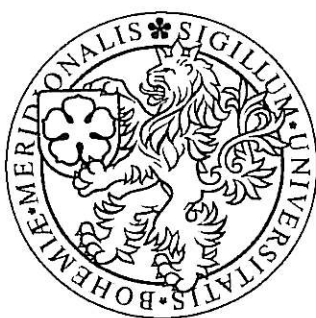


Biologická fakulta Jihočeské university
České Budějovice



Bakalářská práce

**Polyfázický přístup k fylogenezi
sinic řádu Chroococcales**

Jana Korelusová
2005

Školitel: RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D.



Korelusová, J. (2005): Polyfázický přístup k taxonomii sinic řádu Chroococcales [The polyphasic approach to the taxonomy of the cyanobacterial order Chroococcales, Bc. Thesis, in Czech] University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, České Budějovice. 44 pp.

Anotace

Fylogenetický strom pro 122 sekvencí hlavně chroococcaleaných kmenů byl konstruován a ultrastruktura 16 vybraných kmenů Cyanobacteria řádu Chroococcales byla zkoumána. Tyto údaje a ultrastrukturní údaje známé z literatury byly přiřazeny ke fylogenetickému stromu. Skupování kmenů s podobným thylakoidálním vzorem bylo diskutováno.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, jen s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 9.5. 2005

Jana Korelusová

Poděkování

Chci poděkovat Hanysovi za to, že se mě ujal, když mi zkrachovala původní bakalářka a já nevěděla co budu dělat, a že mi zadal práci, která mě baví. Další poděkování patří všem, kteří mi pomohli a poradili při vypracování (milým lidem z laboratoře elektronové mikroskopie, Ogarovi za pomoc se stavbou fylogenetických stromečků, panu profesoru Komárkovi, za debatu nad stromečkem, Aničce za její bakalářskou práci,...). Děkuji taky rodičům, že mi umožňují tady vůbec studovat a v neposlední řadě všem kamarádům, kteří z velké části můžou za to, že se mi tu to studium líbí. A díky všem co mě kdy jistili na skalách, že mě nepustili a já to mohla dopsat...

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Přístupy k taxonomii sinic.....	1
1.1.1. Morfologický přístup.....	1
1.1.2. Ultrastruktura.....	3
1.1.3. Biochemie.....	3
1.1.4. Ekologie, geografie.....	4
1.1.5. Molekulární přístup.....	4
1.1.5.1. Srovnání procent DNA basí ("GC komplex").....	5
1.1.5.2. DNA-DNA hybridizace.....	5
1.1.5.3. Genomové sekvenování.....	6
1.1.5.4. Sekvenování 16S rDNA.....	6
1.1.5.5. ITS (Internal Transcribed Spacer).....	7
1.1.5.6. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	8
1.1.6. Polyfázický přístup k taxonomii sinic.....	8
1.2. Taxonomie sinic.....	9
1.3. Cíle práce.....	11
2. Materiál a metodika.....	12
2.1. Kmeny sinic.....	12
2.2. Media.....	12
2.3. Podmínky kultivace.....	13
2.4. Optická mikroskopie.....	13
2.5. Transmisní elektronová mikroskopie.....	13
2.6. Fylogenetická analýza.....	13
3. Výsledky.....	17
3.1. Optická mikroskopie.....	17
3.2. Transmisní elektronová mikroskopie.....	17
3.3. Fylogenetická analýza (Maximum likelihood).....	19
3.3.1. Outgroup a kmeny brzo se odvětvující.....	21
3.3.2. Skupina 1 (Synechococcus).....	21
3.3.3. Skupina 2 (Synechococcus, Cyanobium).....	21
3.3.4. Skupina 3 (Chroococidiopsis).....	22

3.3.5. Skupina 4 (Nostocales).....	22
3.3.6. Skupina 5 (Pseudanabaena).....	23
3.3.7. Skupina 6 (Gloeothece, Cyanothece, Gloeocapsa).....	23
3.3.8. Skupina 7 (Microcystis).....	23
3.3.9. Skupina 8 (Synechococcus).....	24
3.3.10. Skupina 9 (Synechocystis).....	24
3.3.11. Skupina 10 (Euhalothece, Halothece).....	24
3.3.12. Skupina 11 (Pleurocapsales).....	25
3.3.13. Skupina 12 (Cyanobacterium).....	25
3.3.14. Kmeny nezahrnuté do větších klastrů.....	26
3.4. Výsledky metody Maximum likelihood pro redukovaný počet kmenů.....	26
4. Diskuse.....	28
4.1. Diskuse k fylogenetickým stromům.....	28
4.1.1. Outgroup a kmeny brzo se odvětvující.....	29
4.1.2. Skupina 1 (Synechococcus).....	29
4.1.3. Skupina 2 (Synechococcus, Cyanobium).....	30
4.1.4. Skupina 5 (Pseudanabaena).....	30
4.1.5. Skupina 8 (Synechococcus).....	31
4.1.6. Skupina 9 (Synechocystis).....	31
4.1.7. Skupina 11 (Pleurocapsales).....	31
4.1.8. Skupina 12 (Cyanobacterium).....	31
4.1.9. Kmeny nezahrnuté do větších klastrů.....	32
4.2. Strom s redukovaným počtem kmenů (obr.4).....	33
4.3. Vyčlenění rodu Cyanobium, Cyanobacterium.....	34
4.4. Postavení thylakoidů v rámci fylogenetického stromu.....	36
5. Závěr.....	36
6. Literatura.....	37

1. Úvod

1.1. Přístupy k taxonomii sinic

Diverzita sinic se projevuje jejich morfologickými, biochemickými a fyziologickými vlastnostmi, které jim umožňují se přizpůsobit a přežít v širokém spektru prostředí. Tato diverzita je výsledkem dlouhé evoluce. Zkameněliny podobné sinicím byly zaznamenány v sedimentech starých asi 3500 milionů let (SCHOPF 1993).

Stejně jako u jiných organismů jsou vlastnosti sinic fenotypovým projevem určitého genotypu. Tradičně bylo cílem systematiky analyzovat, zpracovat a uspořádat fenotypy. Z tohoto úsilí vyplývala snaha rekonstruovat fylogenetickou historii a stanovit příbuznost a vztahy mezi jednotlivými organismy. Tento přístup má několik objektivních limitací - jednou z nich je obtížná rozlišitelnost vrozených znaků od znaků indukovaných životním prostředím. Další je např. rozhodnutí, zda stejný fenotyp odráží blízkou taxonomickou příbuznost (homologii), nebo je výsledkem konvergentní evoluce (analogie).

Jelikož má většina prokaryot jednoduchou morfologii, jejich klasifikace je založena hlavně na vlastnostech které lze zkoumat jen v čistých kulturách, např. na fyziologických kritériích. Oproti tomu jsou sinice relativně velká a komplexní skupina, u které je možno spoléhat i na morfologická kritéria.

K vlastní taxonomii sinic existují dva hlavní přístupy: bakteriologický (CASTENHOLZ 2001) a botanický (GEITLER 1932, DESICACHARY 1959, STARMACH 1966). Každý z těchto přístupů má své výhody i nevýhody. V poslední době se upřednostňuje kombinace obou - tzv. polyfázický přístup (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985, 1988, 1990, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986, 1989, FLECHTNER ET AL. 2002). Syntéza těchto přístupů je ale obtížná a dosud neexistuje jednotný názor na její fungování.

V následujících kapitolách se budu věnovat jednotlivým přístupům a kritériům užívaným v taxonomii sinic.

1.1.1. Morfologický přístup

Základem morfologického přístupu jsou vlastnosti pozorovatelné a měřitelné světelným mikroskopem: tvar buňky, rozměry buněk a vláken (pro charakterizaci taxonu je důležitá velikost buněk, přestože překrývající se rozsahy velikostí můžou rozlišení taxonů velmi ztížit nebo znemožnit), způsob dělení, počet směrů a úhel dělení, tvar kolonie, přítomnost a kvalita extracelulárních pochev a obalů, diferenciacce a uspořádání buněk, tvorba heterocytů a akinet, pohyblivost, atd.

Na základě těchto vlastností byla vytvořena taxonomická klasifikace a bylo určeno přes 250 druhů jednobuněčných sinic (GEITLER 1932). Hlavním problémem je značná

variabilita morfologických znaků v závislosti na podmínkách prostředí. Velikost buněk a plán dělení se mohou změnit tak drasticky, že určení druhu se stane obtížným či dokonce nemožným (PALINSKA ET AL. 1996). Izolace sinic z jejich přirozených stanovišť do podmínek laboratorních kultur (typ a množství světla, salinita, mikroprvky, medium, teplota) může mít také dramatický dopad na jejich buňku a morfologii agregátů (pod mikroskopem jsou během kultivace pozorovány velké změny). Podle studie provedené na vzorcích z jednoho antarktického jezera ukázaly kultivované vzorky také nižší diverzitu než přírodní vzorky, stejně jako molekulární metody odhalily daleko větší druhovou diverzitu než bylo známo na základě tradičních mikroskopických analýz. Endemické druhy byly mnohem běžnější, než bylo odhadováno na základě morfologických znaků. Přirozené vzorky se lišily od kultivovaných jak druhovým složením, tak i dominancí jednotlivých druhů a druhovou bohatostí (TATON ET AL. 2003), což může být způsobeno i technickými limitacemi analýz užitých v jednotlivých studiích.

Jak už bylo zmíněno, ve srovnání s originálním materiálem vedou změny kultivovaných vzorků k fenotypům, které by mohly být přiděleny k jiným druhům nebo dokonce rodům. PALINSKA ET AL. (1996) provedla studii jejíž původní izoláty byly určeny jako různé druhy rodu *Merismopedia*, po čase kultivace v laboratorních podmínkách změnilly morfologii agregátů a podobaly se rodu *Synechocystis*. Heterocytózní *Chlorogloeopsis* HTF ve studii WILMOTTE ET AL. (1992) ztratil schopnost tvořit heterocyty mutací. To bylo pozorováno i u jiných kmenů (*Nostoc*, *Anabaena*) kultivovaných po dlouhou dobu za přítomnosti nitrátů.

Dalším příkladem je rod *Microcystis*. Sinicový vodní květ rodu *Microcystis* je vážným ekologickým a zdravotním problémem kvůli jeho schopnosti dominovat v planktonu a produkovat toxiny, které negativně působí na vodní organismy i zvířata a lidi konzumující vodu. V celosvětovém měřítku je *M. aeruginosa* nejběžněji zaznamenávaným druhem způsobujícím hepatotoxicitu a zápach jezer a vodních nádrží. Stávající taxonomie rodu je primárně založena na morfologických charakteristikách (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986). Studie provedené na druzích *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis ichthyoblabe*, *Microcystis novacekii*, *Microcystis viridis* a *Microcystis wesenbergii* ukázaly, že některé kmeny si udržely způsob a charakteristiku tvorby kolonií stále stejnou po dobu kultivace, jiné byly variabilní a tvořily kolonie podobné i jiným druhům. Rozlišení druhů bylo mnohdy nemožné a způsob tvorby kolonií se ukázal jako nedostatečný taxonomický znak (OTSUKA ET AL. 2000).

Morfologický přístup zahrnuje také neodstranitelnou subjektivní složku. Přes množství limitací má morfologická analýza i značné výhody. Může být stejně dobře použita pro vzorky sebrané v terénu jako pro laboratorní kultury, je praktická a snadno použitelná. Průběžná pozorování umožňují porovnání a odhadnutí přirozených změn. Morfologická analýza je také jediná použitelná pro studium fosilií.

1.1.2. Ultrastruktura

V posledních desetiletích byla shromážděna i ultrastrukturální data užitím transmisní a scanovací elektronové mikroskopie a poskytla nový zdroj užitečných informací. Některé novější práce (KOMÁREK ET AL. 2004, KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003) považují postavení thylakoidů za jeden z velmi důležitých znaků, který je nutný zahrnout mezi taxonomická kritéria.

Nynější systém sinic je umělý a většina tradičních řádů (Chroococcales, Oscillatoriales, Pleurocapsales *sensu* CASTENHOLZ 2001) se ukázala být polyfyletická. Vlákňité a kokální kmeny spolu tvoří monofyletické skupiny. Podle práce KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ (2003) mají kmeny v těchto monofyletických větvích víceméně shodné postavení thylakoidů. Z toho vyplývá, že molekulární i ultrastrukturální kritéria si navzájem odpovídají a vztahy mezi kokálními a vláknitými sinicemi jsou mnohdy bližší, než mezi vláknitými sinicemi navzájem a kokálními sinicemi navzájem.

V jiných pracech bylo pomocí TEM zkoumáno buněčné dělení (jakožto významný taxonomický znak), vchlipování jednotlivých vrstev thylakoidů a dělení jádra (PORTA ET AL. 2000).

1.1.3. Biochemie

Vedle morfologických metod se velmi rozvinuly metody biochemické, zkoumající fyziologii buněk a jejich produkty (toxiny, mastné kyseliny, pigmenty,...). Ne všechna tato kritéria se ale ukázala použitelná pro taxonomii a rekonstrukci fylogeneze.

V práci KANE ET AL. (1997) bylo poukázáno na bližší příbuznost kmenů *Synechococcus* obsahujících různá fotosyntetická barviva, než mezi kmeny se stejným barvivem vzájemně. Ani obsažená barviva nemusí tedy vždy nutně odrážet fylogenetické vztahy (ERNST ET AL. 2002, OTSUKA ET AL. 1998).

Použití rozdělení podle různého stupně nenasycených mastných kyselin více odpovídá fylogenezi na základě nukleotidových analýz, než existujícímu dělení podle morfologie. Dobře odráží fylogenetickou strukturu např. řádu Chroococcales (LITVAITIS 2002). Rozdílné složení mastných kyselin přispělo také k rozdělení rodu *Synechococcus* na *Cyanobium* a *Cyanobacterium* (PORTA ET AL. 2000), které bylo předpokládáno už v práci RIPPKA & COHEN-BAZIRE (1983). Kmeny s buňkami menšími než 3 μm v průměru lze rozlišit podle rozdílného složení mastných kyselin a lipopolysacharidů i složení bází DNA.

Do středu zájmu ve výzkumu sinic se dostala také produkce toxinů (OTSUKA ET AL. 1999). NEILAN ET AL. (1997) zjistili sekundární struktura 16S rRNA a vytvořili primery umožňující identifikaci potenciálně toxických sinic rodu *Microcystis* pomocí DNA amplifikace.

Další důležité vlastnosti jsou fyziologické: např. absorpční spektrum *in vivo*, chromatické adaptace, přítomnost fykoerithrinu, tolerance salinity, obsah buňky a jejích obalů a požadavky na vitamíny (CASTENHOLZ & WATERBURY 1989).

1.1.4. Ekologie, geografie

Kritéria ekologie a geografického výskytu bývají v taxonomii často opomíjena a u mnoha laboratorních kultur tyto informace chybí. Zajímavé jsou studie kmenů rodu *Microcystis* izolovaných z různých částí světa, kde byla sekvenční similarita 16S rDNA až 99% (NEILAN ET AL. 1997). Různé kmeny rodu *Nodularia* jsou oproti tomu velmi rozdílné (BOLCH ET AL. 1999).

Významné se ukázalo ekologické hledisko u *Halotheca*, *Euhalotheca* klastru kokálních sinic podpořené molekulárními analýzami. Tento klastr sdružuje mnohdy poměrně morfologicky vzdálené kmeny, které spojuje hlavně jejich ekologická vlastnost – tolerance ke zvýšené koncentraci solí. Toto přizpůsobení se stává tedy i důležitým taxonomickým znakem.

Pro ekologické studie byly vyvinuty speciální metody i na bázi molekulárních analýz. Jednou z nich je i DGGE/TGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Tyto metody jsou založeny na rozdílných teplotách tání PCR amplifikovaných rDNA fragmentů stejné délky (různé sekvence) a jejich snižující se mobilitě v polyakrylamidovém gelu obsahujícím lineární gradient DNA denaturantů (urea + formamid) nebo lineární teplotní gradient. Tuto mobilitu snižuje rozpad dsDNA na ssDNA. Na gelu vznikají nespojitě proužky (různé teploty tání způsobuje různé složení sekvencí DNA a tím i různé pozice na gelu), kde počet proužků odpovídá počtu převládajících druhů ve společenstvu. Identifikace druhů se pak provádí sekvenováním jednotlivých proužků a srovnání sekvencí s dostupnou databází.

Tyto metody umožňují studovat změny společenstva v čase, jejich sukcesí, eutrofizaci, aktivitu jeho členů a pomocí specifických primerů pro amplifikaci sinicové 16S rDNA i diverzitu sinic v neaxenických kulturách (JANSE ET AL. 2003).

Pomocí DGGE byla zkoumána i mikroheterogenita rRNA genů (z čisté kultury bylo získáno až 10 různých proužků) což má dopad i na užití 16S rDNA - jak pro odhad biodiverzity, tak pro fylogenetické studie (BOYER ET AL. 2001) a oligonukleotidové primery specifické pro jednotlivé taxony. I tato metoda má ale spoustu limitací (MUYZER & SMALLA 1998, MUYZER 1999).

1.1.5. Molekulární přístup

Od 70. let se soustředila pozornost na sinice převedené a udržované ve sbírkách kultur (RIPPKA ET AL. 1979). Před 40ti lety byla zmíněna poprvé myšlenka, že evoluční změny jsou zaznamenány uvnitř molekulární struktury organismu a můžou být studovány srovnáváním sekvencí makromolekul jako jsou baze nukleových kyselin a aminokyselin. S vývojem techniky a vědeckého poznání se stále rozšiřují i možnosti molekulárních analýz. Molekulární ekologické studie výrazně zvýšily naši schopnost objevit a určit mikroorganismy v přírodě. Byly vyvinuty speciální PCR primery pro amplifikaci 16S rDNA ze sinic

(NÜBEL ET AL.1997). Pro spoustu sinic se ale používají techniky genetické manipulace vyvinuté pro jiné, více studované, heterotrofní bakterie. Např. některé sinice (*Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Anabaena* sp., *Plectonema boryanum*) byly transformovány pomocí plasmidů pro *Escherichia coli*. Metody pro extrakci sinicové DNA jsou velice časově náročné a často druhově specifické. Společně mají tyto metody lyzi buněk pomocí detergentu doprovázenou fenolovou extrakcí, kterou vzniká toxický odpad. Rozrůzněnost metod podle rodů či druhů je závislá pravděpodobně na veliké diverzitě morfologických fenotypů sinic (od jednoduchých jednobuněčných a vláknitých forem až ke kmenům se složitou větvenou strukturou). Navíc některé tyto mikroorganismy mají složité povrchové struktury („S-layer“, pili, fimbrie, slizové pochvy,...), které komplikují extrakci DNA. Problém je také s lyzí buněk vláknitých kmenů. MARLI ET AL. (2002) popsal metodu lyze buněk a získání DNA z několika sinicových rodů. Touto metodou lze extrahovat DNA z různých kmenů sinic za méně než 2 hodiny bez potřeby fenolové extrakce a s dostatečným ziskem pro manipulace jako je např. PCR.

Získání dat sekvenováním je důležité také proto, že je dokázáno, že morfologické znaky neodrážejí pravou genetickou a fyziologickou divergenci. V taxonomii nejen sinic se uplatňují hlavně následující postupy a analýzy:

1.1.5.1. Srovnání procent DNA basí ("GC komplex")

Ve studiích tohoto typu se sleduje procentuální obsah G+C bází, přičemž odlišný procentuální obsah G+C dokazuje, že organismy nejsou blízce příbuzné, zatímco stejné nebo podobné obsahy G+C neříkají o příbuznosti srovnávaných taxonů vůbec nic (NEILAN ET AL. 1997, ERNST ET AL. 2002).

1.1.5.2. DNA-DNA hybridizace

Při DNA-DNA hybridizaci se párují homologní neznámé sekvence srovnávaných organismů. Standardní odchylka typické párovací hodnoty DNA-DNA hybridizace je 4-8%. Metoda je velmi užitečná při srovnávání blízce příbuzných organismů, u méně příbuzných organismů klesá hodnota párování velmi rychle na neinterpretovatelnou hladinu (OTSUKA ET AL. 2001).

Na základě DNA-DNA hybridizace se provádí studie pro ověření platnosti různých druhů. Příkladem takové analýzy je práce OTSUKA ET AL. (2001) na několika druzích *Microcystis*. Všechny reasociační hodnoty DNA-DNA hybridizace přesahovaly mezi *M. aeruginosa* a zbývajícími čtyřmi druhy 70%, což postačuje podle současných kritérií pro jejich klasifikaci do jednoho druhu. Další dva druhy (*Microcystis flos-aquae* a *Microcystis pseudofilamentosa*) mohou být uznány podle těchto kritérií za samostatné druhy.

1.1.5.3. Genomové sekvenování

V genomových bankách přibývají sekvence jednotlivých genů i celé osekvenované genomy různých organismů (např. SJÖLING & COWAN 2003, NAKAMURA ET AL. 2002). Celková kompozice DNA však poskytuje bez informace o lokalizaci těchto bází v genomu jen hrubý obraz. Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů se používá většinou analýza různých genů, jedním z nejčastějších je gen pro malou podjednotku ribosomální RNA (16S rDNA), ale i další geny (nifH, rnpB, psbA, rpoC, rbcL, atpB, isiA, tufA, σ^{70} typ sigma faktorů).

1.1.5.4. Sekvenování 16S rDNA

Geny pro ribosomální RNA (16S, 23S, 5S) a pro tRNA jsou v bakteriální a archebakteriální říši vysoce konzervované, což je předurčuje pro využití v evolučních studiích (ERNST ET AL. 2002, NEILAN ET AL. 1997, HONDA ET AL. 1999, WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991). Struktura rRNA operonů je u bakterií až na výjimky 16S-23S-5S (GÜRTLER & STANISICH 1996). U většiny bakterií jsou rDNA geny součástí genomové rodiny umožňující rozrůznění operonů. Počet rRNA operonů je od 1 po 10 (*Bacillus subtilis*). Mezi jednotlivými kopiemi 16S genu byly detekovány rozdíly v jednotlivých nukleotidech, ale o mnoho větší variabilita byla zaznamenána ve spaceru mezi 16S a 23S rDNA (GÜRTLER & STANISICH 1996). Tato variabilita je používána k určování bakterií (PAYNE 2001) a k evolučním studiím (NELISSEN ET AL. 1996, OTSUKA ET AL. 1999).

rRNA sekvenování poskytuje více informací a fylogenetických vztahů než DNA-DNA hybridizace nebo samotné určení pořadí bází DNA (i na vyšších taxonomických úrovních). Pokud je nalezena správná homologie sekvencí (alignment), může být srovnáno velké množství kmenů, zatímco u DNA-DNA hybridizace je možné srovnat pouze dva kmeny najednou. Bylo odhadnuto, že kmeny stejného druhu musí mít alespoň 70% podobnost DNA-DNA hybridizace.

rRNA je universální molekula. Podobná struktura ve všech živých organismech poukazuje na její brzký vznik a relativně malé změny od jejího vzniku. Je důležitá při translaci, což jí dává nenahraditelnou funkci v buněčném cyklu. Sekundární struktura i nukleotidová sekvence je velmi konzervovaná. Obsahuje části konzervované přesně v několika říších a části, které se vyvíjejí víceméně rychle. rRNA jsou v buňce hojné, snadno extrahovatelné a identifikovatelné. 16S rDNA je dlouhá molekula (asi 1500 bp) umožňující kombinace mnoha vlastností s dostatečnou statistickou hodnotou výsledků.

Principiální problémy a limitace fylogenetické analýzy 16S rDNA

Jak už bylo zmíněno, v sinicovém genomu existuje více kopií rRNA genu. Přestože rozdíly mezi různými kopiemi genu jednoho genomu jsou pravděpodobně malé, je o tom jen nedostatečná dokumentace. Pro správnou analýzu je nutný vhodný alignment sekvencí

(je nutné srovnávat homologní nukleotidy, problémem jsou adice a delece, některé delece mohou být kompenzovány adicemi ve velmi vzdálených místech genomu). Dochází také k mnohonásobným a reversibilním mutacím (je využívána korekce v počítačových programech a používají se konzervované úseky, kde nejsou tyto mutace tak časté). Otázkou je také jestli byly gapy v sekvencích delší než jeden nukleotid vytvořeny jedinou adicí/deleci, nebo byla adice/delece každého nukleotidu samostatnou událostí. Měl by se také klást důraz na sekundární strukturu RNA (WILMOTTE ET AL. 1992) (více konzervované jsou nukleotidy v očku než ve stonku sekundární struktury, sekvenční změny stonku postihují většinou oba členy páru, měla by se tedy brát v potaz změna jen jednoho nukleotidu?). Variabilitu rRNA pravděpodobně omezuje do jisté míry funkce ribosomu. Zpracování fylogenetické analýzy znesnadňuje i velká rychlost, kterou probíhala evoluce od chvíle získání schopnosti fotosyntézy a její nerovnoměrnost (WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991).

Současný fylogenetický strom sinic je založen na částečných 16S rDNA sekvenčních analýzách kmenů dostupných v axenických kulturách (reprezentativní vzorek pouze zlomku přirozené diverzity sinic). U většiny není známá historie izolace a mnohdy jsou nesprávně určeny. To bylo již zmíněno např. v pracích KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989), RUDI ET AL. (1997), LITVAITIS (2002), WILMOTTE & GOLUBIĆ (1991).

K principiálním limitacím je třeba připočítat i ty technické: srovnání 16S rDNA sekvencí stejného kmene získaných od různých pracovníků se často vzájemně liší více, než různé kmene mezi sebou (BITTENCOURT-OLIVEIRA ET AL. 2001).

Je-li 16S rDNA téměř totožná u různých fenotypů, je nepoužitelná na subgenerické úrovni a je nutno najít více variabilní oblast genomu, která lépe objasní fylogenezi (např. ITS nebo RFLP (restriction fragment length polymorphism), také c- phycocyanin geny (cpcB a CPCA) a cpcBA-IGS (intergenic spacer) může poskytnout dostatečnou variabilitu a slouží k rozlišení genotypů uvnitř rodů (BITTENCOURT-OLIVEIRA ET AL. 2001).

1.1.5.5. ITS (Internal Transcribed Spacer)

Data z 16S rDNA sekvence nejsou dostatečná pro rozlišení druhů a proto nejsou vhodná ani pro studium nižších taxonomických úrovní (FOX ET AL. 1992, GARY ET AL. 1999). Výsledkem tohoto poznání byl nárůst využívání více variabilní 16S – 23S ITS (GÜRTLER & STANISICH 1996, BOYER ET AL. 2002, OTSUKA ET AL. 1999). Předpokládá se, že ITS region oddělující 16S a 23S sekvence rDNA operonu může být velmi užitečný pro rozlišení jemnějších stupňů systematiky. Konfigurace ITS odráží vyšší stupeň fylogenetického členění. Bylo zjištěno, že 3 spacerové bloky jsou vysoce konzervované, zatímco jiné jsou velmi variabilní. V některých regionech ITS se vyskytují geny pro tRNA (0,1 nebo 2) pro Ala, Glu, Ile (BOYER 2001).

Data z ITS sekvencí podporují i teorii vzniku plastidů endosymbiotickou teorií z jednoho společného předka (všechny plastidy kromě výjimky nalezené u dvou parazitických rostlin mají 16S – 23S ITS obsahující 2 tRNA sekvence (pro Ile a Ala) (BOYER 2001). Někde

dochází ke zmnožení A a T. Předpokládá se, že tento model ukazuje způsob rekombinace a expanze AT v mezigenových ISR (Internal Spacer Region). Tento proces reprezentuje základní mechanismus společné evoluce bakteriálních ISR (GÜRTLER 1999).

1.1.5.6. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Jedná se o další metodu využívající PCR a separaci gelovou elektroforézou. RAPD fragmenty DNA jsou amplifikovány užitím krátkých (cca 10 bp) náhodných syntetických primerů (stejný "forward" i "backward") amplifikující ze 3- 10 genomových míst najednou fragmenty o délce 0,5-5kb. Polymorfismus je detekován na gelu přítomností nebo nepřítomností proužků příslušné velikosti (WILLIAMS ET AL. 1990).

Metoda má výhody v nízkých požadavcích na množství DNA, nespecifičnosti primeru, nízké ceně, náhodné a početné distribuci RAPD míst v genomu. Nevýhodou je mimo jiné potřeba velmi čisté DNA, nízká reprodukovatelnost a fakt, že proužky na gelu neodpovídají lokusům alel a že fragmenty stejné velikosti nemusí být homologní. Metoda je využitelná pro identifikaci taxonů, posouzení příbuznosti a analyzování smíchaných vzorků genomu (HADRYŠ ET AL. 1992).

Polymorfismu PCR amplifikovaných produktů různých částí genomu (RFLP) se využívá i v dalších studiích (LU ET AL. 1997)

1.1.6. Polyfázický přístup k taxonomii sinic

Molekulární metody otevřely cestu k zhodnocení genetické informace, přesto se brzo ukázalo, že žádná z nich není univerzálním řešením moderní taxonomie a každý metodický pokrok přinesl i nová zkrslení reality a artefakty. Je tedy nutno je doplňovat o tradiční morfologické charakteristiky (WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991).

V poslední době jsou zpracovávány hlavně studie na základě polyfázického přístupu zahrnující jak tradiční metody, tak studium biochemie, ultrastruktury, ekologie a moderní molekulární metody (např. ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985, 1988, 1990, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986, 1989, FLECHTNER ET AL. 2002, GARY ET AL. 1999, MARGHERI ET AL. 2003, RAEID ET AL. 2002, LOKMER 2004, CASAMATTA ET AL. 2005, RAJANIEMI ET AL. 2005). Předpokládá se, že všechny výsledky kombinovaného přístupu podepřou taxonomii na základě morfologických a lehce testovatelných kritériích.

1.2. Taxonomie sinic

Po mnoho let byla taxonomie sinic založena na morfologické variabilitě (GEITLER 1932) čímž bylo pojmenováno přibližně 1500 druhů v 150 rodech a stále se nacházejí a určují nové (FLECHTNER ET AL. 2002).

Při rozpracování systému podle (GEITLER 1932) byla Cyanobacteria rozdělena na

jednobuněčné kokální formy (Chroococcales), na jednoduché vláknité formy (Oscillatoriales), vláknité formy schopné tvořit heterocyty a akinety (Nostocales) a na vláknité formy s heterocyty a akinetami, které jsou schopné se pravě větvit (Stigonematales) (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985, 1988, 1990, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986, 1989).

Jednou z dalších klasifikací byla Drouetova (DROUET 1981): její autor sloučil všechny sinice na základě ekofyziologických kriterií pouze do devíti rodů. Základní myšlenkou byl malý počet genotypů, které se projevují různými fenotypy v závislosti na různých podmínkách prostředí (to bylo ostře kritizováno ze strany klasických taxonomů i genetických studií).

Bakteriologický přístup (CASTENHOLZ 2001) uplatňoval hlavně metody molekulární biologie. Mohl tedy pracovat pouze s laboratorními kulturami sinic a tento přístup tedy nepostihoval celou diverzitu. Rozeznával pouze 61 rodů sinic.

RIPPKA ET AL. (1979) publikovali taxonomii sinic na základě fyziologických, morfologických a genetických kriterií. Cyanobacteria byla rozdělena do pěti sekcí hrubě odpovídajících původnímu dělení (např. Chroococcales odpovídá sekci I atp. :

- Sekce I: jednobuněčné sinice množící se binárním dělením nebo pučením
- sekce II: jednobuněčné sinice množící se dělením na více dceřiných buněk
- sekce III: vláknité sinice tvořící heterocyty s jednou rovinou dělení
- sekce IV: vláknité sinice tvořící heterocyty s jednou rovinou dělení
- sekce V: vláknité sinice tvořící heterocyty s více než jednou rovinou dělení.

Jako šestá sekce bývají uznávány Prochlorales (CASTENHOLZ & WATERBURY 1989). Prochlorales jsou prokaryotní oxygenní fototrofní organismy, které mají (stejně jako vyšší rostliny, řasy a euglenoidi) chloroplasty obsahující chlorofyl *b* místo fykobilinoproteinů. Díky přítomnosti chlorofylu *b* byly potenciálními kandidáty na endosymbionty, z kterých vznikly zelené chloroplasty (LITVAITIS 2002). Výsledky srovnání sekvencí 16S rDNA prokázaly, že Prochlorophyta jsou polyfyletická skupina uvnitř sinic a naznačují, že žádný z dosud známých druhů Prochlorales není přímo příbuzný k chloroplastům.

Předpokládá se, že fenotyp fykobilisom-/chlorofyl *b*+ vznikl *de novo* minimálně třikrát (1x jako předchůdce chloroplastů, 1-2x jako předchůdce organismů *Prochloron* a *Prochlorothrix*)(URBACH ET AL. 1992). Parafyletické rozdělení říše Prochlorophyta může tedy odrážet konvergentní evoluci fotosyntetického systému užívajícího chlorofyl *a* a *b*. Podle 16S rDNA analýz patří Prochlorales mezi Cyanobacteria, zatímco nukleotidové sekvence *psbA* genu poukazují na příbuznost k zeleným chloroplastům (MORDEN & GOLDEN 1989).

Molekulární studie nejen řádu Prochlorales potvrzují, že dosavadní systém sinic je umělý. Některé skupiny klasických systémů se však s molekulárními studii shodují: např. monofylie sinic tvořících heterocyty je podporována i analýzou genu pro nitrogenázu (*nifH*) (ZEHR ET AL. 1997), RNA genu pro RNázu P (*mpB*) (VIOQUE 1997), fotosystém II D1 protein genu (*psbA*) (MORDEN & GOLDEN 1989) a genu pro DNA dependentní RNA

polymerázu (rpoC) (PALENIK & SWIFT 1996). Tyto geny silně podporují evoluci vzniku heterocytů jako jednu událost po oddělení této větve.

Dále se pro rekonstrukci evoluce používá např. gen pro velkou podjednotku ribuloso-1,5-bisphosphate karboxylázu/oxygenázu (rbcL) (DELWICHE & PALMER 1996), gen pro beta podjednotku ATPázy (atpB) (DOUGLAS & MURPHY 1994), isiA (LA ROCHE ET AL. 1996), elongační faktor Tu (tufA) (DELWICHE ET AL. 1995) a σ^{70} typ sigma faktorů (GRUBER & BRYANT 1992).

WILMOTTE & GOLUBIĆ (1991) sestavili podle 16S rDNA 10 monofyletických skupin (ne vždy se to však shodovalo s jinými fylogenetickými analýzami).

Fylogenetický strom podle GIOVANNONI ET AL. (1988) rozděluje 10 hlavních vývojových linií (z nich 2 obsahují pouze kokální kmeny, 6 větví je pouze vláknitých a 2 obsahují jak kokální, tak vláknité formy sinic).

Hranice mezi jednobuněčnou a vláknitou organizací není vždy ostrá. Např. *Synechococcus* sp. PCC6301 je schopen tvořit krátká vlákna do délky 9 buněk, stejně jako některé jiné sinice po působení mutagenů. Vláknitý kmen *Pseudanabaena* se naopak může stát jednobuněčným (WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991). Jestli se dceřinné buňky po dělení separují nebo ne, záleží patrně jen na malé genetické změně, ev. dokonce na změně ekologických podmínek.

Práce HONDA ET AL. (1999) ustanovila 7 hlavních evolučních linií sinic (zahrnuta i Prochlorophyta), které jsou stabilní při všech použitých metodách (maximum-likelihood, neighbor-joining: homogenní nebo heterogenní model) a shodují se i s fylogenetickými vztahy založenými na jiných genech (např. psbA, rbcL, rnpB, rpoC, tufA). I když se některé fenotypové a genotypové vlastnosti vyskytují paralelně v několika liniích, uvnitř jedné linie si nikdy neodporují. Rod *Synechococcus* byl rozdělen do 3 linií, což poukazuje na samostatnou evoluci různými směry a potřebu reklasifikace do samostatných taxonomických jednotek. Morfologická kritéria se u tohoto rodu ukázala nedostatečná a parafyletičnost rodu byla dokázána v mnoha molekulárně fylogenetických publikacích (TURNER 1997, WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991, ERNST ET AL. 2002, PORTA ET AL. 2000, HONDA ET AL. 1999). Navíc tvoří *Synechococcus* spolu s vláknitými sinicemi monofyletické skupiny ve dvou liniích podložené vysokou statistickou konfidenční hodnotou (80 až 100%) což pravděpodobně odráží konvergentní vývoj mnohobuněčné organizace.

Další významnou fylogenetickou práci publikovali TURNER ET AL. (1997). Použili různé modely rekonstrukce evoluce a na základě jejich analýzy bylo podpořeno hluboké větvení kmenů *Pseudanabaena* a *Gloeobacter violaceus* a monofylie heterocytózních sinic. Rody *Synechococcus* a *Leptolyngbya* byly shledány polyfyletické a několik dalších kmenů parafyletické.

1.3. Cíle práce

Z předcházející rešerše vyplývá, že kokální typy sinic jsou často mnohem více příbuzné k vláknitým kmenům než mezi sebou vzájemně. Typ thylakoidů a jejich umístění v buňce je více či méně ve shodě s klastry vzniklými sekvenováním (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003). Některé z těchto klastrů obsahují kokální i vláknité typy. Heterocytózní sinice (Nostocales, Stigonematales) mají velmi podobnou ultrastrukturu a tvoří i monofyletickou skupinu. Oproti tomu ostatní vláknité sinice (Oscillatoriales) jsou více diversifikované, obzvláště v postavení thylakoidů. Velký rozdíl v struktuře buňky je u kokálních typů (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998, KOMÁREK 1999) klasifikovaných tradičně do jednoho patrně umělého řádu Chroococcales.

Předmětem zájmu této práce jsou kokální sinice řádu Chroococcales:

- shromáždění kmenů sinic řádu Chroococcales se známou sekvencí 16S rDNA dostupných ve sbírkách
- zjištění jejich ultrastruktury (postavení thylakoidů) pomocí transmisní elektronové mikroskopie
- sestavení fylogenetického stromu ze sekvencí 16S rDNA získaných v GenBank of NCBI
- porovnání dat z takto vzniklého stromu s informacemi získanými elektronovou mikroskopií
- zhodnocení teorie, že v rámci stejné skupiny je shodné postavení thylakoidů, nezávisle na vláknité či kokální struktuře
- kultivace a morfologické zhodnocení pomocí optické mikroskopie

2. Materiál a metodika

2.1. Kmeny sinic

Kmeny byly zakoupeny ze sbírek MBIC - Japonsko (Marine Biotechnology Institute Culture collection) a PCC – Francie (Pasteur Culture Collection). Seznam kmenů je v tab.1.

označení kmene	název sinice	kultivační medium
MBIC 10216	<i>Cyanobacterium</i> sp.	BG-11+ ASN-III (10%,obj.)
PCC 6307	<i>Cyanobium gracile</i>	BG-11
PCC 6308	<i>Synechocystis</i> sp.	BG-11
PCC 6702	<i>Synechocystis</i> sp.	BG-11
PCC 6714	<i>Synechocystis</i> sp.	BG-11
PCC 6803	<i>Synechocystis</i> sp.	BG-11
PCC 6805	<i>Synechocystis</i> sp.	BG-11
PCC 7202	<i>Cyanobacterium stanieri</i>	BG-11+ ASN-III (10%,v/v)
PCC 73106	<i>Gloeocapsa</i> sp.	BG-11
PCC 7418	<i>Cyanothece</i> sp.	ASN-III + Turks Island Salts (4x koncentrované) (1:1,obj.)
PCC 7424	<i>Cyanothece</i> sp.	BG-11
PCC 7430	<i>Chamaesiphon subglobosus</i>	BG-11 ₀ + NaNO ₃ (2 mM)
PCC 7941	<i>Microcystis aeruginosa</i>	BG-11 ₀ + NaNO ₃ (2 mM) + NaHCO ₃ (10 mM)
PCC 8105	<i>Gloeobacter violaceus</i>	BG-11
PCC 8305	<i>Dactylococcopsis</i> sp.	ASN-III + Turks Island Salts (4x koncentrované) (1:1,obj.)
PCC 8801	<i>Cyanothece</i> sp.	BG-11

Tab.1. Zakoupené kmeny a media pro jejich kultivaci.

2.2. Media

Pro pěstování sinic bylo vytvořeno mnoho různých medií. Já jsem používala media doporučená Pasteur Culture Collection (PCC), ze které pochází i většina zkoumaných kmenů. PCC používá pouze 3 standardní media s drobnými modifikacemi (RIPPKA ET AL. 1979).

Nejběžnější medium pro kultivaci sinic je BG-11, užívá se pro kmeny sladkovodní, půdní nebo termální a pro ty, které pocházejí z mořského prostředí, ale nevykazují požadavky na ionty charakteristické pro mořské druhy (WATERBURY & STANIER 1981). Modifikace BG-11₀ (bez nitrátů) se používá pro dusík fixující kmeny po přidání roztoku sterilizovaného NaHCO₃ (5 mM finální koncentrace).

Mořské kmeny (s požadavky na Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+}) jsou pěstovány hlavně na mediu ASN-III, nebo méně často na mediu MN, v kterém je základem mořská voda doplněná mediem BG-11 o poloviční koncentraci. Všechny kmeny rostoucí na ASN-III mohou být pěstovány také na MN. Pokud je doporučeno medium MN pak na mediu ASN-III kmeny rostou hůře.

Složení Turks Island Salts je: NaCl (480 mM), MgSO_4 28 mM), MgCl_2 (27 mM), KCl (9 mM), CaCl_2 (10 mM) (Merck Index Ref. 99542).

Použitá media jsou v tab.1.

2.3. Podmínky kultivace

Kmeny se sbírek PCC a MBIC byly kultivovány ve zkumavkách v kapalných mediích. Kultivace je v režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma při 22°C.

2.4. Optická mikroskopie

Fotografie byly snímány na mikroskopu Olympus BX51 fotoaparátem Olympus Camedia C-5050 do programu QuickPHOTO MICRO 2.0. Úprava fotografií (kontrast, jas, ostrost) byla provedena pomocí Adobe Photoshop 5.0. Snímky byly použity pro ověření taxonomického zařazení získaných kmenů.

2.5. Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky byly fixovány 2,5% glutaraldehydem v 0,1 M fosfátovém pufru. Postfixace byla provedena 2% OsO_4 . Fixovaný materiál prošel vzestupnou acetonovou odvodňovací řadou (30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100%). Poté byly vzorky postupně prosycovány nízkoviskózní pryskyřicí Spurr (SPURR 1969). Ultratenké řezy byly připraveny na mikrotomu Leica ultracut UCT diamantovým nožem a byly kontrastovány uranyl acetátem a citrátem olova. Takto připravené vzorky byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1010 při urychlovacím napětí 80kV a snímány CCD TV kamerou Lhesa 72WA, za použití softwarového programu VideoTIP of Tescan.

Fotografie byly upraveny pomocí Adobe Photoshop 5.0.

2.6. Fylogenetická analýza

Pro fylogenetickou analýzu bylo použito celkem 122 sekvencí 16S rDNA získané z GenBank of NCBI. Z toho 105 sekvencí příslušelo kokálním sinicím. K těmto sekvencím bylo přiřazeno 16 sekvencí vláknitých sinic z taxonů u nichž je známá ultrastruktura, nebo bylo zajímavé jejich postavení ve vztahu ke kokálním sinicím. Jako outgroup byl použit *Bacillus subtilis*. Přístupová čísla k sekvencím v GenBank of NCBI jsou uvedeny v tab.2.

Alignment byl zpracován programem BioEdit v7.0.4. pomocí ClustalW Multiple alignment. Výsledný alignment byl dopracován a zhodnocen – pozice s gapy, nedeterminovatelné, pochybné a nejednoznačné sekvence byly před analýzou odstraněny.

Fylogenetické stromy byly zpracovány metodou Maximum Likelihood (FELSENSTEIN 1981) v programu PhymI_v2.4.1. Byl použit GTR model pro substituci nukleotidů (např. LANAVE ET AL. 1984) a provedena neparametrická bootstrapová analýza (100 opakování), bylo použito diskretní gamma rozdělení se čtyřmi kategoriemi.

První strom byl vytvořen pro všechny uvedené sekvence (obr.3). Pro získání vyšších statistických hodnot na bazálnějších úrovních fylogenetického stromu byla analýza zopakována s redukováným počtem kmenů (obr.4). Z dobře podpořených skupin bylo ponecháno pouze několik zástupců na bázi skupin a byly vyřazeny kratší, těžko reprodukovatelné, sekvence. Tím se zredukoval počet analyzovaných kmenů na 40 + outgroup. Z těchto sekvencí byl vytvořen nový alignment a sestaven nový fylogenetický strom metodou Maximum likelihood.

Třetí fylogenetický strom byl vytvořen ze sekvencí 16S rDNA pro kmeny u kterých je známá ultrastruktura a byl doplněn o schémata postavení thylakoidů těchto kmenů (obr.6).

Accession number	název	kmen	Accession number	název	kmen
	kokální sinice		AB067575	Gloeocapsa sp.	KO38CU6
AF497567	Aphanocapsa feldmani		AB067578	Gloeocapsa sp.	KO20B5
AB116658	Aphanothece sacrum		AB067579	Gloeocapsa sp.	KO30D1
AJ000721	Aphanothece sp.	ATCC 43922	AB067576	Gloeothece sp.	SK40
AB058249	Cyanobacterium sp.	MBIC10216	AB067577	Gloeothece sp.	KO11DG
AF132782	Cyanobacterium stanieri	PCC7202	AB067580	Gloeothece sp.	KO68DGA
AY172837	Cyanobium sp.		AY422695	Gloeothece sp.	
AY183115	Cyanobium sp.	LB03	AJ000724	Halothece sp.	MPI 96P605
AY183114	Cyanobium sp.	Y0011	AY170472	Chamaesiphon subglobosus	PCC 7430
Z82775	Cyanothece aeruginosa	NIVA/CYA 258/2	AJ344558	Chroococcidiopsis cubana	SAG 39.79
AF132932	Cyanothece sp.	PCC 7424	AJ344553	Chroococcidiopsis sp.	SAG 2024
AF296872	Cyanothece sp.	PCC 7418	AJ344554	Chroococcidiopsis sp.	SAG 2025
AF132771	Cyanothece sp.	ATCC 51142	AJ344552	Chroococcidiopsis sp.	SAG 2023
AB067581	Cyanothece sp.	SKTU126	AJ344555	Chroococcidiopsis sp.	SAG 2026
AF296873	Cyanothece sp.	PCC 8801	AB074506	Chroococcidiopsis sp.	PCC7431
AJ000711	Dactylococcopsis sp.	PCC 8305	AY422693	Chroococcidiopsis sp.	Bad Sachsa
AB058199	Dermocarpa sp.	MBIC10001	AB039004	Chroococcidiopsis sp.	PCC6712
AB058202	Dermocarpa sp.	MBIC10004	AJ344556	Chroococcidiopsis sp.	CCMP1489
AB058218	Dermocarpa sp.	MBIC10056	AJ621832	Chroococcus submarinus	kopara-BM
AB058284	Dermocarpa sp.	MBIC10765	AJ621836	Johannesbaptistia pellucida	kopara-GC
AB058285	Dermocarpa sp.	MBIC10766	X94705	Merismopedia glauca	B1448-1
AB058287	Dermocarpa sp.	MBIC10768	AJ133171	Microcystis aeruginosa	PCC 7941
Z82777	Dermocarpa violacea	PCC7301	D89036	Microcystis holsatica	
AJ344559	Dermocarpella incrassata	SAG 29.84	U40336	Microcystis holsatica	NIES43
AJ000709	Eualothece sp.	MPI 95AH10	AB035550	Microcystis ichtyoblabe	
AJ000710	Eualothece sp.	MPI 95AH13	AB012326	Microcystis sp.	4A3
AJ000712	Eualothece sp.	MPI 96N303	AB012329	Microcystis sp.	T1-4
AJ000713	Eualothece sp.	MPI 96N304	AB012330	Microcystis sp.	T17-1
AF132791	Gloeobacter	PCC8105	AB012327	Microcystis sp.	4B3
NC_005125	Gloeobacter violaceus	PCC7421	U66194	Microcystis sp.	KND9506
AB039000	Gloeocapsa	PCC73106	AJ133174	Microcystis wesenbergii	NIES 104

Tab.2. Přístupové kódy v GenBank of NCBI pro 16S rDNA všech použitých kmenů pro fylogenetickou analýzu. Barevně jsou odlišeny zakoupené kmeny u kterých byla zjišťována ultrastruktura.

Accession number	název	kmen	Accession number	název	kmen
AJ344562	Myxosarcina sp.	PCC 7325	AF448080	Synechococcus sp.	PCC 7502
AJ344561	Myxosarcina sp.	PCC7312	AF448081	Synechococcus sp.	PCC 6312
AJ344564	Pleurocapsa minor	SAG 4.99	AF132930	Synechococcus sp.	PCC 7942
AB039007	Pleurocapsa sp.	PCC7327	AB039001	Synechocystis	PCC6308
AB074511	Pleurocapsa sp.	PCC 7314	AB041936	Synechocystis	PCC6702
AB039006	Pleurocapsa sp.	PCC7319	AB041937	Synechocystis	PCC6714
X78681	Pleurocapsa sp.		AB041938	Synechocystis	PCC6805
AJ621833	Rhabdoderma cf. rubrum	kopara-CH	AY224195	Synechocystis sp.	PCC 6803
AB039008	Stanieria cyanosphaera		AB011380	Synechocystis trididemni	
AB039009	Stanieria sp.	PCC7301	AY500108	Uncultured Myxosarcina sp.	
AF001477	Synechococcus	PCC6307	AF132783	Xenococcus sp.	PCC7305
Z82780	Synechococcus leopoliensis	PCC 6301	AB074510	Xenococcus sp.	PCC 7307
AF317076	Synechococcus rubescens		vláknité sinice		
AB015058	Synechococcus sp.	PCC7001	AF317629	Anabaena sp.	PCC 7108
AB015059	Synechococcus sp.	PCC7003	AJ293128	Aphanizomenon cf. flos-aquae	PMC9501
AB015060	Synechococcus sp.	PCC7117	X84810	Leptolyngbya boryanum	
AB015061	Synechococcus sp.	PCC73109	AY239599	Leptolyngbya crispata	SEV1-1-C1
AB015062	Synechococcus sp.	PCC7335	AY239594	Leptolyngbya sp.	SEV5-1-C5
AF216942	Synechococcus sp.	PCC6716	AY239591	Leptolyngbya sp.	SEV5-5-C6
AF216943	Synechococcus sp.	PCC6717	AB039011	Leptolyngbya sp.	PCC7375
AF216944	Synechococcus sp.	PCC6904	AY577536	Nostoc commune	EV1-KK1
AF216945	Synechococcus sp.	PCC7009	AB003168	Oscillatoria neglecta	
AF216946	Synechococcus sp.	PCC7902	AB003164	Oscillatoria rosea	
AF216947	Synechococcus sp.	PCC7918	AB003167	Phormidium ambiguum	
AF216948	Synechococcus sp.	PCC7920	AB058200	Phormidium sp.	MBIC10002
AF216949	Synechococcus sp.	PCC7943	AB003169	Phormidium sp.	
AF216950	Synechococcus sp.	PCC9005	AB039017	Pseudanabaena sp.	PCC6903
AF448071	Synechococcus sp.	PCC 8916	AB039019	Pseudanabaena sp.	PCC7403
AF448072	Synechococcus sp.	PCC 8966	X75045	Spirulina sp.	PCC6313
AF448076	Synechococcus sp.	PCC 8807	outgroup		
AF448077	Synechococcus sp.	PCC 8806	AF233579	Bacillus subtilis	
AF448078	Synechococcus sp.	PCC 7336			

Tab.2. - pokračování. Přístupové kódy v GenBank of NCBI pro 16S rDNA všech použitých kmenů pro fylogenetickou analýzu. Barevně jsou odlišeny zakoupené kmeny u kterých byla zjišťována ultrastruktura.

3. Výsledky

3.1. Optická mikroskopie

Jak již bylo zmíněno, samotná morfologie sinic je pro identifikaci nedostatečná. Proto byla optická mikroskopie použita pouze pro zjištění případných nesrovnalostí. U některých kmenů byla zjištěna ztráta charakteristických determinačních znaků, zejména tvaru kolonie (rod *Microcystis* sp., *Chamaesiphon subglobosus*). Výrazné rozdíly od druhu ke kterému byl kmen přiřazen byly však zaznamenány pouze u *Cyanobacterium* sp. MBIC10216. Tyto rozdíly dokumentuje i obr.5 v kapitole 4.1.8. (fotografie kmene získaná z internetových stránek MBIC a fotografie zakoupeného kmene) a byly potvrzeny i transmisní elektronovou mikroskopií.

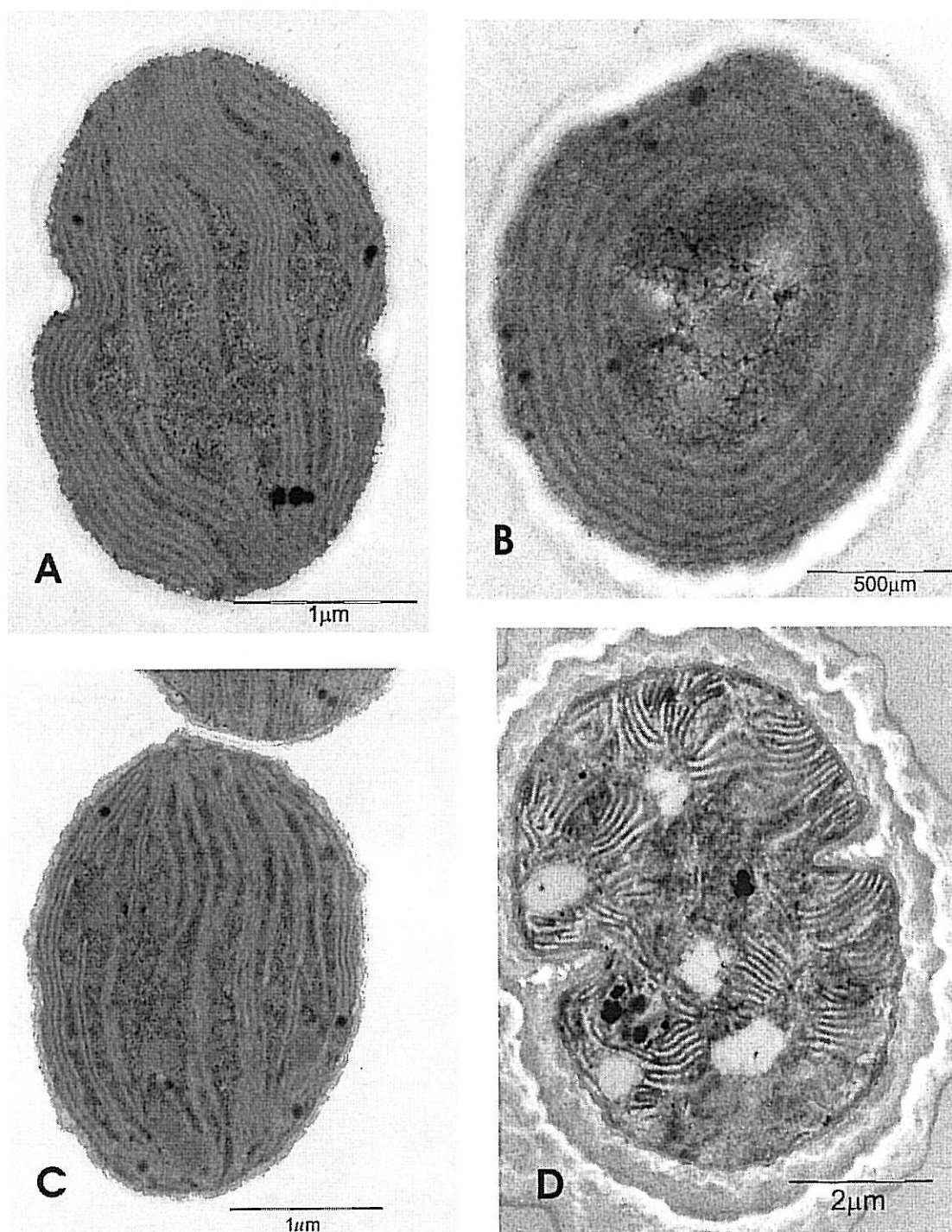
Ostatní fotografie kmenů kokálních sinic z optického mikroskopu jsou přiloženy pouze dokumentačně na CD.

3.2. Transmisní elektronová mikroskopie

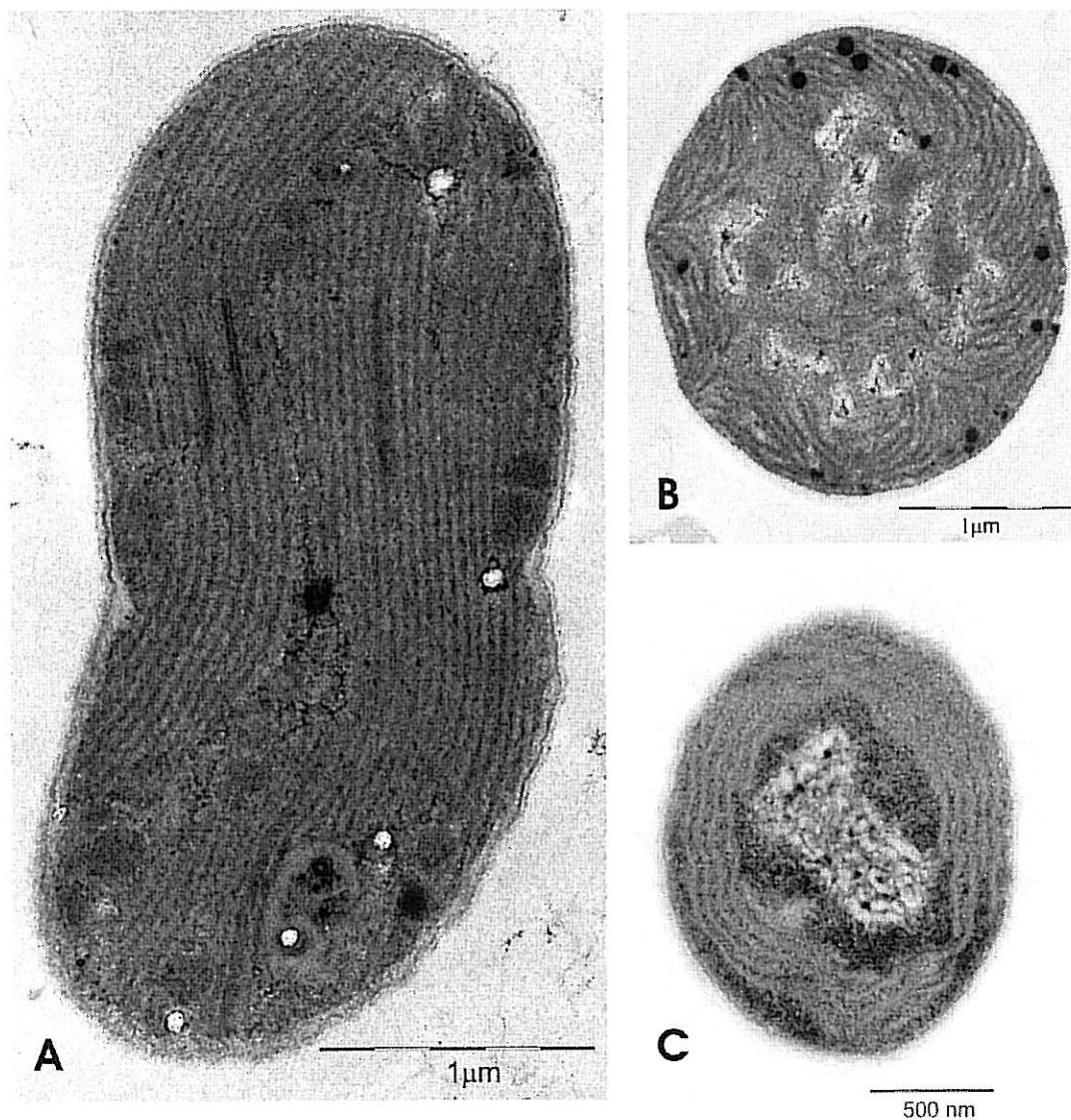
Postavení thylakoidů zkoumaných kmenů:

- *Cyanobacterium* sp. MBIC10216 – parietální thylakoidy
- *Synechococcus* sp. PCC6307 – parietální thylakoidy
- *Synechocystis* sp. PCC6308 – paralelní thylakoidy v celém objemu buňky
- *Synechocystis* sp. PCC6702 – parietální thylakoidy
- *Synechocystis* sp. PCC6714 – parietální thylakoidy
- *Synechocystis* sp. PCC6803 – parietální thylakoidy
- *Synechocystis* sp. PCC6805 – parietální thylakoidy
- *Cyanobacterium stanieri* PCC7202 – paralelní thylakoidy
- *Cyanothece* sp. PCC7418 – parietálně orientované zvlněné svazky thylakoidů
- *Microcystis aeruginosa* PCC7941 – krátké, rovnoběžné thylakoidy, ve svazečcích kolmých k plazmatické membráně
- *Dactylococcopsis* sp. PCC8305 – parietálně orientované zvlněné svazky thylakoidů
- *Cyanothece* sp. PCC8801 – tvoří menší počet paralelních svazků thylakoidů, někdy mírně zvlněné
- *Gloeobacter violaceus* PCC8105 – nemá thylakoidy
- *Gloeocapsa* sp. PCC73106 – krátké zvlněné thylakoidy ve svazečcích
- *Chamaesiphon subglobosus* PCC7430 – postavení thylakoidů tohoto kmene je závislé na způsobu jeho rozmnožování – pučení, v místech oddělení nových buněk končí thylakoidy u povrchových membrán a tím je narušen původně možná parietální ráz, u některých buněk je přechod až k radiálním thylakoidům

Schéματα postavení thylakoidů jsou znázorněny v rámci fylogenetického stromu na obr. 3 a obr.6. Fotografie zhotovené pomocí transmisní elektronové mikroskopie jsou na obr.1 a obr.2 a ostatní jsou přiloženy na CD.



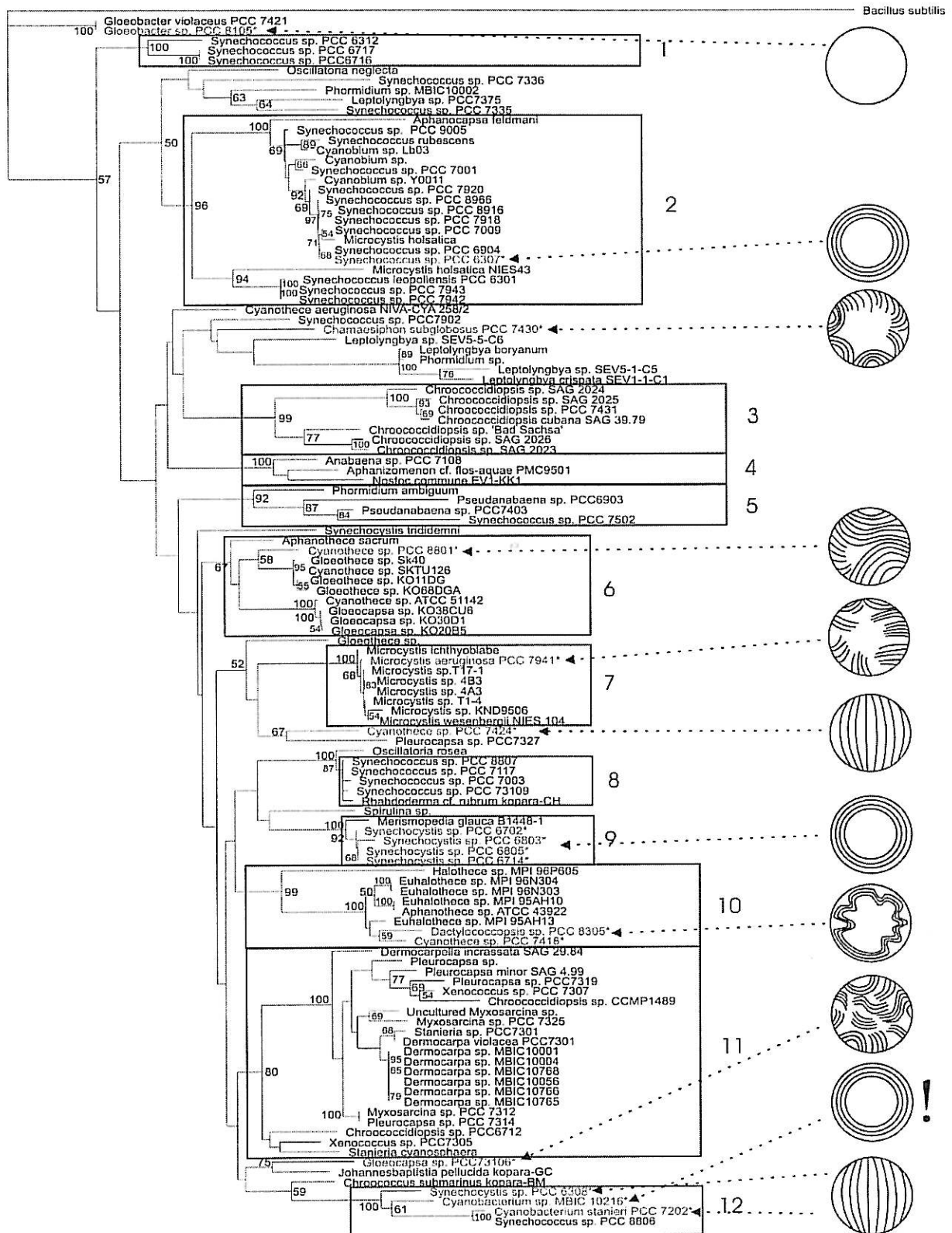
Obr.1. Fotografie ultratenkých řezů sinicemi zhotovené pomocí TEM. A. *Cyanothece* sp. PCC7424, B. *Synechocystis* sp. PCC 6702, C. *Synechocystis* sp. PCC6308, D. *Gloeocapsa* sp. PCC73106.



Obr.2. Fotografie ultratenkých řezů sinicemi zhotovené pomocí TEM. A. *Cyanobacterium stanieri* PCC7202, B. *Chamaesiphon subglobosus* PCC7430, C. *Cyanobacterium* sp. MBIC10216.

3.3. Fylogenetická analýza (Maximum Likelihood)

Fylogenetický strom na obr.3 je výsledkem analýzy sekvencí 16S rDNA kokálních a několika vláknitých sinic. Byl sestaven metodou Maximum Likelihood.



0.1

Obr.3. Fylogenetický strom sestavený metodou Maximum Likelihood. Znázorněny jsou pouze bootstrapové podpory nad 50. Hvězdičky označují kmeny zkoumané v této práci u kterých je schematicky znázorněné postavení thylakoidů. Rámečky znázorňují skupiny popisované v textu pod uvedenými čísly. Vykřičníkem je označeno schéma postavení thylakoidů kmene MBIC 10216, které podle této práce nepřísluší k uvedené sekvenci 16S rDNA.

3.3.1. Outgroup a kmeny brzo se odvětvující

(*Bacillus subtilis*, *Gloeobacter* sp. PCC7421, *Gloeobacter violaceus* PCC8105)

Jako outgroup byl pro analýzy použit *Bacillus subtilis* a zakořenění stromu ukázalo brzké odštěpení kmenů rodu *Gloeobacter*. Tento rod se vyznačuje řadou unikátních znaků (např. nepřítomnost thylakoidů a fykobilisomů). Bazální postavení rodu *Gloeobacter* v rámci sinic je uznáno v současných fylogenetických pracech a často je tento rod použit jako „outgroup“ při sestavování fylogenetických vztahů pro Cyanobacteria (např. TURNER 1997, HONDA ET AL. 1999).

3.3.2. Skupina 1 (*Synechococcus*)

(*Synechococcus* sp. PCC6312, *Synechococcus* sp. PCC6717, *Synechococcus* sp. PCC6716)

Do této skupiny spadají tři zástupci rodu *Synechococcus*. Ve fylogenetickém schématu na obr.3 se zástupci rodu *Synechococcus* rozčlenili minimálně na 3 velké větve (skupina 1, 2, 8) a několik kmenů se vyskytuje i na dalších nezávislých místech fylogenetického stromu, což ukazuje na polyfyletičnost tohoto rodu.

Polyfylie rodu *Synechococcus* byla publikována už v mnoha pracích (např. TURNER 1997, WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991, ERNST ET AL. 2002, PORTA ET AL. 2000, HONDA ET AL. 1999). U tohoto rodu se ukázaly klasické metody určování jako nedostatečné a s pomocí molekulární biologie byl rozčleněn na rody *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Cyanobacterium* a *Cyanothece* (RIPPKA & COHEN-BAZIRE 1983).

Skupiny vzniklé analýzou 16S rDNA podporují i údaje o rozměrech buněk získané o kmenech z PCC. Jednoznačně se vyčlenila skupina 2 (rozměry buňky 0,8-1,2 µm), zatímco skupina 1 má rozměry buňky 1,2-1,5 µm a skupina 8 má rozměry buňky 1,2-2 µm.

Vnitřní vztahy skupiny 1 jsou podpořeny 100 % bootstrapem, oproti tomu postavení celé skupiny není příliš statisticky podpořeno a např. na obr.4 se na této bazální úrovni větví dříve *Synechococcus* sp. PCC7336.

O postavení thylakoidů v této skupině jsem nenašla žádné záznamy.

3.3.3. Skupina 2 (*Synechococcus*, *Cyanobium*)

(*Aphanocapsa feldmani*, *Cyanobium* sp., *Cyanobium* sp. Y0011, *Cyanobium* sp. LB03, *Synechococcus* sp. PCC9005, *Synechococcus* sp. PCC7001, *Synechococcus* sp. PCC7920, *Synechococcus* sp. PCC8966, *Synechococcus* sp. PCC8916, *Synechococcus* sp. PCC7918, *Synechococcus* sp. PCC7009, *Synechococcus* sp. PCC6904, *Synechococcus* sp. PCC6307, *Synechococcus* sp. PCC7943, *Synechococcus* sp. PCC7942, *Microcystis holsatica* NIES43, *Synechococcus rubescens*, *Synechococcus leopoliensis* PCC6301,)

Tato skupina je velmi koherentní. Obsahuje kmen *Aphanocapsa feldmani* a řadu kmenů rodu *Synechococcus* a *Cyanobium*.

Skupina 2 je rozdělena na dvě větve, které jsou podpořené 96% bootstrapem a navíc je lze zdůvodnit i rozměry buněk (větve obsahující kmeny PCC6301, PCC7943 a PCC7942 má rozměry 1-1,2 μm , zatímco druhá větev má rozměry pouze 0,8-1 μm).

Z mé práce je známé parietální postavení thylakoidů u kmene PCC6307 (fotografie viz CD, schéma na obr.3 a obr.6). V literatuře jsem našla snímky kmene *Synechococcus* sp. PCC7942 (NITTA ET AL. 2005) a *Synechococcus leopoliensis* PCC6301 (BAULINA ET AL. 2004). Oba tyto kmeny mají také parietální postavení thylakoidů.

3.3.4. Skupina 3 (*Chroococcidiopsis*)

(*Chroococcidiopsis* sp. SAG2024, *Chroococcidiopsis* sp. SAG 2025, *Chroococcidiopsis* sp. PCC7431, *Chroococcidiopsis cubana* SAG39.79, *Chroococcidiopsis* sp. „Bad Sachsa“, *Chroococcidiopsis* sp. SAG2026, *Chroococcidiopsis* sp. SAG 2023)

Rod *Chroococcidiopsis* je tradičně řazen do řádu Pleurocapsales, který byl dlouho uznávaný jako monofyletický (např. GIOVANNONI ET AL. 1988, WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991). V těchto studiích však bylo použito jen několik málo kmenů a hlavním důvodem pro monofyletičnost byl předpoklad jediného vzniku tvorby baeocytů. Polyfylie byla uznána v roce 2001 (ISHIDA ET AL. 2001). Pleurocapsales se rozpadají minimálně na tři linie. První z nich, podpořenou vysokým bootstrapem, jsou zástupci rodu *Chroococcidiopsis*, který je uváděn jako sesterská skupina k sinicím tvořící heterocyty (FEWER ET AL. 2002).

Postavení thylakoidů zástupců skupiny 3 je více podobné thylakoidům heterocytózních sinic, než dalším kokálním sinicím, to je podpořeno i jejich blízkým příbuzenským vztahem (FEWER ET AL. 2002). Rod *Chroococcidiopsis* má thylakoidy v krátkých svazečcích s náznakem radiálního směru (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003).

3.3.5. Skupina 4 (*Nostocales*)

(*Anabaena* sp. PCC7108, *Aphanizomenon* cf. *flos-aquae* PMC9501, *Nostoc commune* EV1-KK1)

Monofyletičnost skupiny sinic vytvářejících heterocyty (Stigonematales a Nostocales) je podpořena všemi pracemi publikovanými na toto téma a skupina je uznána za přirozenou i z pohledu molekulární biologie. Proto byly pro analýzu použity pouze tři sekvence zástupců Nostocales. Postavení thylakoidů heterocytózních sinic je víceméně u všech shodné: thylakoidy jsou vlnité, většinou koncentrované v periferních oblastech, jejich hustota a distribuce závisí (stejně jako u všech sinic) na kvalitě a množství dopadajícího světla (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003).

Jako nejbližší rod k heterocytózním sinicím je řazen rod *Chroococcidiopsis* tvořící baeocyty (FEWER ET AL. 2002), tato domněnka je podpořena i podobným uspořádáním thylakoidů (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003).

3.3.6. Skupina 5 (Pseudanabaena)

(*Pseudanabaena* sp. PCC7403, *Pseudanabaena* sp. PCC6903, *Synechococcus* sp. PCC7502, *Phormidium ambiguum*)

Známé je parietální postavení thylakoidů rodu *Pseudanabaena* (Komárek & Kaštovský 2003), u ostatních kmenů této skupiny předpokládám stejné postavení thylakoidů. Podle ISHIDA ET AL.(2001) tvoří rod *Pseudanabaena* kompaktní klastr.

3.3.7. Skupina 6 (Gloeothece, Cyanothece, Gloeocapsa)

(*Aphanothece sacrum*, *Cyanothece* sp. PCC8801, *Cyanothece* sp. SKTU126, *Cyanothece* sp. ATCC51142, *Gloeothece* sp. SK40, *Gloeothece* sp. KO11DG, *Gloeothece* sp. KO68DGA, *Gloeocapsa* sp. KO38CU6, *Gloeocapsa* sp. KO30D1, *Gloeocapsa* sp. KO20B5)

Tato skupina zahrnuje 4 podobné sladkovodní rody (*Aphanothece*, *Cyanothece*, *Gloeothece*, *Gloeocapsa*). Vztahy uvnitř skupiny jsou nad rámec této práce.

Je známé paralelní postavení u kmene PCC8801 (tvoří menší počet paralelních svazků thylakoidů, někdy mírně zvlněné). Podobné postavení thylakoidů jsem našla v literatuře pro kmen *Cyanothece* sp. ATCC51142 (SCHNEEGURT ET AL. 1997, REDDY ET AL. 1993).

3.3.8. Skupina 7 (Microcystis)

(*Microcystis ichtyoblabe*, *Microcystis aeruginosa* PCC7941, *Microcystis* sp. T17-1, *Microcystis* sp. 4B3, *Microcystis* sp. 4A3, *Microcystis* T1-4, *Microcystis* sp. KND9506, *Microcystis wesenbergii* NIES104)

Microcystis je jako rod na základě 16S rDNA velmi dobře vymezen. Problém nastává až na nižších než genových úrovních a to jak po morfologické stránce (hlavně v průběhu kultivace, kdy se charakteristiky značně mění, způsob tvorby kolonií není dostatečný taxonomický znak), tak po molekulární stránce. Tento rod je evolučně mladý a k jeho rozrůznění došlo v poměrně krátkém časovém intervalu. V takovém případě je 16S rDNA nepoužitelná pro hlubší analýzy a neposkytuje informace na subgenerické úrovni, ale umožňuje dobré vymezení celého rodu. Ten se jeví jako monofyletický. Problematické jsou pouze druhy *M. holsatica* a *M. elabens* - o nichž je ovšem již dlouho známo, že nepatří do rodu *Microcystis* (viz 4.1.3.).

Rozlišení jednotlivých druhů rodu *Microcystis* je diskutabilní i na základě jiných molekulárních technik (viz 1.1.1., 1.1.5.2.). Některé druhy by mohly být na základě DNA-DNA hybridizace sjednoceny (OTSUKA ET AL. 2001).

Z této práce znám postavení thylakoidů *Microcystis* sp. PCC7941 (thylakoidy krátké, vzájemně rovnoběžné, ve svazečcích kolmých k plazmatické membráně). Tato ultrastruktura odpovídá publikovanému uspořádání thylakoidů u *Microcystis aeruginosa* PCC7005 (CANINI ET AL. 2003).

3.3.9. Skupina 8 (*Synechococcus*)

(*Synechococcus* sp. PCC8807, *Synechococcus* sp. PCC7117, *Synechococcus* sp. PCC7003, *Synechococcus* sp. PCC73109, *Rhabdoderma* cf. *rubrum* kopara-CH)

Tato skupina obsahuje další zástupce polyfyletického rodu *Synechococcus* a kmen *Rhabdoderma* cf. *rubrum*. Nejbližší sesterská větev v této analýze je vláknitý kmen *Oscillatoria rosea*, který opět demonstruje promíchání kmenů řádů Chroococcales a Oscillatoriales a nepřírozenost těchto taxonů.

Postavení thylakoidů není známé.

3.3.10. Skupina 9 (*Synechocystis*)

(*Synechocystis* sp. PCC6702, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Synechocystis* sp. PCC6805, *Synechocystis* sp. PCC6714, *Merismopedia glauca* B1448-1)

Všichni zástupci rodu *Synechocystis* analyzovaní v této práci se vyskytují ve skupině 9 s výjimkou kmene *Synechocystis* sp. PCC6308 a *Synechocystis trididemni*. Kmeny PCC6702, PCC6803, PCC6805 a PCC6714 se vyznačují parietálním uspořádáním thylakoidů zatímco kmen PCC6308 má jako jediný uspořádání thylakoidů paralelní. Jeho odlišné umístění ve fylogenetickém stromu tedy pouze potvrdilo předpoklad, že kmeny s jiným typem thylakoidů tvoří monofyletické skupiny. Kmen PCC6308 se nachází ve společném klastru s dalšími kmeny s paralelními thylakoidy (viz 4.1.8.).

Kmeny *Synechocystis* sp. tvoří monofyletickou skupinu podpořenou 100% bootstrapem s rodem *Merismopedia*, tento rod má také parietální postavení thylakoidů (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003). Jako další nejbližší sesterská skupina z analyzovaných kmenů se ukázala *Spirulina* sp. PCC6313 potvrzující existenci monofyletických větví obsahujících jak kokální, tak vláknité formy sinic (zřetelné již v práci WILMOTTE & GOLUBIĆ 1991). Postavení thylakoidů rodu *Spirulina* je parietální (u všech zástupců Pseudanabaenaceae (KOMÁREK & ČÁSLAVSKÁ 1991)), stejně jako dalších zástupců skupiny 9.

V literatuře jsem si potvrdila parietální postavení thylakoidů kmene PCC6803 (LEE ET AL. 2000).

3.3.11. Skupina 10 (*Euhalothece*, *Halothece*)

(*Halothece* sp. MPI 96P605, *Euhalothece* sp. MPI 96N304, MPI 96N303, *Euhalothece* sp. MPI 95AH10, *Euhalothece* sp. MPI 95AH13, *Aphanothece* sp. ATCC 43922, *Dactylococcopsis* sp. PCC8305, *Cyanothece* sp. PCC6714)

Tato monofyletická skupina sdružuje halotolerantní jednobuněčné sinice. Kmeny jsou mnohdy morfologicky poměrně vzdálené. Hlavní společný znak je jejich ekologie, tedy přizpůsobení na život v prostředí se zvýšenou koncentrací solí. Velmi zajímavé je, že se toto ekologické přizpůsobení odráží i v konzervované sekvenci pro malou podjednotku ribosomu

a je jedním z velmi důležitých taxonomických kritérií. U jiných rodů nebývá ekologické kritérium tolik významné a zástupci často žijí ve velmi různých podmínkách.

Kmen PCC7418 má synonymní jméno *Aphanothece halophytica*, což také zdůrazňuje jeho halofylní vlastnosti.

Jak bylo již zmíněno v pracích např. MARGHERI ET AL. (1999) a GARCIA-PICHEL ET AL. (1998) před 100% podpořeným Euhalothece klastrem se odvětjuje *Halothece* sp. Klastř je jednoznačně oddělen od skupiny Cyanothece, do které tyto druhy náleží podle WATERBURY & RIPPKA (1989).

Postavení thylakoidů je v této skupině známé u PCC8305 a PCC7418. Oba kmeny mají zvlněné svazky thylakoidů uspořádané parietálně podél buněčné stěny (zvlnění je možná způsobeno fyziologickým stavem buněk při tvorbě preparátů).

3.3.12. Skupina 11 (Pleurocapsales)

(*Dermocarpella incrassata* SAG 29.84, *Pleurocapsa* sp., *Pleurocapsa* sp. PCC7314, *Pleurocapsa* sp. PCC7319, *Pleurocapsa minor* SAG 4.99, *Xenococcus* sp. PCC7307, *Xenococcus* sp. PCC7305, *Dermocarpa violacea* PCC7301 (*Stanieria* sp. PCC7301), *Dermocarpa* sp. MBIC10001, *Dermocarpa* sp. MBIC10004, *Dermocarpa* sp. MBIC10768, *Dermocarpa* sp. MBIC10056, *Dermocarpa* sp. MBIC10766, *Dermocarpa* sp. MBIC10765, *Myxosarcina* sp. uncultured, *Myxosarcina* sp. PCC7325, *Myxosarcina* sp. PCC7312, *Chroococcidiopsis* sp. CCMP1489, *Chroococcidiopsis* sp. PCC6712, *Xenococcus* sp. PCC7305, *Stanieria cyanosphaera*)

Většina rodů řádu Pleurocapsales, u kterých je známá sekvence 16S rDNA náleží do tohoto klastru. Výjimkou je rod *Chroococcidiopsis* (viz 3.3.4.).

Postavení thylakoidů zástupců této skupiny bylo publikováno pro *Chroococcidiopsis* sp. a *Stanieria cyanosphaera*. Thylakoidy jsou ve svazečcích s náznakem radiálního směru (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003). Uvedený kmen *Chroococcidiopsis* může ale také náležet do skupiny 3.

3.3.13. Skupina 12 (Cyanobacterium)

(*Cyanobacterium* sp. MBIC10216, *Cyanobacterium stanieri* PCC7202, *Synechocystis* sp. PCC6308, *Synechococcus* sp. PCC8806)

Cyanobacterium klastř se vyznačuje paralelními thylakoidy a je vysoce podpořený bootstrapovou hodnotou. Paralelní postavení thylakoidů podporuje oddělení rodu *Cyanobacterium* od rodu *Synechococcus*. Známé postavení thylakoidů u ostatních zástupců rodu *Synechococcus* je parietální, nebo se vyskytují v klastrech s kmeny se známým parietálním postavením thylakoidů.

3.3.14. Kmeny nezahrnuté do větších klastrů

(*Oscillatoria neglecta*, *Synechococcus* sp. PCC7336, *Phormidium* sp. MBIC10002, *Leptolyngbya* sp. PCC7375, *Synechococcus* sp. PCC7335, *Cyanothece aeruginosa* NIVA-CYA 258/2, *Synechococcus* sp. PCC7902, *Chamaesiphon subglobosus* PCC7430, *Leptolyngbya* sp. SEV5-5-C6, *Leptolyngbya boryanum*, *Phormidium* sp., *Leptolyngbya* sp. SEV5-1-C5, *Leptolyngbya crispata* SEV1-1-C1, *Synechocystis trididemni*, *Gloeothece* sp., *Cyanothece* sp. PCC7424, *Pleurocapsa* sp. PCC7327, *Oscillatoria rosea*, *Spirulina* sp. PCC6312, *Gloeocapsa* sp. PCC73106, *Johannesbaptistia pellucida* kopara-GD, *Chroococcus submarinus* kopara-BM)

Z této práce známe postavení thylakoidů pouze u těchto kmenů:

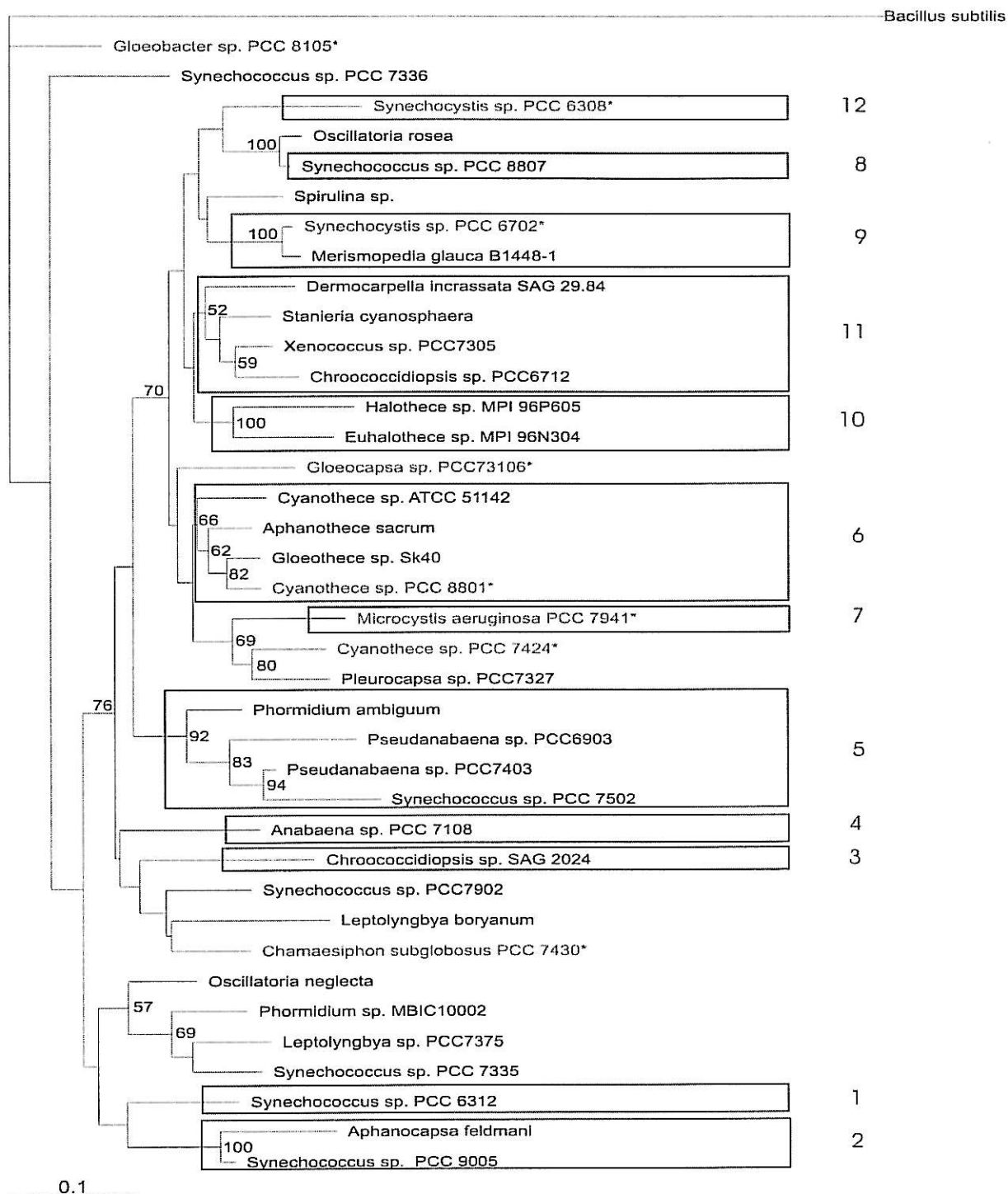
Chamaesiphon subglobosus PCC7430, *Cyanothece* sp. PCC7424, *Gloeocapsa* sp. PCC73106 (viz 3.2.).

Z dřívějších prací víme: většina kmenů rodu *Synechococcus* má thylakoidy parietální, stejně jako Pseudanabaenaceae. Phormidiaceae mají thylakoidy radiální, někdy zvlněné. Oscillatoriaceae mají krátké thylakoidy nepravidelně uspořádané v celém objemu buňky, *Cyanothece aeruginosa* má radiální postavení thylakoidů (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003). Rod *Spirulina* má thylakoidy paralelní. *Cyanothece* je taxon nacházející se na různých místech fylogenetického stromu a proto lze i u zástupců tohoto rodu nalézt různé typy postavení thylakoidů (KOMÁREK ET AL. 2004). *Chroococcus* má thylakoidy uspořádané v krátkých svazečcích nepravidelně až radiálně (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003).

O postavení thylakoidů ostatních kmenů nebyly nalezeny žádné záznamy (*Synechocystis trididemni*, *Johannesbaptistia pellucida* kopara-GD, *Gloeothece* sp.).

3.4. Výsledky metody Maximum Likelihood pro redukovaný počet kmenů

Pro získání vyšších statistických hodnot na bazálnějších úrovních fylogenetického stromu bylo ponecháno z dobře podpořených skupin pouze několik primitivnějších zástupců a byly vyřazeny kratší těžko reprodukovatelné sekvence. Tím se zredukoval počet analyzovaných kmenů na 40 + outgroup. Z těchto sekvencí byl vytvořen nový alignment a sestaven nový fylogenetický strom metodou Maximum Likelihood. Výsledkem je strom na obr.4. Statisticky se ale postavení celých skupin příliš nezlepšilo. U několika skupin se změnil vztahy mezi sesterskými skupiny a některé skupiny se posunuly na bazálnější úroveň.



Obr.4. Fylogenetický strom sestavený metodou Maximum Likelihood. Oproti obr.3. je zredukován počet analyzovaných kmenů a jsou ponechány jen primitivnější zástupci z jednotlivých skupin. Znázorněny jsou pouze bootstrapové podpory nad 50. Hvězdičky označují kmeny zkoumané v této práci. Rámečky znázorňují skupiny popisované v textu pod uvedenými čísly.

4. Diskuse

4.1. Diskuse k fylogenetickým stromům

V dnešní době se věda v otázce taxonomie a fylogeneze stále více spoléhá na molekulární obory. Hlavní fylogenetické analýzy sinic jsou postavené právě na základě sekvence 16S rDNA, přestože jsou známé limitace této metody. Kromě principiálních limitací zmíněných v literární rešerši je nutné připočítat i další. Problémem je hlavně nereprezentativní vzorek rodů a druhů. Ideální by bylo zpracovat všechny známé druhy sinic, u nich však zatím nedokážeme získat sekvenci 16S rDNA. Pro získání sekvencí je důležité získat jednodruhovou kulturu. Některé rody či druhy se ale dosud nepovedlo nikomu izolovat. Při práci s přírodními vzorky (např. technikou TGGE, DGGE) je sice možné získat sekvenci jednotlivých složek vzorku (také většinou ne všech), ale není možné ji konfrontovat s klasickou taxonomií (morfologií, fyziologií, ekologií,...), protože vzorek je v této fázi reprezentován pouze molekulami DNA v agarózovém gelu (proužkem v určité pozici v tepelném či močovinovém gradientu). Takto získanou sekvenci, shromažďovanou v GenBank of NCBI pod názvem „environmental sample“, je možné zakomponovat do fylogenetického schématu na základě některého genu (tradičně gen pro 16S rRNA), ale pokud už předtím nebyla u tohoto rodu známá sekvence tohoto genu (získaná z čisté kultury), není možné jej určit. Takto získaná sekvence je navíc dlouhá pouze kolem 500 bp.

Pokusy o převedení do laboratorních kultur se dějí hlavně u toxikologicky nebo ekologicky významných kmenů, často u hojných druhů. Úsilí o izolaci kmenů tedy není zaměřeno rovnoměrně. Proto můžeme v genových bankách nalézt desítky položek rodu *Synechococcus* a *Microcystis*, ale u mnoha ostatních rodů je položek minimum nebo naprosto chybí. Jedním z příkladů je běžná sinice rodu *Woronichia*, která dosud nebyla vyizolována do čisté kultury. U problematických rodů jako je *Chamaesiphon* je známá sekvence 16S rDNA pouze u jednoho kmene. Jeho postavení se v rámci fylogenetických analýz různých prací mění a pravděpodobně je tento rod polyfyletický. Proto by bylo třeba získat data z dalších kmenů tohoto druhu. Stejný případ je i u dalších rodů.

U velkého množství kmenů použitých pro analýzu není možné získat vzorek ani informace o kmenu, z kterého sekvence pochází. To znemožňuje použití polyfázického přístupu k problematice, který je nutný také vzhledem k časté nízké bootstrapové podpoře (méně než 50%) na nižších úrovních větvení fylogenetického stromu.

Vypovídací hodnota je omezena i rozdílnou délkou dostupných sekvencí. V následující analýze je pro některé druhy použita pouze částečná sekvence pro malou podjednotku ribosomu. Tyto kmeny většinou nebyly programem zařazeny do žádných větších klastrů (např. *Cyanothece aeruginosa*, *Gloeothece* sp., *Johannesbaptistia pellucida*, *Chroococcus submarinus*), což je možná způsobeno právě délkou analyzované sekvence.

Interpretaci výsledků znesnadňuje množství špatně určených kmenů, případně následná kontaminace kmenů ve sbírkách, zasílaných zákazníkům (viz 4.1.8.).

Zajímavé je i signifikantně rozdílné postavení dvou sekvencí ze stejného kmene *Microcystis holsatica* NIES43 od různých pracovníků (R. Kondo, accession number NCBI: D89036; B.A. Neilan, accession number NCBI: U40336) viz obr.3, skupina 2. Tyto sekvence se shodují pouze z 89%. Rozdíl byl znatelný i u sekvencí pro kmen PCC7325 určených jako *Stanieria* sp. PCC7301 (accession number NCBI: AB039009) nebo *Dermocarpa violacea* PCC7301 (accession number NCBI: Z82777), které se shodovaly z 98%.

Diskuse k některým skupinám podle obr.3 a skupin uvedených ve výsledcích:

4.1.1. Outgroup a kmeny brzo se odvětvující

Ani v jednom z následujících schémat (viz obr.3, 4, 6) se nepotvrdilo odštěpení kmenů vytvářejících klastr s *Pseudanabaena* sp. PCC6903 dříve než rodu *Gloeobacter*, které publikovali WILMOTTE & GOLUBIĆ (1991), GIOVANNONI ET AL. (1988) a PALINSKA ET AL. (1996). Dřívější odštěpení těchto kmenů není potvrzeno ani v řadě pozdějších prací (např. HONDA ET AL. 1999, TURNER 1997) a není ani v souladu s teorií publikovanou autory KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ (2003), kteří předpokládají, že buňka typu *Gloeobacter* (bez thylakoidů) je primitivnější ve fylogenezi thylakoidů než parietální postavení thylakoidů skupiny Pseudanabaenaceae.

4.1.2. Skupina 1 (Synechococcus)

Vzhledem k výsledkům analýzy s redukováným počtem kmenů (viz obr.4, kap. 3.4.), je možné, že skupina 1 je sesterskou ke skupině č.2, společně by pak mohly tvořit monofyletický klastr rodu *Synechococcus* (popř. *Cyanobium* – viz 4.1.3.). Toto však není statisticky dokázáno. Sesterskou skupinou k takto vzniklému klastru skupiny 1 a 2 jsou vláknité sinice rodu *Leptolyngbya*, *Phormidium* a *Oscillatoria* a kmen *Synechococcus* sp. PCC7335 (viz obr.4). Seskupení těchto tří morfologicky odlišných kmenů v jednom klastru

poukazuje jednoznačně na špatnou identifikaci. Přítomnost kokálního kmene PCC7335 v tomto klastru lze zdůvodnit faktem, že některé vláknité kmeny se v kulturách rozpadají na jednotlivé buňky a jejich určení je potom nemožné. Otázkou tedy je, jestli tento kmen měl původně jednobuněčnou organizaci nebo zda se jedná o mutaci vzniklou v průběhu kultivace. Další možná interpretace výskytu tohoto kokálního kmene je vznik jednobuněčné organizace zpětně z vláknité nebo mnohonásobný vznik mnohobuněčné organizace i v rámci jednoho klastru. Vždy ale v tomto případě vychází společná větev pro kokální a vláknité formy.

4.1.3. Skupina 2 (*Synechococcus*, *Cyanobium*)

Je vysoce pravděpodobné, že by po taxonomickém přehodnocení všechny kmeny skupiny 2 spadaly do rodu *Cyanobium*. Příkladem je *Synechococcus* sp. PCC6307, který má uvedeno i synonymní jméno *Cyanobium gracile*. Pro potvrzení této domněnky jsou důležitá i kritéria klasické taxonomie. V této skupině se nachází i problematický kmen *Microcystis holsatica* NIES43. Jeho postavení bylo interpretováno mimo jiné i jako tzv. „long-branch attraction“ (LITVAITIS 2002). Pravděpodobně se jedná o špatně určený kmen, možná o druh *Aphanocapsa holsatica*.

4.1.4. Skupina 5 (*Pseudanabaena*)

Výše zmíněná *Pseudanabaena* sp. PCC6903 (viz 4.1.1.) se v analýze provedené v této práci nachází v klastru spolu s dalšími vláknitými kmeny (*Pseudanabaena* sp. PCC7403, *Phormidium ambiguum*), ale také s kokálním kmenem *Synechococcus* sp. PCC7502. Vzhledem k jeho postavení v rámci skupiny 5 lze předpokládat stejné postavení thylakoidů (dosud není publikováno). Přítomnost kokálního kmene PCC7502 poukazuje na špatnou identifikaci. Jak už bylo zmíněno, je zde možnost mutace vláknitých kmenů ve sbírkách a jednobuněčná organizace může být pouze artefaktem znemožňujícím determinaci (viz 4.1.2.). V případě kmene PCC7502 se tedy nemusí jednat o *Synechococcus* sp., ale o chybně určený vláknitý kmen (např. *Pseudanabaena* sp.), což by podporovalo hypotézu ISHIDA ET AL.(2001), že rod *Pseudanabaena* tvoří kompaktní klastr, který by nebyl narušen přítomností jiného rodu.

Kmen *Phormidium ambiguum* nacházející se na bázi skupiny 5 je zástupcem řady dalších špatně určených kmenů. Patrně se jedná o dalšího zástupce r. *Pseudanabaena*.

4.1.5. Skupina 8 (*Synechococcus*)

Pro kmen *Rhabdoderma* cf. *rubrum* kopara-CH je známá pouze sekvence o 500 bp, což snižuje vypovídací hodnotu pozice tohoto kmenu ve fylogenetickém stromu. Navíc je u tohoto rodu známá pouze tato jediná sekvence. Pro hlubší úvahy by bylo nutno získat další kmeny rodu *Rhabdoderma*.

4.1.6. Skupina 9 (*Synechocystis*)

Známe postavení thylakoidů čtyř z pěti analyzovaných kmenů v této skupině i postavení thylakoidů sesterského kmene *Spirulina* sp. PCC6313. Z této znalosti předpokládám, že postavení thylakoidů kmene *Merismopedia glauca* bude parietální, stejně jako u těchto známých kmenů.

4.1.7. Skupina 11 (*Pleurocapsales*)

I v skupině 11 se nachází zástupci rodu *Chroococciopsis*, vzhledem k problematickému určování *Pleurocapsales*, může jít o determinační omyl, což nelze posoudit bez další znalosti morfologie a fyziologie jednotlivých kmenů.

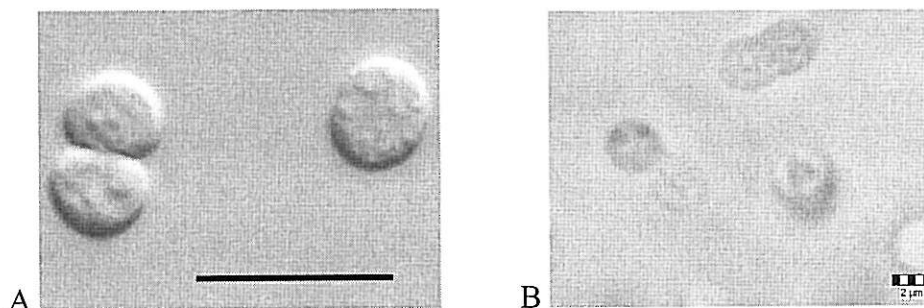
4.1.8. Skupina 12 (*Cyanobacterium*)

Výskyt *Synechocystis* sp. PCC6308 v tomto klastru byl diskutován ve skupině 9, ve které se nacházejí všechny ostatní kmeny rodu *Synechocystis* se známou sekvencí 16S rRNA. Již z paralelního postavení thylakoidů kmene PCC6308 bylo predikováno jeho odlišné postavení ve fylogenetickém stromu, které bylo potvrzeno.

U kmene PCC8806 není ultrastruktura známá. Je ale pravděpodobné, že po reklasifikaci rodu *Synechococcus* na rody *Cyanobium*, *Cyanothece* a *Cyanobacterium*, by tento kmen spadal taxonomicky do rodu *Cyanobacterium* (lze usuzovat z postavení ve fylogenetickém stromu na základě 16S rDNA).

Jediným problémem se stala v této skupině ultrastruktura kmene z Japonské sbírky MBIC. Thylakoidy zakoupeného kmene nazvaného *Cyanobacterium* sp. MBIC10216 jsou parietální. Tuto skutečnost lze zdůvodnit pozdější kontaminací vzorku jiným kmenem. Prvním podkladem pro tuto domněnku je fotografie tohoto kmene získaná z internetových stránek MBIC a její srovnání s obdrženým kmenem. Pro důkaz chci zjistit sekvenci

16S rDNA a tu analyzovat fylogenetickými programy a porovnat se sekvencí uvedenou v GenBank of NCBI pro tento kmen. Předpokládám, že tato sekvence nebude náležet do klastru s rodem *Cyanobacterium*, ale případně do klastru s obdobným parietálním postavením thylakoidů.



Obr.5. A. Fotografie *Cyanobacterium* sp. MBIC10216 získaná z internetových stránek MBIC, měřítko 10µm, B. fotografie údajně stejného zakoupeného kmene, měřítko 2µm.

4.1.9. Kmeny nezahrnuté do větších klastrů

Mimo hlavní klastry podpořené vysokou bootstrapovou hodnotou se nacházejí hlavně kmeny, u kterých je známá sekvence často jen u jednoho zástupce daného rodu. Není tedy možné diskutovat jejich vzájemné postavení a tento jeden kmen může reprezentovat celou skupinu stejně jako může být pouze chybně určený, nebo neadekvátně zařazený do fylogenetického schématu. Často se mimo hlavní klastry nachází kmeny se sekvencí 16S rDNA kratší než 1000 bp (*Gloeothece* sp., *Johannesbaptistia pellucida*, *Chroococcus submarinus*). Může to znamenat, že informace obsažená v takové sekvenci není dostatečná pro zařazení, ale tyto kmeny jsou navíc většinou jedinými zástupci rodu (např. *Johannesbaptistia pellucida*, *Chroococcus submarinus*) nebo druhu (*Cyanothece aeruginosa*).

Tyto kmeny mohou být uměle sdružovány jako sesterské taxony díky tzv. „long branch attraction“. Je to nedostatek fylogenetických programů, ve kterých nebylo možné tento jev odfiltrovat. Velká odlišnost od ostatních kmenů v analýze se stává společným znakem pro takto vzdálené kmeny a tím se dostávají v analýze k sobě. Vlastní umístění těchto vzdálenějších kmenů může být pak téměř náhodné.

O některých uvedených kmenech bylo diskutováno v předcházejících kapitolách (*Oscillatoria neglecta*, *Synechococcus* sp. PCC7336, *Phormidium* sp. MBIC10002, *Leptolyngbya* sp. PCC7375, *Synechococcus* sp. PCC7335 (viz 4.1.2., 3.3.2.), *Cyanothece aeruginosa* NIVA-CYA 258/2 (viz 4.1.), *Gloeothece* sp. (viz výše), *Oscillatoria rosea*,

Spirulina sp. PCC6312 (viz 3.3.9., 3.3.10.), *Gloeocapsa* sp. PCC73106 (viz 4.2.), *Johannesbaptistia pellucida* kopara-GD, *Chroococcus submarinus* kopara-BM (viz 4.1.)).

Postavení kmene *Synechococcus* sp. PCC7902 není příliš statisticky podpořeno, bylo by třeba nalézt další jemu příbuzné kmeny.

Chamaesiphon subglobosus PCC7430 (viz také 4.1.) je pravděpodobně velmi blízkým příbuzným k sinicím tvořící heterocyty stejně jako skupina 3 (rod *Chroococciopsis*). Tato domněnka není v rozporu ani s postavením thylakoidů.

Drobnou ucelenou skupinu tvoří kmeny *Leptolyngbya* sp. SEV5-5-C6, *Leptolyngbya boryanum*, *Phormidium* sp., *Leptolyngbya* sp. SEV5-1-C5, *Leptolyngbya crispata* SEV1-1-C1

Domnívám se, že *Phormidium* sp. je pouze špatně určený kmen *Leptolyngbya* sp. (vzhledem k jeho postavení mezi dalšími třemi zástupci rodu *Leptolyngbya*).

Kmen *Synechocystis trididemni* (viz také 3.3.10.) může patřit do jiného rodu. Jeho postavení je v rámci analýzy nestabilní a mění se při použití jiného datasetu. V tom případě se objevuje na bázi skupiny 12. U tohoto kmene došlo pravděpodobně k většímu počtu mutací (tvoří tzv. „long branch“) a jeho postavení je nejednoznačné.

Třetí větev Pleurocapsales je reprezentována pouze jedním zástupcem *Pleurocapsa* sp. PCC 7327. Postavení tohoto kmene nelze interpretovat bez znalosti jeho morfologie, životního cyklu a ekologie. Jeho sesterskou skupinu tvoří *Cyanothece* sp. PCC7424, u které je známé paralelní postavení thylakoidů. Nejbližší příbuzné kmeny u kterých je známé postavení thylakoidů (obr.6) jsou kmeny PCC8801 a ATCC51142. Oba tyto kmeny mají paralelní svazky thylakoidů.

4.2. Strom s redukováným počtem kmenů (obr.4)

Struktura stromu se oproti stromu sestavenému ze všech sekvencí (viz obr.3) výrazně nezměnila. Významnější byly pouze změny na bázi, kdy se dříve odvětvuje kmen *Synechococcus* sp. PCC7336. Tento kmen má poměrně dlouhou větev, což znamená, že se liší větším počtem mutací od ostatních kmenů v analýze. U takových kmenů je někdy problém správného zařazení do schématu. Jeho postavení na bázi, odvětvující se hned za rodem *Gloeobacter* nemusí být tedy signifikantní. Jeho primitivnost by se mohla projevit v postavení thylakoidů, které je ovšem neznámé. Tímto přeskupením se staly skupiny 1 a 2 sesterskými (obě tyto větve obsahují rod *Synechococcus* a v tomto případě by bylo možné je spojit v jednu monofyletickou skupinu).

Gloeocapsa sp. PCC73106 se vyskytuje v tomto stromu (obr.4) na bázi skupin 6 a 7, což se zdá pravděpodobnější (skupina 6 obsahuje ostatní zástupce rodu *Gloeocapsa*, zatímco

její nepřilíš statisticky podpořené postavení na obr.3 na bázi skupiny 12 (klastr rodu *Cyanobacterium*) nemělo ani morfologické opodstatnění). Ani toto postavení však není dobře podpořeno hodnotou bootstrapu.

Postavení skupin 8-12 má minimální podporu i při tomto datasetu, proto není adekvátní o něm diskutovat.

4.3. Vyčlenění rodu *Cyanobium*, *Cyanobacterium*

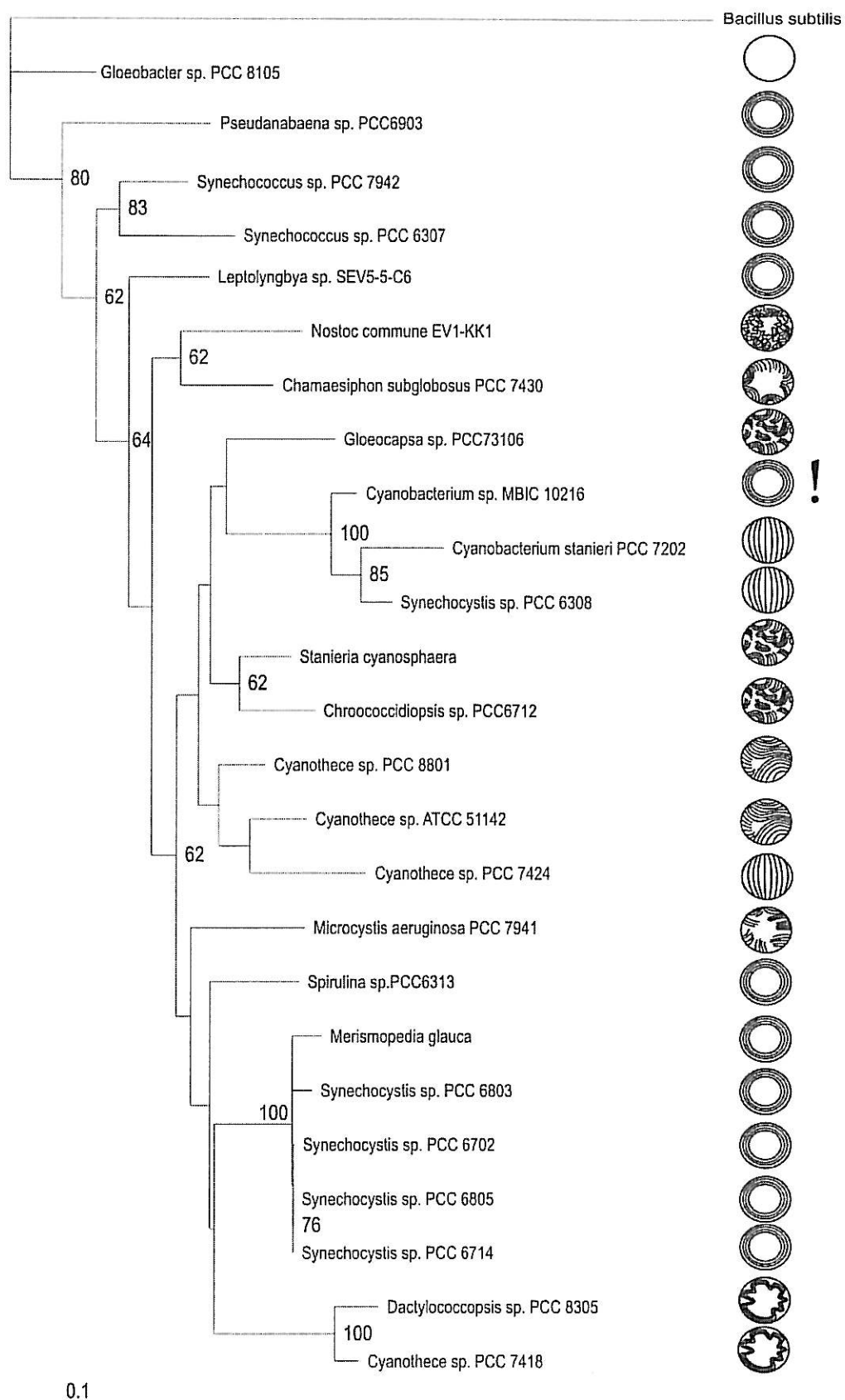
Ve sbírkách se nachází spousta kmenů, o kterých se ví, že jsou špatně pojmenovány, přesto zůstávají stará jména v platnosti, maximálně se přidá i synonymní označení daného kmene. Příkladem je *Microcystis holsatica* NIES43, o kterém se ví, že není zástupcem rodu *Microcystis*, nebo *Synechococcus* sp. PCC6307, který je typovým kmenem *Cyanobium gracile*, avšak i na hlavních stránkách PCC je stále veden pod názvem *Synechococcus* sp. Pro ujasnění taxonomie je třeba tyto kmény přejmenovat a staré názvy nepoužívat.

Tímto způsobem je třeba vyčlenit rod *Cyanobium* a *Cyanobacterium* alespoň pro kmény se známou sekvencí 16S rDNA. Tyto rody jsou jednoznačně vymezené v rámci fylogenetického stromu a jsou odlišitelné i na základě morfologie, ultrastruktury a GC komplexu.

Jak bylo již zmíněno, rozpadá se rod *Synechococcus* na několik větví (skupina 1, 2, 8, skupina 2 se navíc s vysokou bootstrapovou podporou rozpadá na dva klastry – „horní“ (2a) a „spodní“ (2b) viz obr.3). Pro některé kmény z PCC jsou uvedeny informace o GC komplexu: Skupina 1 obsahuje GC z 50,2-53,6 %, skupina 2a z 66,6 – 71,3%, skupina 2b z 55 – 55,1 % a skupina 8 z 48,5 – 49,3%. Rozpětí GC komplexu jednotlivých skupin se nepřekrývá a vymezuje tedy tyto skupiny jednoznačně. Procenta GC nejsou však známá u všech zástupců a je možné, že k překryvu v rámci některých skupin dojde při větším počtu vzorků.

Skupina 2a je vymezena velkým obsahem GC, lze ji bez problému odlišit i velikostí buněk (viz 3.3.3), která se také nepřekrývá s dalšími skupinami. Navíc tato skupina obsahuje i typový kmen *Cyanobium gracile* PCC6307. Proto by se všechny kmény skupiny 2a měly přeradit do rodu *Cyanobium* (výjimkou je *Aphanocapsa holsatica*, která může být pouze sesterskou skupinou a neznáme její morfologické vlastnosti, a *Microcystis holsatica* NIES43, pro který existují dvě sekvence spadající do různých skupin).

Stejně by se měla vyčlenit skupina 12 jako rod *Cyanobacterium*. Tyto kmény jsou jednoznačně vymezeny analýzou 16S rDNA i ultrastrukturou. Kmeny *Synechocystis* sp. PCC6308 a *Synechococcus* sp. PCC8806, by měly být přejmenovány na *Cyanobacterium* sp.



Obr.6. Fylogenetický strom sestavený metodou Maximum Likelihood pro kmeny u kterých je známé postavení thylakoidů (schematicky znázorněno). Vykřičníkem je označeno schéma postavení thylakoidů kmene MBIC 10216, které podle této práce nepřísluší k uvedené sekvenci 16S rDNA.

4.4. Postavení thylakoidů v rámci fylogenetického stromu

Postavení thylakoidů v rámci fylogenetického stromu bylo shrnuto na obr.6, kde jsou znázorněny pouze kmeny, u kterých je známá ultrastruktura. Je zde vidět, že parietální postavení thylakoidů je primitivní. Z tohoto schématu předpokládám, že nevzniklo opakovaně, ale pravděpodobně se zachovalo i u některých odvozenějších skupin.

Paralelní uspořádání thylakoidů možná vzniklo vícekrát, ale bootstrapová podpora na nižších úrovních není průkazná, proto nemůžu jistě tvrdit, že tyto skupiny nejsou sesterské a neukazují jednotný vznik a pozdější vývoj tohoto znaku do více linií.

Svazečkovité uspořádání kratších thylakoidů a neuspořádané thylakoidy heterocytózních kmenů jsou vzájemně příbuzné.

5. Závěr

- Dosavadní taxonomie vyšších celků a některých rodů sinic je nepřirozená. Používané taxony tvoří mnoho polyfyletických a parafyletických skupin.
- Rozdělení sinic podle buněčné organizace (kokální x vláknité) je umělé (v systému jsou monofyletické skupiny obsahující oba typy buněčné organizace).
- Vlákňitý typ sinic se v evoluci vyvinul několikrát nezávisle na sobě.
- Klastry vzniklé analýzou 16S rDNA často neodpovídají tradičním taxonům, ale vzájemně si odpovídá postavení thylakoidů v rámci jednoho klastru. Postavení thylakoidů je v rámci jednoho klastru nezávisle na tom, jedná-li se o vláknité či kokální kmeny.
- Některé typy uspořádání thylakoidů vznikly pravděpodobně v evoluci vícekrát. Parietální thylakoidy jsou primitivní, zachovaly se v několika evolučně vzdálených skupinách. Paralelní thylakoidy se mohly vyvinout několikrát.
- Názvy kmenů ve sbírkách často neodpovídají skutečnosti (kmeny jsou buď špatně určené, vzorky jsou kontaminované, nebo nejsou zařazeny do novějších taxonů odpovídajících nové nomenklatuře).
- Měly by se přejmenovat kmeny ve sbírkách, u kterých se ví o špatném určení a staré názvy nepoužívat. Kmeny navržené touto prací by se měly přeřadit k patřičným rodům (*Cyanobium*, *Cyanobacterium*).
- Samotné sekvenování je zdrojem nepřesností (sekvence od různých autorů se mohou značně lišit a tím je ovlivněno postavení kmenů v rámci fylogenetického stromu).

6. Literatura

- 1) **Anagnostidis, K., J. Komárek.** 1985. Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 1: Introduction. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies.* **38/39**: 291-302.
- 2) **Anagnostidis, K., J. Komárek.** 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies.* **50-53**: 327-472.
- 3) **Anagnostidis, K., J. Komárek.** 1990. Modern approach to the classification system of cyanophytes 5. Stigonematales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies.* **59**: 1-73.
- Baulina, O.I., O.B. Chivkunova, M.N. Merzlyak.** 2004. Destruction of Pigments and Ultrastructural Changes in Cyanobacteria during Photodamage. *Russian Journal of Plant Physiology.* **51(6)**: 761–768.
- Bittencourt-Oliveira, M. do C., M.C. de Oliveira, Ch.J.S. Bolch.** 2001. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions(cpcBA). *Journal of Phycology.* **37**: 810-818.
- 4) **Bolch, Ch.J.S., P.T. Orr, G.J. Jones.** 1999. Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology.* **35**: 339-355.
- 5) **Boyer, S.L., J.R. Johansen, V.R. Flechtner.** 2002. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology.* **38**: 1222-1235.
- 6) **Boyer, S.L., V.R. Flechtner, J.R. Johansen.** 2001. Is the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular biology and Evolution.* **18**: 1057-1069.
- Canini, A., S. Pellegrini, M.G. Caiola.** 2003. Ultrastructural variations in *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyta) during a surface bloom induced by high incident light irradiance. *Plant Biosystems.* **137 (3)**: 235-247.

- Casamatta, D.A., J.R. Johansen, M.L. Vis, S.T. Broadwater.** 2005. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. **41 (2)**: 421-438.
- ♂ **Castenholz, R.W., J.B. Waterbury.** 1989. Group 1. Cyanobacteria. In: J.G. Holt (ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1710-1727.
- ♂ **Castenholz, R.W.** 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Springer. pp. 473-599.
- Delwiche, C.F., M. Kuhsel, J.D. Palmer.** 1995. Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **4(2)**: 110-128.
- Delwiche, C.F., J.D. Palmer.** 1996. Rampant horizontal transfer and duplication of *rubisco* genes in eubacteria and plastids. *Molecular Biology and Evolution*. **13(6)**: 873-882.
- ♂ **Desikachary, T.V.** 1959. Cyanophyta. I.A.C.R. Monographs on algae, New Delhi, 686 pp.
- Douglas, S.E., C.A. Murphy.** 1994. Structural, transcriptional, and phylogenetic analyses of the ATPB gene-cluster from the plastid of *Cryptomonas-Phi* (Cryptophyceae). *Journal of Phycology*. **30 (2)**: 329-340.
- Drouet, F.** 1981. Summary of the classification of blue-green algae. *Nova Hedwigia*. **66**: 135-209.
- ♂ **Ernst, A., S. Becker, U. I. A. Wollenzien, Ch. Postius.** 2002. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology*. **149**: 217-228.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA-sequences - a Maximum-Likelihood approach. *Journal of Molecular evolution*. **6**: 368-376.
- Fewer, D., T. Friedl, B. Büdel.** 2002. Chroococcidiopsis and Heterocyst-Differentiating Cyanobacteria Are Each Other's Closest Living Relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **23**: 82-90.
- Fox, G. E., J.D. Wisotzkey, P. Jurtshuk, JR.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Journal of Systematic Bacteriology*. **42**: 166-170.
- ♂ **Flechtner, V.R., S.L. Boyer, J.R. Johansen, M.L. DeNoble.** 2002. *Spirirestis rafaelsis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), A New Cyanobacterial Genus from Arid Soils. *Nova Hedwigia* **74**: 1-24.

- Garcia-Pichel, F., U. Nübel, G. Muyzer.** 1998. The phylogeny of unicellular extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology*. **169**: 469-482.
- Gary, L.A., P.K. Hayes, S.L. O'Mahony, P. Vacharapiyasophon, E. Walsby.** 1999. A molecular and phenotypic analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) from the Baltic sea. *Journal of Phycology*. **35**: 931-937.
- Geitler, L.** 1932. Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14, Reprint by Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany. 1196 pp.
- Giovannoni, S.J., S. Turner, G.J. Olsen, S. Barns, D.J. Lane, N.R. Pace.** 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*. **170**: 3584-3592.
- Gruber, T.M., D.A. Bryant.** 1992. Tracing the relationships among the eubacteria using σ^{70} -type sigma factors. *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*, (J. Seckbach, ed.), pp. 3-13, Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Gürtler, V.** 1999. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. *Gene* **238**: 241-252.
- Gürtler, V., V.A. Stanisich.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. **142**: 3-16.
- Hadrys, H., M. Balick, B. Schierwater.** 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*. **1**: 55-63.
- Honda, D., A. Yokota, J. Sugiyama.** 1999. Detection of Seven Major Evolutionary Lineages in Cyanobacteria Based on the 16S rRNA Gene Sequence Analysis with New Sequences of Five Marine *Synechococcus* Strain. *Journal of Molecular Evolution*. **48**: 723-739.
- Ishida, T., M.M. Watanabe, J. Sugiyama, A. Yokota.** 2001. Evidence for polyphyletic origin of members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **201**: 79-82.
- Janse, I., M. Meima, W.E.A. Kardinaal, G. Zwart.** 2003. High- Resolution Differentiation of Cyanobacteria by Using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 6634-6643.
- Kane, M., H. Maeda, T. Fukunaga, K. Nishi.** 1997. Molecular phylogenetic relationship between strains of cyanobacterial picoplankton in lake Biwa, Japan. *Journal of Marine Biotechnology*. **5**: 41-45.
- Komárek, J.** 1999. Intergeneric characters in unicellular cyanobacteria, living in solitary cells. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies*. **94**: 195-205.

- 2 **Komárek, J., K. Anagnostidis.** 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2: Chroococcales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies*. **43**: 157-226.
- 2 **Komárek, J., K. Anagnostidis.** 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4: Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies*. **56**: 247-345.
- Komárek, J., K. Anagnostidis.** 1998. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig, D. Mollenhauer (eds.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. **19/1**: 548 pp. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- Komárek, J., J. Čáslavská.** 1991. Thylakoid patterns in oscillatorialean cyanophytes. *Archiv für Hydrobiologie*. pp. 267-270.
- 2 **Komárek, J., J. Kaštovský.** 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies*. **109**: 305-325.
- 2 **Komárek, J., V. Cepák, J. Kaštovský, J. Sulek.** 2004. What are the cyanobacterial genera *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies*. **113**: 1-36.
- Lanave, C., G. Preparata, C. Saccone, G. Serio.** 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*. **20**(1): 86-93.
- La Roche, J., G.W.M. VanderStaay, F. Partensky, A. Ducret, R. Aebersold, R. Li, S.S. Golden, R.G. Hiller, P.M. Wrench, A.W.D. Larkum, B.R. Green.** 1996. Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93** (26): 15244-15248.
- Lee, S., H.A. Owen, D.J. Prochaska, S.R. Barnum.** 2000. HSP16.6 Is Involved in the Development of Thermotolerance and Thylakoid Stability in the Unicellular Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology*. **40**: 283-287.
- 2 **Litvaitis, M.K.** 2002. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: interferences from constraint analyses. *Hydrobiology*. **468**: 135 - 145.
- Lokmer, A.** 2004. Polyfázický přístup k taxonomii sinic řádu Oscillatoriales [The polyphasic approach to the taxonomy of the cyanobacterial order Oscillatoriales, Bc. thesis, in Czech] University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, České Budějovice. 25 pp.

- Lu, W., E.H. Evans, S.M. McColl, V.A. Saunders.** 1997. Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*. **153**: 141-149.
- Margheri, M.C., M. Bosco, L. Giovannetti, S. Ventura.** 1999. Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **173**: 9-16.
- Margheri, M.C., R. Piccardi, S. Ventura, C. Viti, L. Giovannetti.** 2003. Genotypic Diversity of Oscillatoriacean Strains Belonging to the Genera *Geitlerinema* and *Spirulina* Determined by 16S rDNA Restriction Analysis. *Current Microbiology*. **46**: 359-364.
- Marli, F.F., D.H. Moon, S.M. Tsai, H. Lee, J.T. Trevors.** 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. **39**: 159-169.
- Morden, C.W., S.S. Golden.** 1989. *psbA* genes indicate common ancestry of prochlorophytes and chloroplasts. *Nature*. **337**: 383-385.
- Muyzer, G., K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. **73**: 127-141.
- Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. **2**: 317-322.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, S. Sato, M. Ikeuchi, H. Katoh, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, Ch. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, M. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, Ch. Tekeuchi, M. Yamada, S. Tabata.** 2002. Complete Genome Structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research*. **9**: 123 - 130.
- Neilan, B.A., D. Jacobs, T. Del Dot, L.L. Blackall, P.R. Hawkins, P.T. Cox, A.E. Goodman.** 1997. rRNA Sequences and Evolutionary Relationship among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**: 693-697.
- Nelissen, B., R. De Baere, A. Wilmotte, R. De Wachter.** 1996. Phylogenetic Relationship of Nonaxenic Filamentous Cyanobacterial Strains Based on 16S rRNA Sequence analysis. *Journal of Molecular Evolution*. **42**: 194-200.
- Nitta, K., N. Suzuki, D. Honma, Y. Kaneko, H. Nakamoto.** 2005. Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria. *FEBS Letters*. **579**: 1235-1242.

- Nübel, U., F. Garcia-Pichel, G. Muyzer. 1997. PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3327-3332.
- Otsuka, S., S. Suda, R.H. Li, S. Matsumoto, M.M. Watanabe. 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of General and Applied Microbiology*. **46**: 39-50.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, M.M. Watanabe. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerithrin. *FEMS Microbiology Letters*. **164**: 119-124.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, M.M. Watanabe. 1999. Phylogenetic relationship between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters*. **172**: 15-21.
- Otsuka, S., S. Suda, S. Shibata, H. Oyaizu, S. Matsumoto, M.M. Watanabe. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 873-879.
- Palenik, B., H. Swift. 1996. Cyanobacterial evolution and prochlorophyte diversity as seen in DNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *Journal of Phycology*. **32** (4): 638-646.
- Palinska, K.A., W. Liesack, E. Rhiel, W.E. Krubmbein. 1996. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates. *Archives of Microbiology*. **166**: 224-233.
- Payne, M.C. 2001. Taxonomic resolution of *Leptolyngbya* utilizing the 16S rRNA gene sequence. John Carroll University.
- Porta, D., R. Rippka, M. Hernández-Mariné. 2000. Unusual ultrastructural features in three strains of *Cyanothece* (cyanobacteria). *Archives of Microbiology*. **173**: 154-163.
- Rajaniemi, P., P. Hrouzek, K. Kaštovská, R. Willame, A. Rantala, L. Hoffmann, J. Komárek, K. Sivonen. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**: 11-26.
- Raeid, M.M.A., F. Garcia-Pichel, M. Hernández-Mariné. 2002. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology*. **177**: 361-370.

- Reddy, K.J., J.B. Haskell, D.M. Sherman, L.A. Sherman.** 1993. Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *Journal of Bacteriology*. **175** (5): 1284-1292.
- 2 **Rippka, R., G. Cohen-Bazire.** 1983. The Cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? *Annual Review of Microbiology*. **134B**: 21-36.
- 3 **Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, Y. Stanieri.** 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. **111**: 1-61.
- Rudi, K., O.M. Skulberg, F. Larsen, K.S. Jakobsen.** 1997. Strain characterisation and classification of Oxyphotobacteria in clone Cultures on the Basis of 16S rRNA Sequences from the Variable Regions V6, V7, and V8. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 2593-2599.
- Schneegurt, M.A., D.M. Sherman, L.A. Sherman.** 1997. Growth, physiology, and ultrastructure of a diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142, in mixotrophic and chemoheterotrophic cultures. *Journal of Phycology*. **33** (4): 632-642.
- 4 **Schopf, J.W.** 1993. Microfossils of early Archean apex chert – New evidence of the antiquity of life. *Science*. **260** (5108): 640-646.
- 5 **Sjöling, S., D.A. Cowan.** 2003. High 16S rRNA bacterial diversity in glacial meltwater lake sediment, Bratina Island, Antarctica. *Extremophiles*. **7**: 275-282.
- Spurr, A.R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*. **26**: 31-43.
- 6 **Starmach, K.** 1966. *Cyanophyta - sinice*. [Cyanophyta - blue-green algae.] *Flora słdkow. Polski 2*, PAN - Państw. Wyd. Nauk, Warszawa, 753 pp.
- 7 **Taton, A., S. Grubisic, E. Brambilla, R. De Wit, A. Wilmotte.** 2003. Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 5157-5169.
- Turner, S.** 1997. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Systematical Evolution*. **11**: 13-52.
- Urbach, E., D.L. Robertson, S.W. Chisholm.** 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature*. **355**: 267 – 270.

- Vioque, A.** 1997. The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids research*. **25 (17)**: 3471-3477.
- Waterbury, J.B., R.Y. Stanier.** 1981. Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments. In: *The Prokaryotes*. Vol. 1: pp. 247-256.
- Waterbury, J.B., R. Rippka.** 1989. Subsection I. Order Chlorococcales Wettstein 1924, emend. Rippka et al. 1979. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., Eds.), Vol. 3, pp. 1728 -1746. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*. **18**: 6531-6535.
- Wilmotte, A., S. Golubić.** 1991. Morphological and genetic criteria in taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Archiv für Hydrobiologie/Algological studies*. **64**: 1-24.
- Wilmotte, A., G. Van der Auwera, R. De Wachter.** 1992. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF („*Mastigocladus laminosus* HTF“) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*. **317**: 96-100.
- Zehr, J.P., M.T. Mellon, W.D. Hiorns.** 1997. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: Evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology*. **143**: 1443-1450.