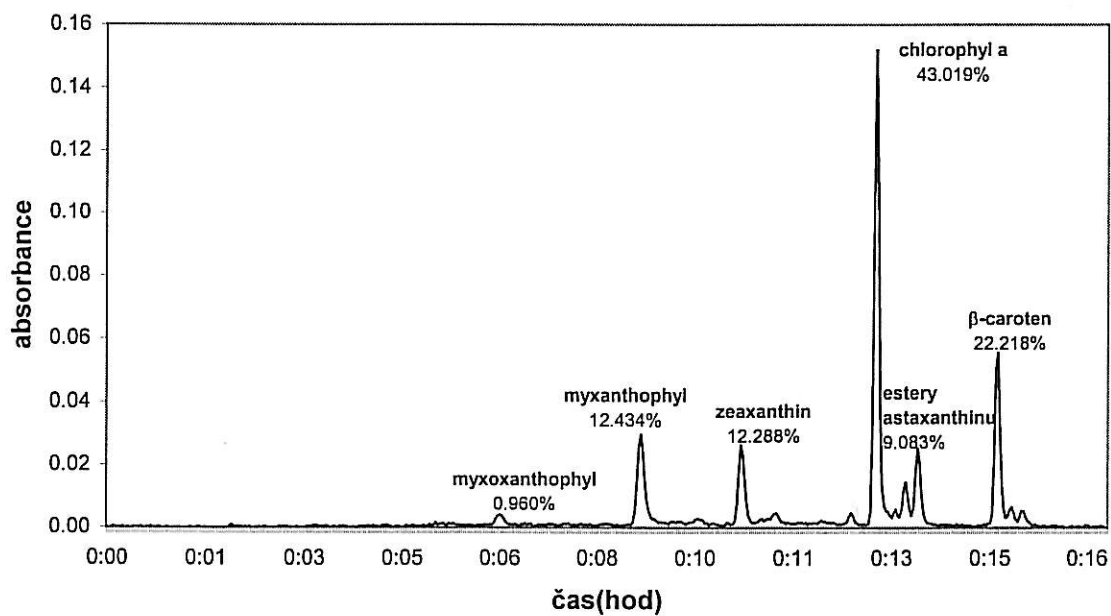
Chromatogram č.13 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH13



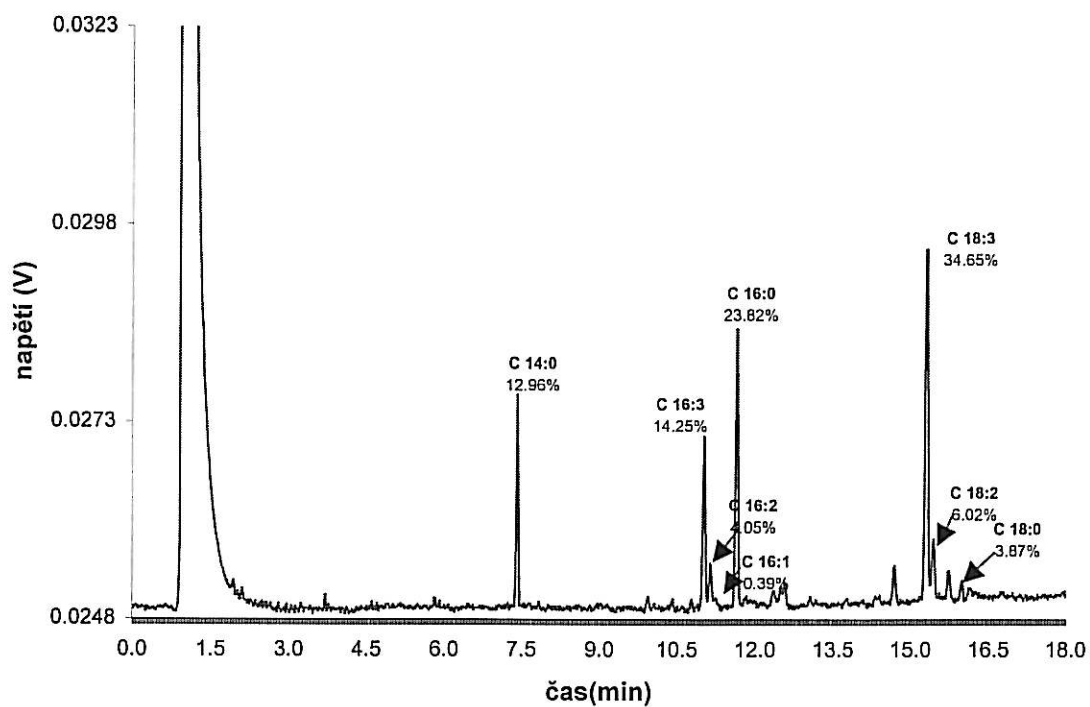
Chromatogram č.14 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH14



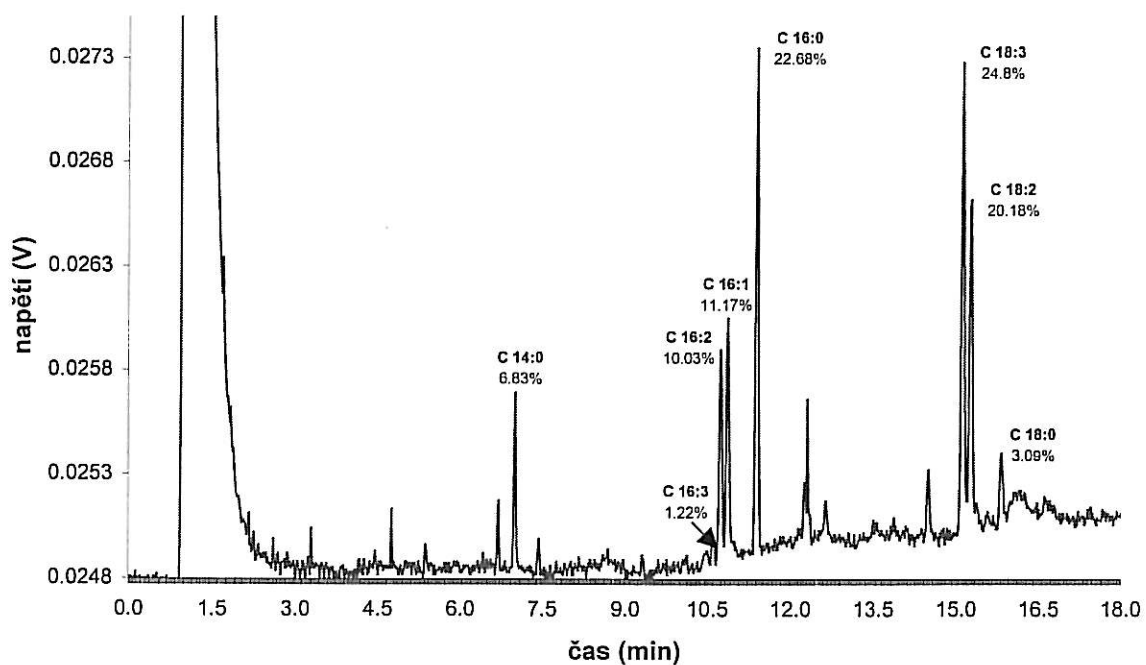
Chromatogram č.15 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH15



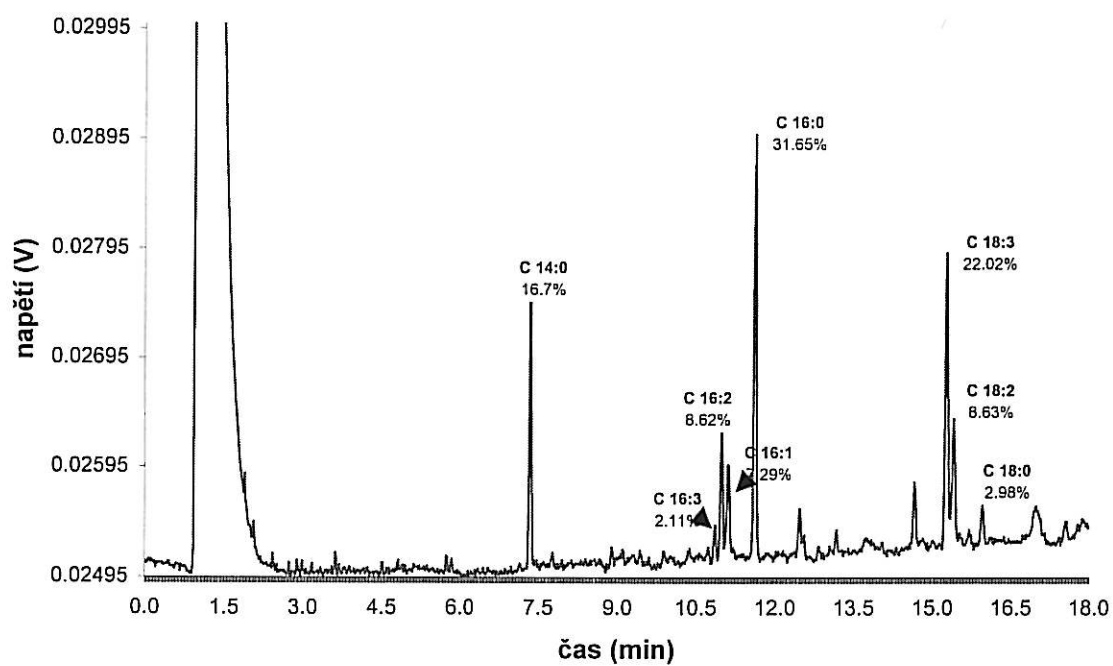
Chromatogram č.16 : Procentuální zastoupení pigmentů u kmene PH16



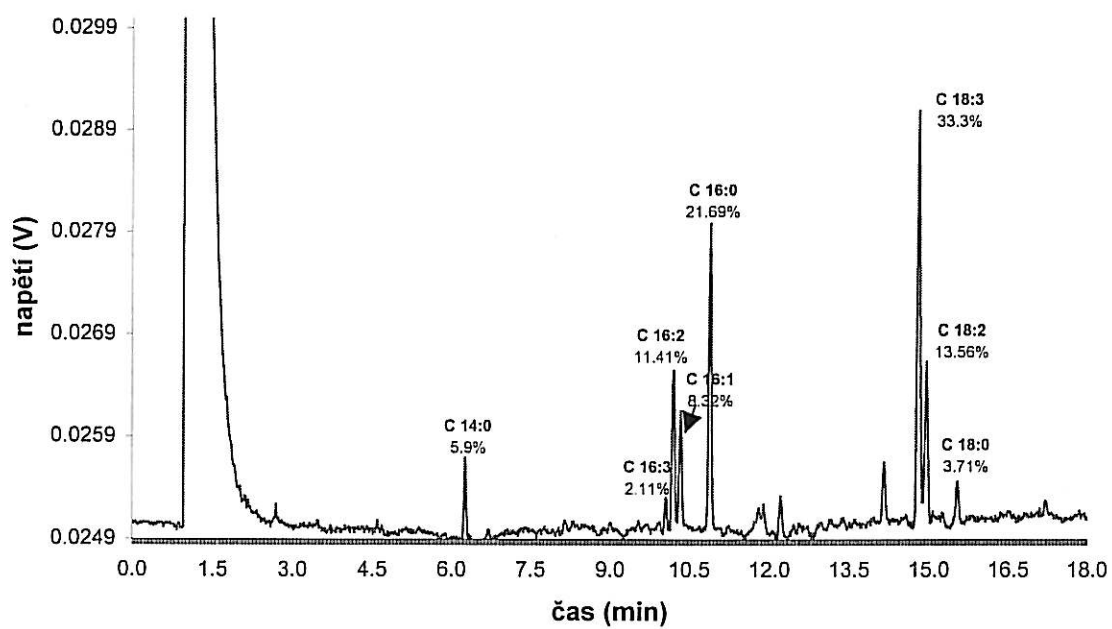
Chromatogram č.1: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH1



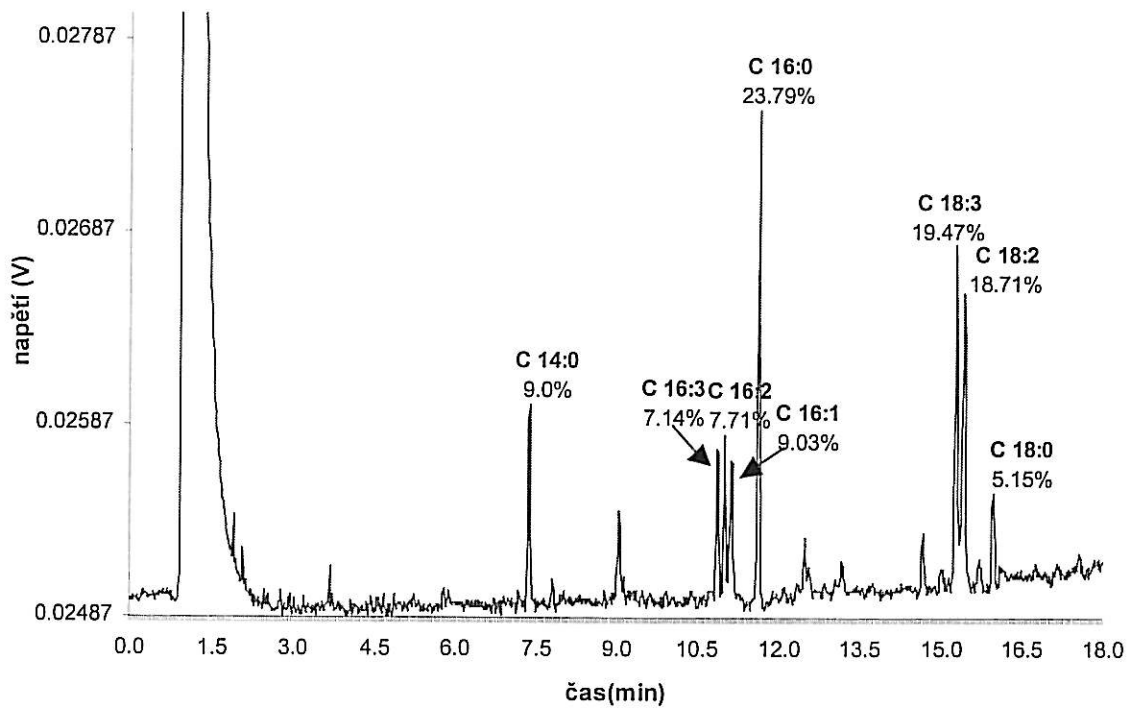
Chromatogram č.3: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH3



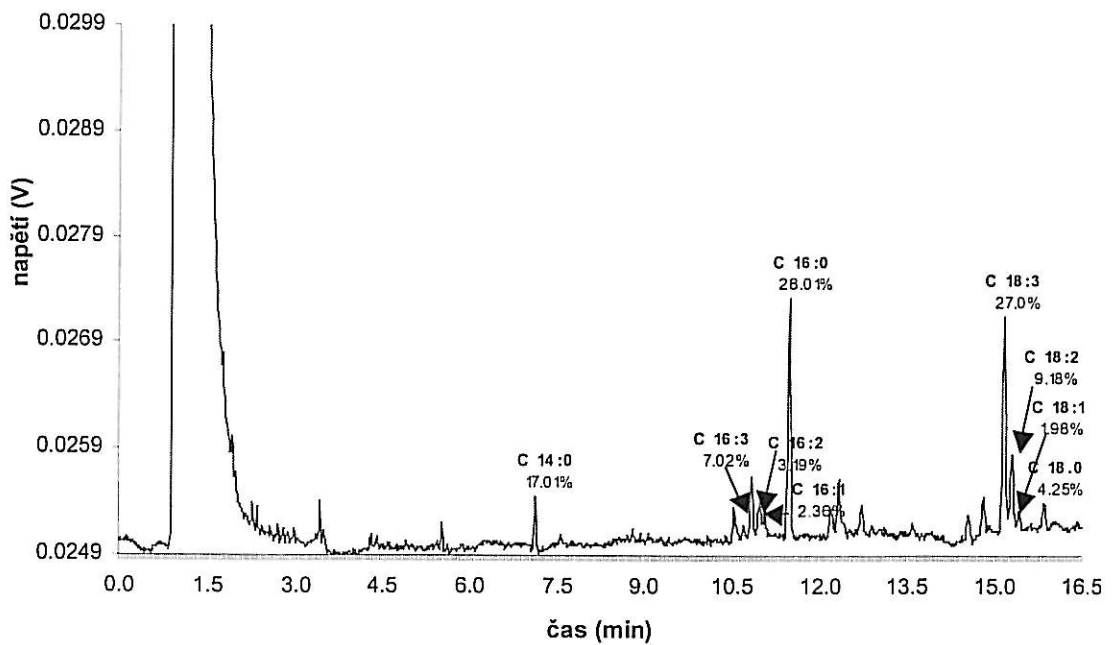
Chromatogram č.4: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH4



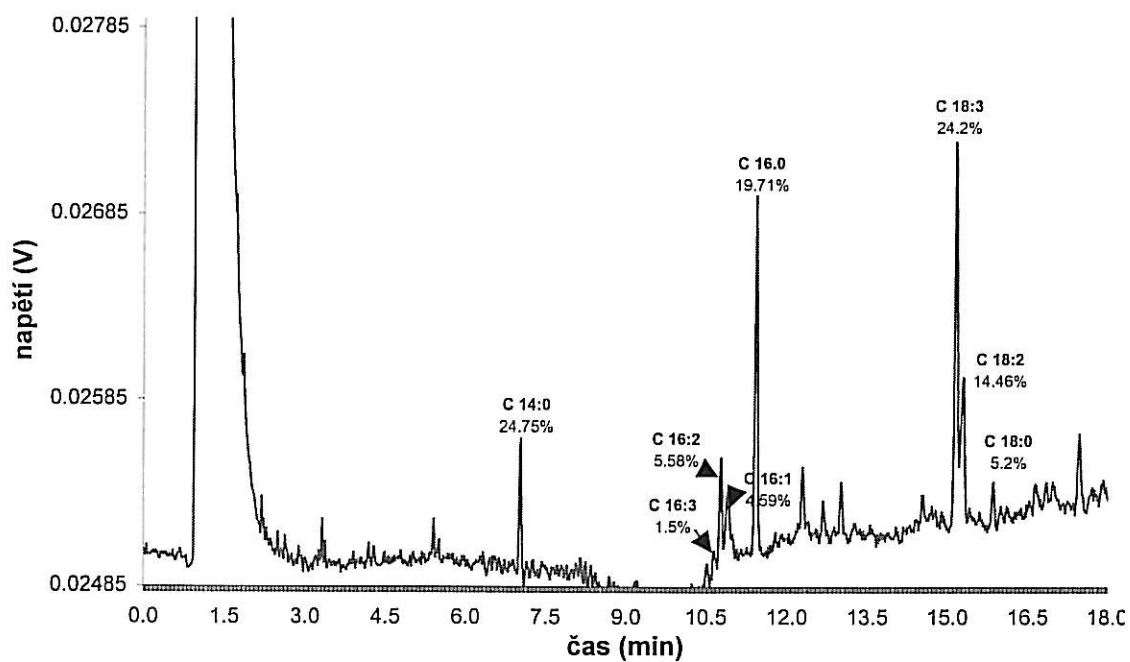
Chromatogram č.5: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH5



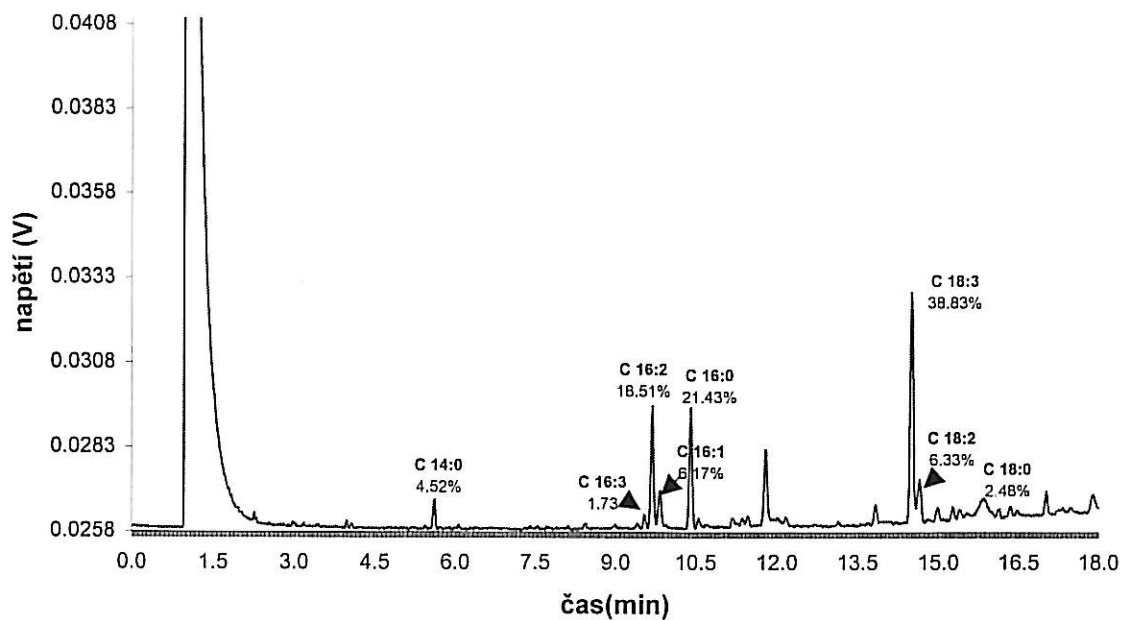
Chromatogram č.7: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH7



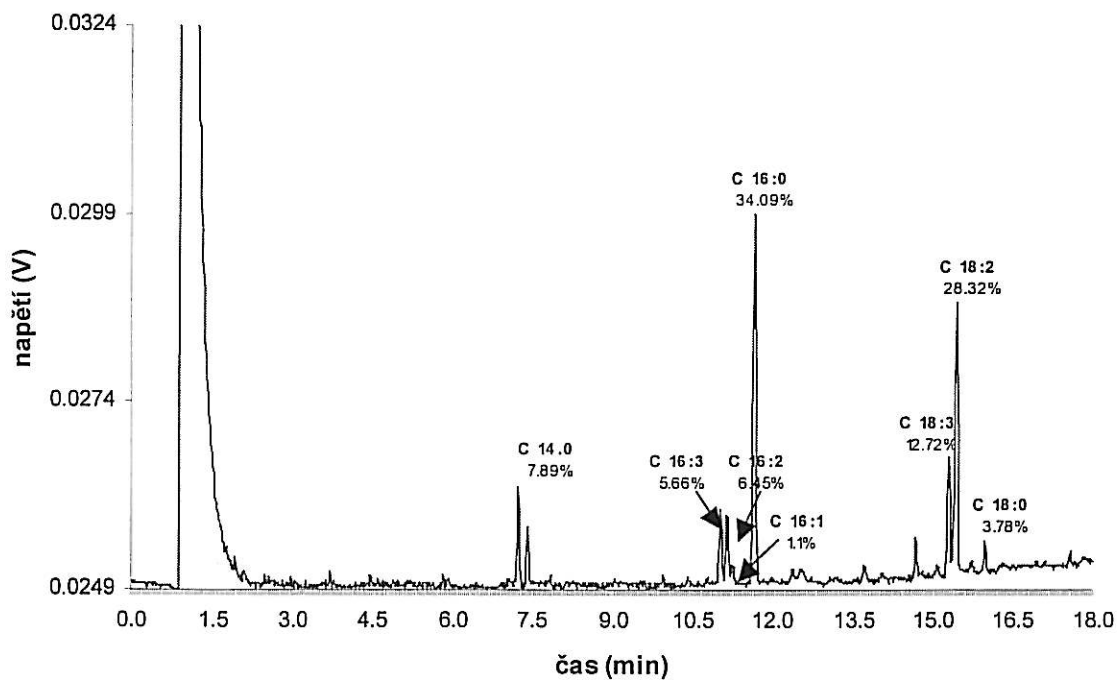
Chromatogram č.8: : Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH8



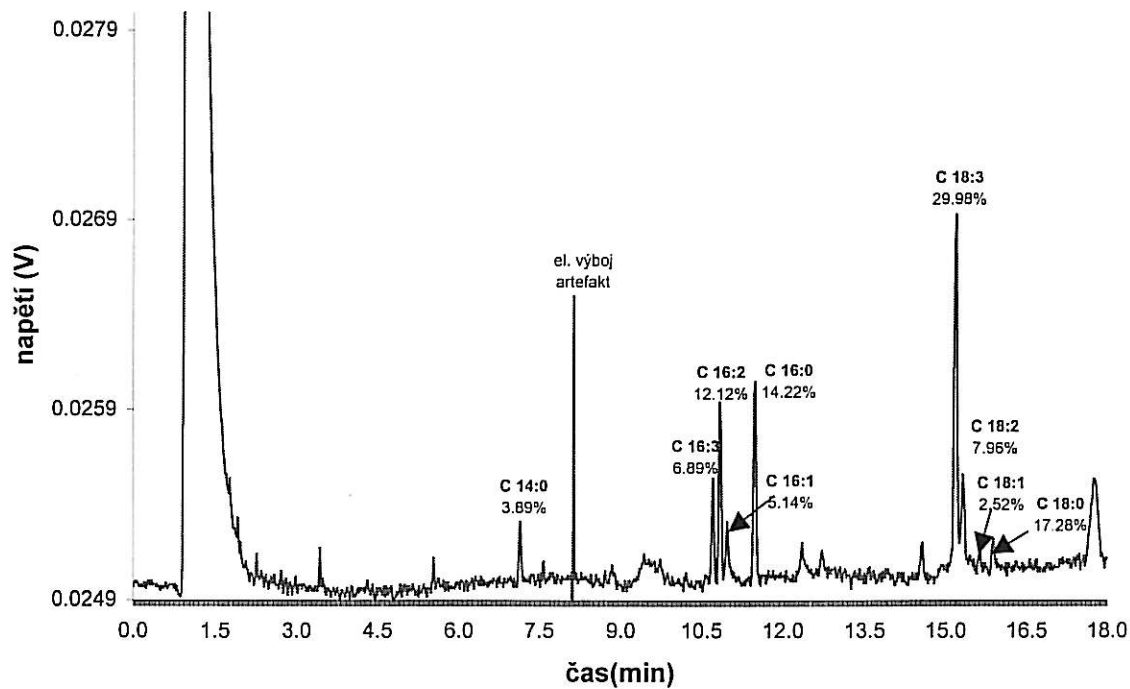
Chromatogram č.9: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH9



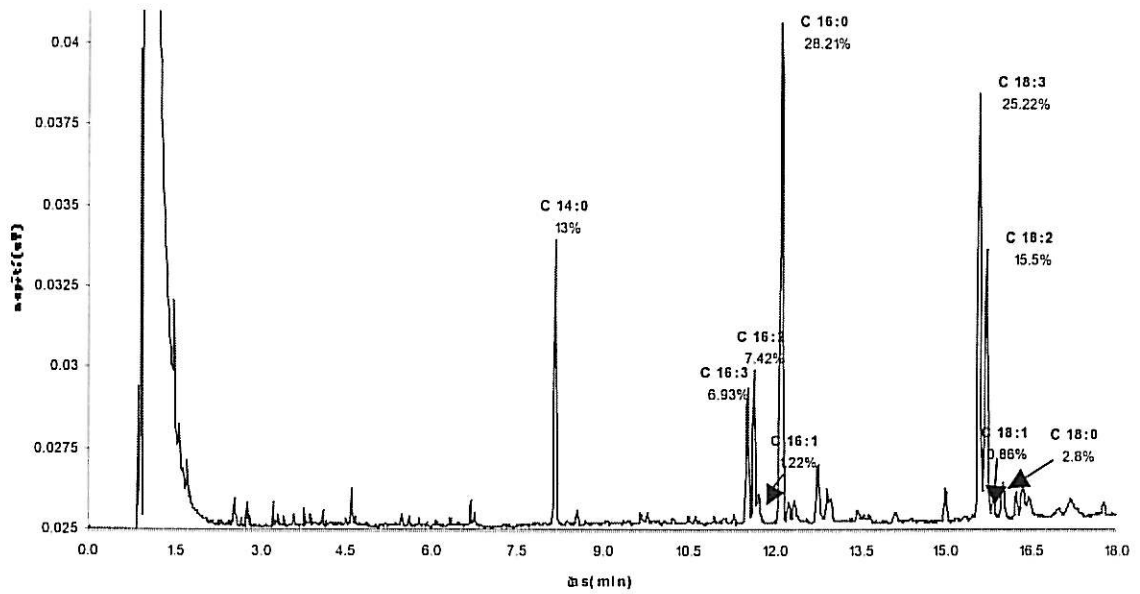
Chromatogram č.10: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH10



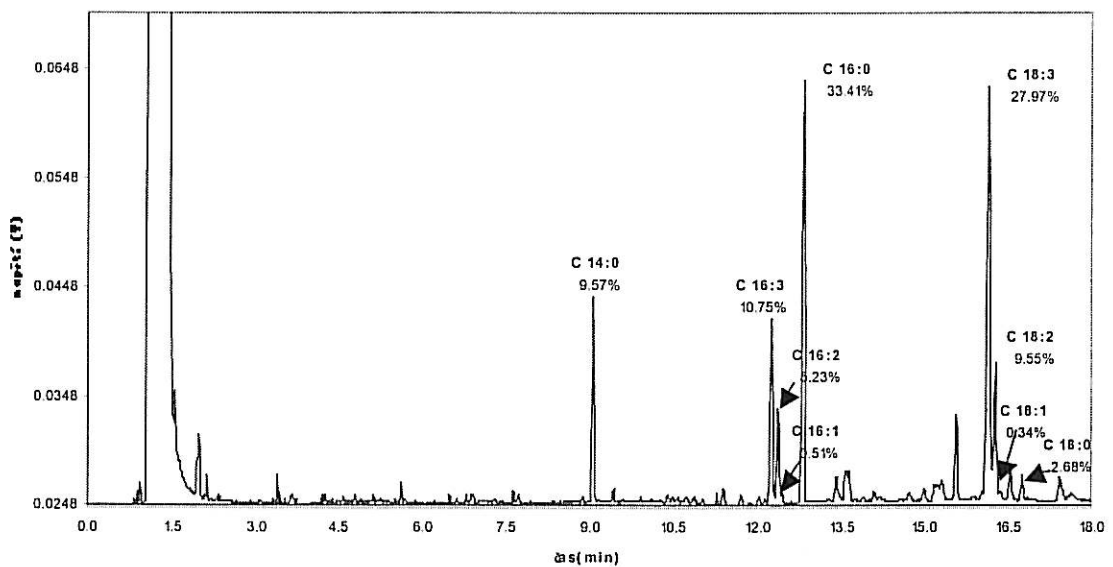
Chromatogram č.11: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH11



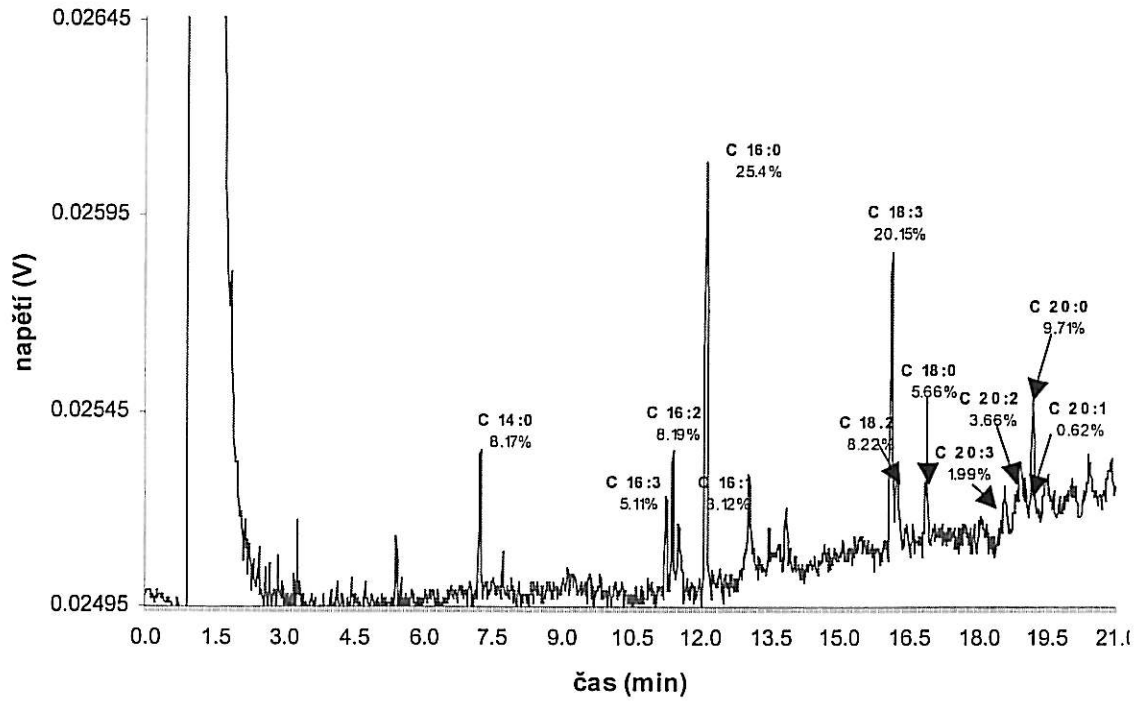
Chromatogram č. 12: : Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH12



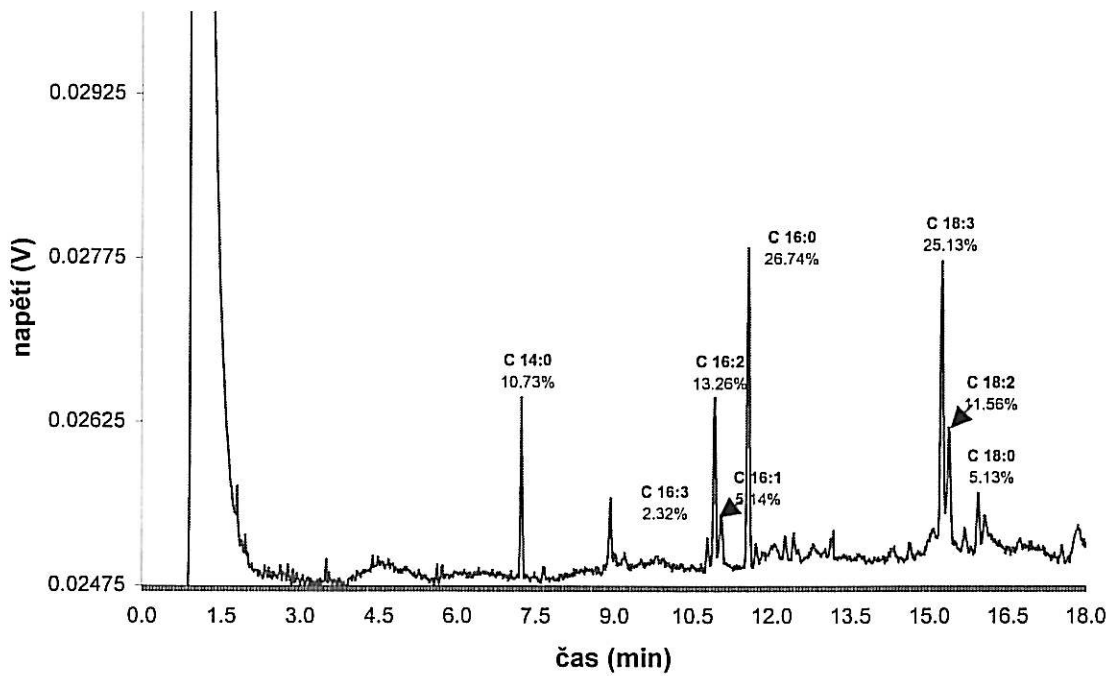
Chromatogram č.13: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH13



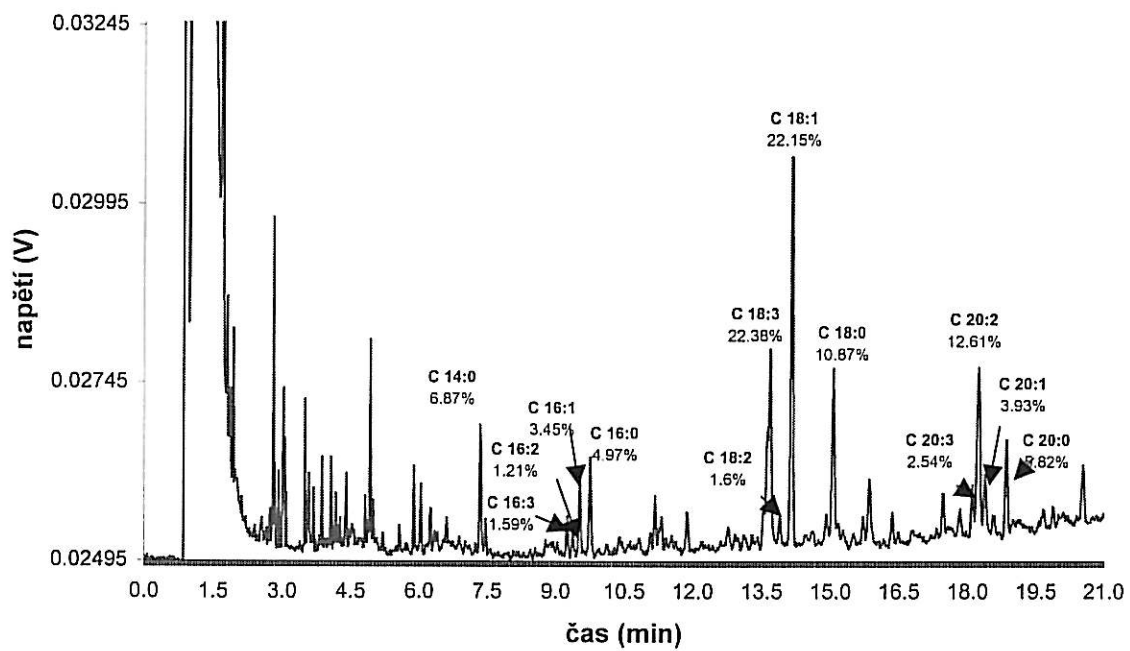
Chromatogram č. 14: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH14



Chromatogram č.15: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH15



Chromatogram č.16: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene PH16



Chromatogram č.17: Procentuální zastoupení mastných kyselin u kmene LPT