

Biologická fakulta Jihočeské univerzity  
České Budějovice



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

# Polyfázický přístup k taxonomii sinic řádu Oscillatoriales

Ana Lokmer

2004

vedoucí práce: RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D.

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.

Anotace:

*The morphology of six selected strains of the oscillatorian cyanobacteria was examined, their DNA extracted and the PCR product of 16S rDNA from two strains was obtained. Observed morphological characteristics imply that the strains belong to three different genera. Further two phylogenetic trees were constructed from all available 16S rDNA sequences of the oscillatorian cyanobacteria longer than 1000 bp. A few basic evolutionary lines were defined, in spite of the difficulties concerning e.g. low variability of sequences, and their taxonomical value was discussed*

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

V Českých Budějovicích, 30.4.2003 .....

## Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
1.1. Historický vývoj taxonomie sinic	1
1.2. Moderní metody používané v taxonomii sinic	2
1.3. Cíle práce	7
<b>2. Materiál a metody</b>	<b>8</b>
2.1. Metody	8
2.1.1. Kultivace	8
2.1.2. Světelná mikroskopie	8
2.1.3. Statistická analýza	8
2.1.4. Izolace DNA	8
2.1.5. PCR	9
2.1.6. Fylogenetická analýza	9
2.2. Materiál	10
<b>3. Výsledky</b>	<b>11</b>
3.1. Morfologie a statistická analýza	11
3.2. Izolace DNA	13
3.3. PCR	13
3.4. Fylogenetická analýza	13
<b>4. Diskuze</b>	<b>14</b>
4.1. Morfologie	14
4.2. Izolace DNA	14
4.3. PCR	14
4.4. Fylogenetická analýza	14
4.4.1. Analýza fylogenetického stromu vytvořeného metodou Maximum parsimony	15
4.4.2. Analýza fylogenetického stromu vytvořeného metodou Maximum likelihood	16
<b>5. Závěr</b>	<b>17</b>
<b>6. Literatura</b>	<b>18</b>
<b>7. Příloha</b>	

## 1. Úvod

### 1.1. Historický vývoj taxonomie sinic

Sinice (Cyanobacteria) jsou prokaryotní oxyfototrofní organismy, které hrály důležitou roli ve vytváření kyslíkaté atmosféry, čímž vlastně umožnily vývoj dnešních životních forem. Patří do skupiny gramnegativních bakterií a podle fylogenetických stromů konstruovaných s ohledem na dostupné sekvence 16S rRNA se řadí mezi zelené nesírné bakterie a spirochety (GUPTA & GRIFFITHS 2002). Oddělení bakteriálních linií, tj. doba existence posledního společného předka, se vzhledem k paleontologickým nálezům některých membránových sloučenin odhaduje na 4,29 miliard let (SHERIDAN et al. 2003). Nejstarší nálezy sinic pocházejí z severozápadní Austrálie a jejich stáří se odhaduje na cca. 3,46 miliard let (SCHOPF 1993).

Přestože sinice jsou Prokaryota, jsou zkoumány tradičně v rámci botaniky společně s eukaryotními řasami, se kterými sdílejí mnoho ekologických charakteristik, především roli primárních producentů. Výzkumy v posledních letech přesvědčivě dokázaly, že chloroplasty vyšších rostlin se vyvinuly endosymbioticky ze sinic (DOUGLAS & TURNER 1991; BERGLAND & HASELKORN 1991; DELWICHE et al. 1995; NELISSEN et al. 1995; TURNER et al. 1999).

Pro pojmenování sinic se užívala celá řada různých názvů, jejichž množství dokazuje nejednoznačné pojetí jejich postavení mezi ostatními organismy a odráží zatím ještě zdaleka ne ukončenou historii vývoje jejich systému: Myxophyceae, Phycocromophyceae, Cyanophyceae, Schizophyceae nebo Cyanobacteria jsou některými z nejčastěji užívaných (RIPPKA, 1988).

První pokusy o klasifikaci sinic sahají do první poloviny 19. století, jako taxonomický starting point se uznává však až práce BORNET & FLAHAULT 1885. Systém se pochopitelně měnil a doplňoval podle toho jak přibývaly informace a jak se měnil názor na taxonomický význam jednotlivých znaků. Dnes se ještě hojně používá Geitlerův systém z roku 1932 (GEITLER 1932), založený především na morfologických a ekologických charakteristikách (sinice jsou na Prokaryota dost tvarově rozrůzněny). Tento systém umožňuje rychlé a nenáročné určení vzorků (jako jediný z vytvořených), což je zvláště vhodné pro terénní algology, není však dostatečně přesný a neodráží evoluční souvislosti (CASTENHOLZ 1992). DROUET (1968, 1973, 1978, 1981) svůj systém založil na domněnce, že existuje jen malý počet genotypů, které se však za odlišných podmínek projevují různě, tj. že vedle nízké genotypové variability existuje vysoká fenotypová (existence tzv. ekofenů). Později se ukázalo, že podcenil genetickou rozmanitost, a že tento systém je přehnaně zjednodušený (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985). Stanierův přístup (STANIER 1978) zdůrazňuje bakteriální původ sinic a navrhuje používání bakteriologického kódu nomenklatury. Na jeho základě vznikl systém RIPPKA et al. 1979, s pěti skupinami definovanými typem dělení, přítomností vláken, pravého a nepravého větvení a heterocytů a procentuálním obsahu C+G. Tento systém je však založen na popisu sinic z laboratorních kultur, což ale nezachycuje skutečnou rozmanitost přírodních populací (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985). Zatím poslední důkladnou úpravu systému sinic provedli ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985, 1988, 1990 a KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986, 1988. K pojmenování použili botanický kód nomenklatury, především kvůli výhodám při určování, zvláště v případě vzorků z přírody (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985). Klasifikaci založili na všech tehdy dostupných morfologických, ekologických, fyziologických, genetických a ultrastrukturálních datech získaných jak prací

s kulturami tak s nekultivovanými, v přírodě se vyskytujícími sinicemi (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1985).

Mezi nejvýznamnější změny v nazírání na tuto skupinu představuje v poslední době zahrnutí „oddělení“ Prochlorofyta do sinic. Tato skupina byla dříve pokládána za samostatnou vývojovou linii kvůli přítomnosti chlorofylu b a nepřítomnosti fykobilizomů. Molekulárními metodami bylo prokázáno, že tato skupina je parafyletická a že její zástupci se nacházejí roztroušeni v různých skupinách sinic (TURNER et al. 1989; TURNER 1997; LITVAITIS 2002). Dokonce byl nalezen kmen *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 mající funkční geny pro  $\alpha$ - a  $\beta$ - podjednotky fykobiliproteinu, podobnému fykoerythrinu mořské sinice rodu *Synechococcus* (HESS et al. 1996).

Přibývá také řada nových rodů a druhů, vzniklých jak důkladnějším zhodnocením a rozpadem už známých, tak popisem zcela nových taxonů. Nové druhy jsou popisovány z nejrůznějších stanovišť: ze sladkovodního planktonu (BAILEYWATTS & KOMÁREK 1991; MAGRIN et al. 1997; REKAR & HINDÁK 2002; KOMÁREK et al. 2002), z deštných pralesů (KOMÁREK 2003), z moře (ANAGNOSTIDIS & PANTAZIDOU, 1991; WERNER & SANT'ANNA 2000; MIYASHITA et al. 2003;), z aridních půd (FLECHTNER et al. 2002), z hypersalinních stanovišť (ANAGNOSTIDIS & ROUSSOUMOSTAKAKI 1991; NUBEL et al. 2000; ABED et al. 2002) atd. Všechny nové druhy jsou převážně hodnoceny vzhledem k morfologickým a ekologickým charakteristikám, ale objevují se i práce zahrnující molekulární kritéria, hlavně sekvence 16S rRNA, tykající se nejčastěji kritického zhodnocení zařazení už popsaných taxonů (WILMOTTE et al., 1993).

## 1.2. Moderní metody používané v taxonomii sinic

Od konce 80tých let, z velké části díky vyvinutí metody PCR (SAIKI et al. 1988), která výrazně usnadnila získávání dostatečného množství DNA, se začínají hojně používat molekulární metody v otázkách evolučních vztahů a systematiky sinic. Už první analýzy sekvencí **16S rRNA** přinesly zjištění, že zástupci řádů Oscillatoriales a Chroococcales (sekce I a III podle RIPPKA et al. 1979) jsou mezi sebou promícháni, tj. že vláknitost nebo jednobuněčnost v tomto případě neznamena příbuznost a že to nejsou znaky použitelné ke klasifikaci (GIOVANNONI et al. 1988). Pak se ukázalo, že Prochlorophyta nejsou monofyletická ani od sinic odlišitelná skupina, ale že v rámci sinic představují dvě nebo tři nezávislé linie (TURNER 1989; URBACH, ROBERTSON & CHISHOLM 1992). Výsledkem prací WILMOTTE & GOLUBIC 1991 a WILMOTTE 1994 byl fylogenetický strom s osmi monofyletickými skupinami. V té době sekvencí bylo ještě mnohem méně než dnes, takže bylo jasné, že se s jejich přibýváním strom bude modifikovat. Např. řád Pleurocapsales (sekce II podle RIPPKA et al. 1979), při prvních analýzách zdánlivě monofyletický, se rozpadá na minimálně tři linie (ISHIDA et al., 2001). TURNER 1997 z dostupných sekvencí sestrojil fylogenetický strom obsahující 10 jasně vymezených skupin, a přinesl další důkazy o nesourodnosti rodů *Synechococcus* a *Leptolyngbya* a zjistil, že *Chroococciopsis thermalis* (sekce II podle RIPPKA et al. 1979) je příbuzný heterocytickým sinicím. Použitím variabilních oblastí V6, V7 a V8 16S rRNA u 29 kmenů zahrnující všechny hlavní fyletické skupiny byl vytvořen strom s 13 oddělenými liniemi. *Pseudanabaena limnetica* NIVA-CYA 276/6 byla ode všech použitých kmenů nejvzdálenější, z rody *Planktothrix*, *Microcystis* a *Nostoc* vyšly jako monofyletické, však s určitým stupněm polymorfismu (RUDI et al. 1997). HONDA, YOKOTA & SUGIYAMA 1999 analýzou 16S rRNA rozlišily sedm hlavních vývojových linií, vřdycky stabilních, bez ohledu na použitou metodu (Maximum Likelihood nebo Neighbour - Joining), odpovídajících těm založeným na sekvencích jiných genů (*psbA*, *rbcL*, *rnpB*, *rpoC* a *tufA*). SEO & YOKOTA 2003 vytvořili stromy založené na 16S rRNA a na dalších, proteiny

kodujících genech a zjistili, že DNA sekvence *gyrB*, *rpoC1* a *rpoD1* (podjednotky gyrázy a DNA-dependentní RNA polymerázy) fylogeneze podporují 16S rRNA fylogenezi, v kombinaci se příslušnými sekvencemi aminokyselin dochází však k určitým nesrovnalostem.

16S rRNA, vlastně celý ribozomální operon, se považuje za obecně velmi výhodný předmět fylogenetických analýz, jelikož se nachází u všech organismů, je mozaikou vysoce konzervativních a proměnlivějších oblastí a není u něj pozorován horizontální přenos (WILMOTTE 1994). Navíc molekula 16S rRNA je u sinic dlouhá cca 1500 bp, což umožňuje dobré statistické zpracování dat (WILMOTTE 1994). Použití na úrovni nižší než rod, tj. na úrovni druhů a kmenů, je však omezené kvůli dost konzervativní sekvenci. Ta rozlišuje jen mezi dobře vymezenými taxony, selhává však u blízkce příbuzných, teprve v nedávné době oddělených, a proto je třeba použít např. DNA-DNA hybridizaci (FOX et al. 1992) nebo RFLP (TURNER 1997). Meze působnosti a vůbec použitelnost těchto metod a v kombinaci z dalšími - biochemickými, imunologickými, morfologickými, ekologickými atd. - se musí určit kritickým zhodnocením výsledků obdržných jednotlivými způsoby.

Analýza 16S rRNA je nejčastěji používaná metoda výzkumu fylogenetických vztahů, ale není jediná. Sekvenují se mnohé další geny a užívají se další metody jako je DNA-DNA hybridizace (STULP & STAM 1984; KONDO et al. 2000), analýza repetitivních sekvencí (MAZEL et al. 1990; ROUHIAINEN et al. 1995; ASAYAMA et al. 1996; RASMUSSEN & SVENNING 1998), **RFLP** - restriction fragment length polymorfism (NEILAN 1995; NEILAN et al. 1995; BOLCH et al. 1996; VANCOPPENOLLE et al. 1995; NEILAN et al. 1997; LYRA et al. 1997; VITI et al. 1997; LU et al. 1997; MARGHERI et al. 1999; MARGHERI et al. 2003) a **RAPD** - random amplified polymorphic DNA fingerprinting (NISHIHARA et al. 1997; CASAMATTA et al. 2003). Sekvenují a analyzují se geny a někdy i primární a sekundární struktura různých enzymů a jejich podjednotek, např. **nitrogenázy a nitrogenáza-reduktázy** (BENPORATH et al. 1993; BENPORATH & ZEHR 1994; ZEHR et al. 1997), **Rnázy P** (SCHON et al. 2002; SEO & YOKOTA 2003), **RNA polymerázy a DNA girázy** (SEO & YOKOTA 2003), také se analyzují geny a celé operony **fykobilinů** (MANEN & FALQUET 2002), **allozomy** (KATO et al. 1991), **hli geny**, které jsou ve velkém množství u mořských sinic adaptovaných na silné osvětlení (BHAYA et al. 2002). Přitom se neopomíjejí **spacery**, převážně v ribozomálním a fykocyaninovém operonu (BOLCH et al. 1999; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2001; BOYER et al. 2002; BAURAIN et al. 2002).

Analýza sekvencí genu Rnázy P u několika kmenů r. *Prochlorococcus* přinesla výsledky podobné jako při zkoumání 16S rRNA. Navíc poukázala na příbuznost kmenů přizpůsobených k silnému osvětlení a jasně je odlišila od kmenů žijících v podmínkách slabšího ozáření, a to bez ohledu na geografický původ (SCHON et al. 2002). Podobnost mořských kmenů rodu *Prochlorococcus* a *Synechococcus* a jejich odlišení od sladkovodních druhů rodů *Synechocystis* a *Nostoc* ukázala i analýza *hli* genů, které se u první skupiny nacházely ve výrazně větším množství (BHAYA et al. 2002). Tedy detekce těch genů umožňuje odvození fyziologických znaků a podmínek v původním prostředí, ale taxonomický význam může tato rodina genů mít jen stěží, jelikož selekční tlak v silně osvětleném mořském prostředí může opakovaně vyvolávat zmnožení *hli* genů u různých skupin.

V poslední době jsou navíc již k dispozici výsledky ze sekvenování celých genomů několika kmenů sinic (viz Tab. 1).

Z biochemických charakteristik je pro taxonomii používán např. obsah karotenoidů, který koreluje s ekologickým a morfologickým popisem zkoumaných kmenů (AAKERMANN et al. 1992; KARSTEN & GARCIA-PICHEL 1996), zatím je ale pořád málo údajů na vytvoření obecného závěru. Zastoupení mastných kyselin rovněž vykazuje určitý stupeň korelace

s morfologickými vlastnostmi, zdá se však být příliš proměnlivý a nespolehlivý pro širší fylogenetické hodnocení (TORNABENE et al. 1985; LI & WATANABE 2001).

kmen	accesion number v GenBank	autor
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	NC_005125	NAKAMURA et al. 2003
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	NC_005070	PALENIK et al. 2003
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	NC_000911	KANEKO et al. 1996
cf. <i>Prochlorococcus</i> SAR-1	NS_000023	VENTER et al. 2004
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP1986 ( <i>Prochlorococcus marinus</i> MED4)	NC_005072	ROCAP et al. 2003
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	NC_005071	ROCAP et al. 2003
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> CCMP1375	NC_005042	DUFRESNE et al. 2003
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	NC_003272	KANEKO et al. 2001

Tab. 1 -Úplné genomy sinic dostupné v GenBank

Také je zajímavé, že se bakterie obecně ve fylogenetických analýzách 16S rRNA seskupují do clustřů odpovídajících typu stanoviště, tj. že sladkovodní jsou dobře odlišitelné od mořských nebo terestrických populací (ZWART et al. 2002). Halofilní jednobuněčné sinice tvoří podle 16S rRNA jednu dobře vymezenou monofyletickou skupinu, vzdálenou od ostatních, tzv. *Halothece* cluster a to bez ohledu na geografický původ (GARCIA-PICHEL et al. 1998; MARGHERI et al. 1999; MARGHERI et al. 1999; NUBEL et al. 2000). Srovnáním částečných sekvencí 16S rRNA sedmi kmenů halofilní sinice *Microcoleus chthonoplastes*, z různých, navzájem vzdálených, lokalit se zjistilo, že DGGE (denaturing gel gradient electrophoresis) nerozlišuje mezi jednotlivými sekvencemi, tj. že *Microcoleus chthonoplastes* je kosmopolitní (GARCIA-PICHEL, PRUFERT-BEBOUT & MUYZER 1996). U jiných rodů sinic se však naopak prokázal nezanedbatelný význam geografického původu. Např. U 19 kmenů rodu *Nodularia*, sinice vytvářející vodní květ v různých částech světa, byly prozkoumány morfologické, toxikologické a molekulární charakteristiky. Sekvence *cpeBA*-IGS (spacer fykocyaninového operonu) a následný RAPD-PCR ukázaly, že kmene tvoří jasně oddělené druhy, proměnlivé v místním a celosvětovém měřítku (BOLCH et al. 1999).

Přes jasné vymezení a postavení řádů Nostocales a Stigonematales, situace se komplikuje na rodové a druhové úrovni. Tak morfologicky odlišné rody *Anabaena* a *Aphanizomenon* nelze rozlišit fylogenetickou analýzou založenou na 16S rRNA, ITS1 (spacer v ribozomálním operonu) nebo na *rbcLX* (RubisCO) a vyšlo najevo, že uvedené rody nejsou monofyletické. Kvůli velké podobnosti jejich 16S rRNA sekvence se navrhuje zařazení obou do jednoho rodu, bez ohledu na morfologické rozdíly. Navíc některé kmene *Anabaena* produkující odlišné toxiny byly od sebe odděleny, ale jednotlivé toxické skupiny byly vždy monofyletické, bez ohledu na geografický původ, shlukující se však s dalšími netoxickými zástupci *Anabaena* a *Aphanizomenon* (GUGGER et al. 2002). Pomocí RFLP 16S-23S ITS *Aphanizomenon* lze odlišit od *Anabaena*, velmi podobné jí ale byly zástupci rodu *Nostoc*

(NEILAN et al. 1997). Tomu protičeří zjištění, že podle úplné sekvence *nifD* jsou *Nostoc* a *Anabaena* jasně odlišitelné bez ohledu na použitou metodu hodnocení (HENSON, WATSON & BARNUM 2002).

Samozřejmě je, že sinice zodpovědné za toxické vodní květy, tj. jejich taxonomie, biologie a detekce jsou v popředí zájmu, což je viditelné i z množství dostupných sekvencí ve srovnání s rody pro člověka nealologa nevýznamnými (Tab. 2). *Microcystis* je jedním z takových rodů. RFLP fykocyaninového lokusu u několika toxických rodů ukázal, že to je rod parafyletický, prolínající se s použitým kmenem *Synechococcus* a s vláknitými kmeny rodu *Oscillatoria*, což se částečně lišilo od výsledků získaných analýzou 16S rRNA (NEILAN et al. 1995) a RAPD fingerprintingem (NEILAN 1995). Výsledky Southern blot hybridizace určitých opakovaných sekvencí *Microcystis aeruginosa* jasně ukazovaly na vysoký stupeň polymorfismu, ale také na odlišení těchto kmenů od dalších použitých rodů *Synechocystis*, *Synechococcus* a *Anabaena* (ASAYAMA et al. 1996). Další RAPD fingerprinting výsledky dobře vymezily druhy *M. novackeii*, *M. viridis* a *M. wesenbergii*, *M. aeruginosa* a *M. ichthyoblabe* se zdály být dost variabilní (NISHIHARA et al. 1997). Analýza *cpcBA* spaceru kultivovaných a z brazilských lokalit získaných kmenů *M. aeruginosa* taky potvrdila jejich polymorfismus a navíc ukázala divergenci mezi brazilskými a kmeny z kultur (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. 2001). Podle 16S rRNA rody *Microcystis* a *Aphanothece* jsou monofyletické, většina ostatních rodů v Chroococcales je polyfyletická (LEE & BAE 2002). To samé je zjištěno pro rody řádu Oscillatoriales a ještě jednou se potvrdilo, že znaky jako je přítomnost slizové pochvy jsou pro správné určení nepoužitelné (LEE & BAE 2001). Také rody *Arthrospira* a *Spirulina*, zajímavé mezi ostatními i kvůli svému ekonomickému významu, morfologicky velmi podobné, nejsou moc blízko příbuzné. Použitá *Spirulina* měla dokonce mnohem blíž k některým jednobuněčným sinicím (NELISSEN et al. 1994). Obsah fykobilinů je jeden z velice variabilních znaků a to i v rámci stejného druhu. Může sice korelovat z molekulárními znaky, ale nemá všeobecnou použitelnost (WILMOTTE et al. 1993).

Dosud vytvořená fylogenetická schémata většinou celkový obraz evoluce sinic příliš nevyjasňují. Velké množství taxonů, které byly dříve považovány za monofyletické, vychází velmi nesourodě a jsou rozptýleni po celém systému (např. *Oscillatoria*). Kromě rozpadu velkých taxonů na menší rody spolu příliš nekoreluje ani postavení větších taxonomických celků - řády Chroococcales a Oscillatoriales nejsou evidentně monofyletické a jejich zástupci jsou spolu v těchto schématech promícháni. Částečně ale těmto schématům odpovídá uspořádání thylakoidů. Monofyletické řády Nostocales a Stigonematales mají velice podobné vlnité thylakoidy, poněkud posunuté k okrajům buněk. Jim nejbližší příbuzné se zdají být Oscillatoriaceae, které mají stejný podobný typ thylakoidálního uspořádání. Skupinu s parietálním uspořádáním thylakoidů tvoří mnoho kokálních typů spolu se zástupci vláknitých sinic čeledi Pseudanabaenaceae. Charakteristické radiální thylakoidy mají všechny Phormidiaceae a kokální typy, podle molekulárních znaků jim příbuzné, a u několik dalších menších skupin. Skupina s parietálními thylakoidy, možná vzniklá modifikací předchozího typu, má zatím nejasné taxonomické postavení, ještě zkomplikované problémy pramenícími ze špatného pojmenování příslušných kmenů (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003).

Jak je vidět z uvedeného, bude třeba ještě hodně práce než se dosáhne jednotného a obecně použitelného systému. Kromě zařazování nově objevených a přeřazování už známých typů sinic, nutné je i další ověřování dosud k tomu používaných metod, tj. jejich mezí rozlišení (na úrovni řádů, čeledí, rodů...), taxonomického významu, spolehlivosti a jejich vzájemných vztahů.

ŘÁD	ROD	POČET SEKVENCÍ GENU PRO 16S rRNA Z GENBANK	ŘÁD	ROD	POČET SEKVENCÍ GENU PRO 16S rRNA Z GENBANK	
<b>Oscillatoriales</b>	Arthrospira	7 (23)	<b>Nostocales</b>	Microchaetaceae	Coleodesmium	3
	Geitlerinema	4 (5)			Microchaete	(1)
	Halomicronema	1 (4)			Spirirestis	3
	Halospirulina	3 (1)			Tolypothrix	3
	Leptolyngbya	21 (7)		Nostocaceae	Anabaena	66 (14)
	Lyngbya	7 (23)			Anabaenopsis	3 (4)
	Microcoleus	41 (30)			Aphanizomenon	26 (4)
	Oscillatoria	39 (25)			Cyanospira	1
	Phormidium	18 (23)			Cylindrospermopsis	26 (1)
	Planktothricoides	6			Cylindrospermum	3
	Planktothrix	74 (13)			Nodularia	32 (3)
	Plectonema	2 (3)			Nostoc	47 (55)
	Pseudanabaena/ Limnothrix group	8 (2),3 (2)			neidentifikované	(2)
	Spirulina	6 (9)		Rivulariaceae	Calothrix	8 (2)
	Symploca	5 (3)			Scytonemataceae	Scytonema
	Trichodesmium	7 (1)		neidentifikované		(4)
	Tychonema	1 (6)		<b>Stigonematales</b>		Acaryochloris
	neidentifikované	9 (8)			neidentifikované	
	Chlorogloeopsis	3				
	Fischerella	9				
Hapalosiphon	3					
Mastigocladopsis	1					
Mastigocladus	(3)					
Nostochopsis	2					
Stigonema	1					
Symphyonema	2					
Symphyonemopsis	1					
Umezakia	1					
Westiellopsis	6					

Tab. 2 - Počet sekvencí 16S rDNA delších a kratších než 1000 bp (v závorkách)

ŘÁD	ROD	POČET SEKVENCÍ GENU PRO 16S rRNA Z GENBANK	ŘÁD	ROD	POČET SEKVENCÍ GENU PRO 16S rRNA Z GENBANK				
<b>Chroococcales</b>	Aphanocapsa	2	<b>Chroococcales</b>	Chroococciopsis	10 (5)				
	Aphanothece	2 (5)		Dermocarpa	6 (1)				
	Chamaesiphon	1		Dermocarpella	1 (1)				
	Chroococcus	(1)		Myxosarcina	3				
	Crocospaera	-		Pleurocapsa	5 (1)				
	Cyanobacterium	2		Stanieria	3				
	Cyanobium	4 (2)		Xenococcus	2				
	Cyanothece	7 (1)		<b>"Prochlorophyta"</b>	Prochloraceae	Prochloron	1		
	Dactylococcopsis	1	Prochlorococcaceae					Prochlorococcus	34 (33)
	Gloeobacter	2			Prochlorotrichaceae	Prochlorothrix	2 (4)		
	Gloeocapsa	5							
	Gloeothece	4 (4)							
	Euhalothece	4 (7)							
	Halothece	1							
	Johannesbaptistia	- (1)							
	Merismopedia	1							
	Microcystis	85 (197)							
	Rhabdoderma	(1)							
	Synechococcus (2)	182 (88)							
	Synechocystis	5 (1)							
Thermosynechococcus	-								
neidentifikované	(6)								

Tab. 2 - pokračování

### 1.3. Cíle práce

- shromáždit co nejpodrobnější přehled o moderních metodách výzkumu taxonomie sinic
- vytvořit kolekci několika kmenů problematických rodů *Oscillatoria* a *Phormidium*
- tyto kmeny důkladně zhodnotit po morfologické stránce
- izolovat DNA z těchto kmenů a přitom otestovat vhodnou metodiku pro izolaci DNA a PCR
- ze sekvencí 16S rDNA přístupných na GenBank vytvořit fylogenetický strom

## **2. Materiál a metody**

### **2.1. Metody**

#### **2.1.1. Kultivace**

Sinice byly kultivovány v Petriho miskách na 1,5% agaru s kultivačním médiem BG 11 (STANIER et al. 1971).

#### **2.1.2. Světelná mikroskopie**

Byl použit mikroskop Olympus CX 40 a digitální fotografie jsou pořízeny pomocí kamery Olympus DP 10. Na šesti vybraných kmenech (viz materiál) jsem změřila rozměry buněk - délku a šířku buněk vlákna, resp. koncových buněk.

#### **2.1.3. Statistická analýza**

1. Vypočítala jsem poměr šířky ku délce buněk.
2. V programu Statistica jsem průkaznost výsledků testovala pomocí jednocestné analýzy variance (Single Factor ANOVA).
3. Provedla jsem post hoc Tukey HSD test.

#### **2.1.4. Izolace DNA**

Izolaci DNA jsem provedla fenol - chloroformovou metodou (SAMBROOK et al. 2001).

1. Biomasu jsem resuspendovala v 1 ml NET 50, se sarkosylem ( $c=3$  mg/ml) a pronázou E ( $c=0,23$  mg/ml).
2. Do zkumavky Eppendorf jsem přidala skleněné kuličky a vložila je na minutu do třepačky (5000) kvůli desintegraci buněk.
3. Získaný roztok jsem přenesla do čistých zkumavek Eppendorf a inkubovala jsem jej hodinu na ledě.
4. Do přibližně 0,5 ml vzorku jsem přidala 0,5 ml fenolu a míchala směs 10 min jemným otáčením stojanu se zkumavkami.
5. Vzorky jsem vložila na 10 min do centrifugy (13 000 ot/s).
6. Po centrifugaci jsem horní vodní fázi odebrala do čistých zkumavek Eppendorf.
7. Kroky 4 -6 jsem opakovala třikrát.
8. Ke vzorkům jsem přidala po 0,5 ml směsi fenolu a chloroformu v poměru 1:1 a dobře je promíchala (10 min).
9. Následovala centrifugace (13 000 ot/s) po dobu 10 minut.
10. Po přenesení horní vodní fáze do čistých zkumavek Eppendorf jsem do každé přidala po 0,5. ml chloroformu a směs promíchala.

11. Vzorky jsem vložila na 10 minut do centrifugy (13 000 ot/s).
12. Odebrala jsem horní vodní fázi do nových zkumavek Eppendorf a zaznamenala získaný objem.
13. Vzorkům jsem přidala 1/10 objemu octanu sodného, 2x objem 96% etanolu a 1 µl glykogenu.
14. Po promíchání jsem vzorky vložila na 10 minut do mrazničky na -70°C.
15. Vzorky jsem centrifugovala v chlazené centrifuze 15 minut (14 000 otáček/s).
16. Odsála jsem tekutinu a pelet opláchla v 1 ml 70% etanolu.
17. Opakovala jsem centrifugaci v chlazené centrifuze, tentokrát po dobu 5 minut.
18. Odsála jsem tekutinu a pelet nechala vysušit v sušičce na 31°C.
19. Vysušený pelet jsem rozpustila v 50 µl redestilované vody.
20. Ověřila jsem přítomnost DNA ve vzorcích gelovou elektroforézou (1% agarózový gel s ethidium bromidem; U = 83 V).
21. Získanou DNA uchovávám v mrazničce.

### 2.1.5. PCR

1. Vybrala jsem nejvhodnější primery s ohledem na délku sekvence a specifitu pro cyanobakteriální 16S rDNA.

primer	sekvence 5'-3'	cílová sekvence	autor
CYA359F	GGG GAA TTT TCC GCA ATG GG	359-378 v 16S (podle <i>E. coli</i> )	NUBEL et al. 1997
Primer 18	CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC	36-45 v 23S (podle <i>Synechococcus</i> )	WILMOTTE 1994

Tab. 3 -použité primery

2. Připravila jsem na ledě směs na PCR v malých zkumavkách Eppendorf.

dNTP	forward primer	backward primer	Taq DNAP	PCR pufr	redest. voda	DNA
2 µl	1 µl	1 µl	0,5 µl	2,5 µl	17 µl	1 µl

Tab. 4 -složení směsi na PCR

3. Do jedné zkumavky Eppendorf nebyla přidána DNA a byla použita v následných reakcích jako kontrola.
4. Nastavila jsem nasedací teplotu na 56°C a zvolila program s následujícími parametry:
  - 5 cyklů: 95°C (5 min), 94°C (1 min), 44°C (1,5 min), 72°C (2 min)
  - 25 cyklů: 94°C (1 min), 48°C (1,5 min), 72°C (2 min)
  - ukončení: 72°C (10 min)
5. Přítomnost PCR produktů byla ověřena gelovou elektroforézou (viz Izolace DNA)

### 2.1.6. Fylogenetická analýza

1. Z GenBanku jsem vybrala všechny sekvence 16S rDNA řádu Oscillatoriales delší než 1000 bp (223 sekvence).
2. Alignment sekvencí byl generován v programu ClustalX.
3. Jako outgroup byly použity sekvence z *Nostoc* PCC 9709 (a.n. AF027654) a *Fischerella muscicola* PCC 7414 (a.n. AF132788).
4. V programu PAUP byl metodou Maximum parsimony vytvořen consensus tree z 5521 nejlepších stromů.
5. Na základě alignmentu a consensus tree byly vyloučeny sekvence navzájem si velmi podobné a ze zbývajících 67 sekvencí byl znovu vytvořen alignment.
6. V programu Treepuzzle byl z těchto sekvencí vytvořen fylogenetický strom metodou Maximum likelihood a provedena bootstrap analýza.

## 2.2. Materiál

Pro testování nejvhodnějších metod pro molekulární analýzu jsem vybrala 6 sinic rodů *Phormidium* a *Oscillatoria*. Všechny použité kmeny, kromě *Oscillatoria limosa*, pocházejí ze sbírky autotrofních mikroorganismu BÚ AV ČR v Třeboni.

kmen	místo sběru
<i>Phormidium animale</i> (AG. ex GOM.)ANAGN. et KOM. str. GROWTHER/1459-6 Sol.: No. 1 Coll.: CCAP 1459/6 (1976,1982) sub " <i>Oscillatoria animalis</i> " SAUG 1459-6 (1982) sub " <i>Oscillatoria animalis</i> " UTEX 1309 (1978) sub " <i>Oscillatoria animalis</i> "	UK, London, University College
<i>Phormidium animale</i> (AG. ex GOM.)ANAGN. et KOM. str. KLABOUCHOVÁ 1987/1 Sol.: No. 1	dolina Lužnice, luční půda
<i>Phormidium animale</i> (AG. ex GOM.)ANAGN. et KOM. str. HINDÁK 1967/39 Orig. det. sub " <i>Microcoleus vaginatus</i> " Sol.: No. 1	Rumunsko, Brašov, půda
<i>Phormidium animale</i> (AG. ex GOM.)ANAGN. et KOM. str. HINDÁK 1963/108 Orig. det. sub " <i>Oscillatoria formosa</i> " Sol.: No. 1	Itálie, kráter Vesuvu, půda
<i>Oscillatoria sancta</i> KÜTZ. ex GOM. str. KOCH 1970/Gott. 74.79 Sol.: No. 1 Coll.: SAUG 74.79 (1982)	Německo, Botanická zahrada Univerzity v Göttingen, skleník
<i>Oscillatoria limosa</i>	Mladohaklovský rybník

Tab. 5 -seznam vybraných kmenů

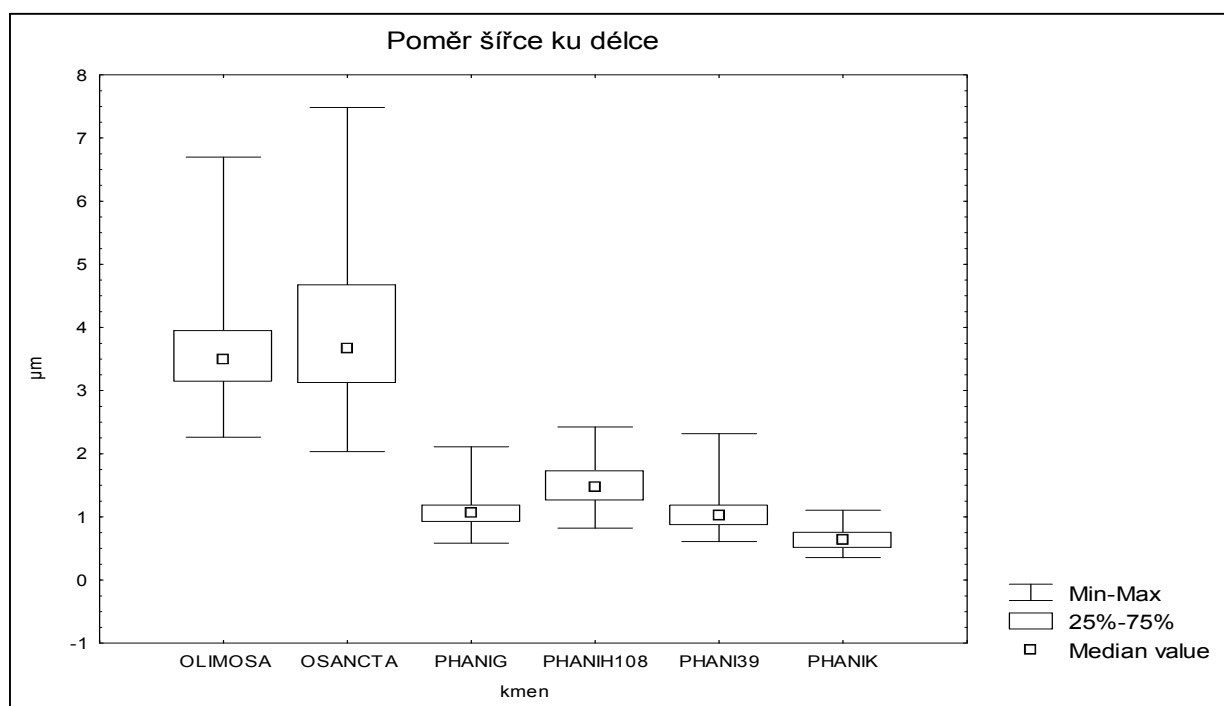
### 3. Výsledky

#### 3.1. Morfologie a statistická analýza

Kmeny se jasně lišily poměrem šířky ku délce všech, tedy i koncových buněk (Grafy 1 a 2, Tab. 7 a 9). Jen mezi kmeny *P. animale* Hindák 1967/39 a *P. animale* Growther 1459/-6 rozdíl průkazný nebyl (Tab. 8), což také platí pro poměr šířky ku délce koncových buněk mezi *P. animale* Hindák 1963/108 a *P. animale* Growther 1459/-6, mezi *P. animale* Hindák 1963/108 a *P. animale* Growther 1459/-6 a mezi *P. animale* Hindák 1963/108 a *P. animale* Hindák 1963/108 (Tab. 10). Kromě *P. animale* Hindák 1963/108 a *P. animale* Growther 1459/-6 se všechny lišily barvou vláken a kultur (viz Apendix - fotodokumentace). Všechny měly slizovou pochvu, kromě *O. limosa* (byla ale pozorována u starých odumírajících vláken) a všechny tvořily hormogonia (Tab. 6).

rod a druh	kmen	stanoviště	sliz	hormogonia
<i>Phormidium animale</i>	AG ex GOM, Growther 1459/-6	?	+	+
<i>Phormidium animale</i>	AG ex GOM, Klabouchová 1987/1	půda	+	+
<i>Phormidium animale</i>	AG ex GOM, Hindák 1967/39	půda	+	+
<i>Phormidium animale</i>	AG ex GOM, Hindák 1963/108	půda	+	+
<i>Oscillatoria sancta</i>	KÜTZ ex GOM, Koch 1970/Gött 74.79	skleník (půda?)	+	+
<i>Oscillatoria limosa</i>	-	rybník	+/-	+

Tab. 6 -Základní charakteristika jednotlivých kmenů



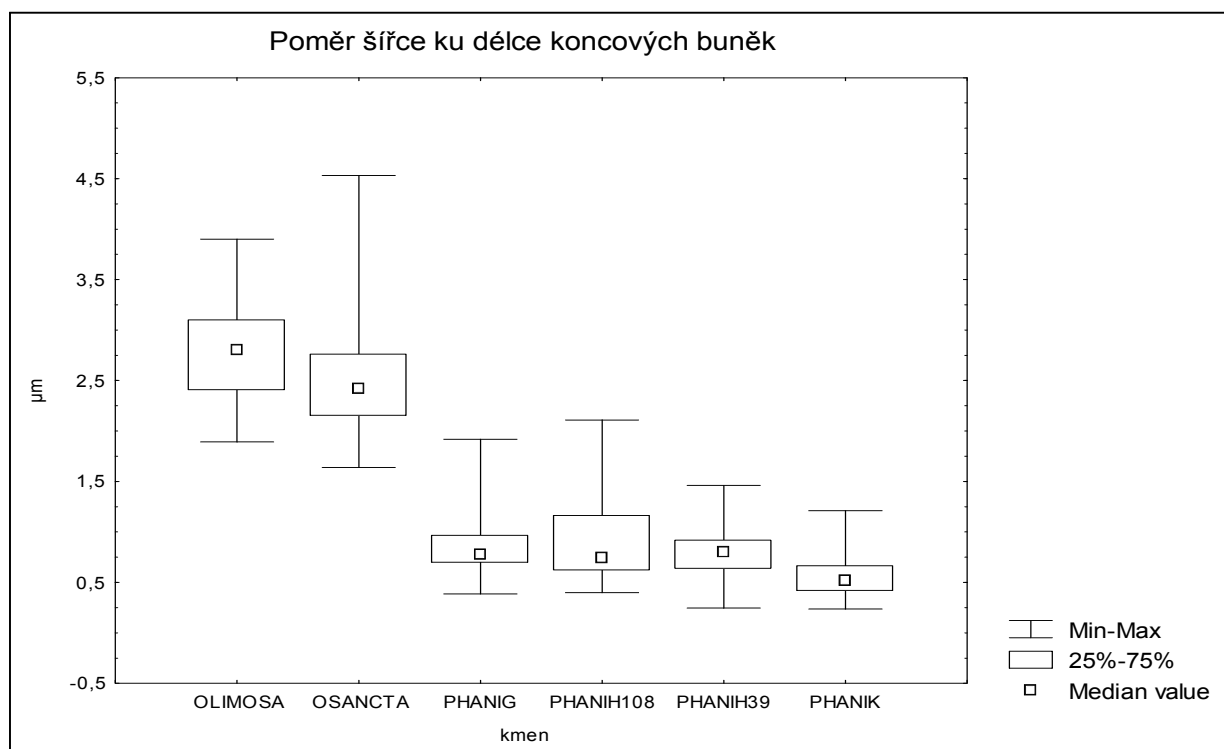
Graf 1 -Poměr šířce ku délce buněk (počet měření pro každý kmen = 100)

Single factor ANOVA Main effect	počet stupňů volnosti DF <sub>e</sub>	reziduální čtverec odchylky MSe	chyba DF <sub>e</sub>	chyba MSe	F	hladina signifikance
rozdíl poměrů šířky a délky buněk	5	201,3482	594	0,337448	596,6786	0,000

Tab. 7 -ANOVA pro poměr šířce ku délce buněk (počet měření pro každý kmen = 100)

General MANOVA Tukey HSD test	Olimosa	Osancta	PhaniG	PhaniH108	PhaniH39	PhaniK
Olimosa		0,28102	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
Osancta	0,028102		0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
PhaniG	0,000020	0,000020		0,000022	0,994995	0,000021
PhaniH108	0,000020	0,000020	0,000022		0,000020	0,000020
PhaniH39	0,000020	0,000020	0,994995	0,000020		0,000028
PhaniK	0,000020	0,000020	0,000021	0,000020	0,000028	

Tab. 8 -Tukey HSD test pro poměr šířce ku délce buněk (počet měření pro každý kmen = 100)



Graf 2 -Poměr šířce ku délce koncových buněk (počet měření pro každý kmen = 100)

Single factor ANOVA Main effect	počet stupňů volnosti DF <sub>e</sub>	reziduální čtverec odchylky MSe	chyba DF <sub>e</sub>	chyba MSe	F	hladina signifikance
rozdíl poměrů šířky a délky koncových buněk	<b>5</b>	<b>98,27908</b>	<b>594</b>	<b>0,141637</b>	<b>693,8806</b>	<b>0,000</b>

Tab. 9 – ANOVA pro poměr šířce ku délce koncových buněk (počet měření pro každý kmen = 100)

General MANOVA Tukey HSD test	Olimosa	Osancta	PhaniG	PhaniH108	PhaniH39	PhaniK
Olimosa		<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>
Osancta	<b>0,000020</b>		<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>
PhaniG	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>		<i>0,984413</i>	<i>0,908061</i>	<b>0,000021</b>
PhaniH108	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<i>0,984413</i>		<i>0,526619</i>	<b>0,000020</b>
PhaniH39	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<i>0,908061</i>	<i>0,526619</i>		<b>0,000152</b>
PhaniK	<b>0,000020</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000021</b>	<b>0,000020</b>	<b>0,000152</b>	

Tab. 10 -Tukey HSD test pro poměr šířce ku délce koncových buněk (počet měření pro každý kmen = 100)

### 3.2 Izolace DNA

Ze všech kmenů byla úspěšně vyizolována DNA chloroform- fenolovou metodou.

### 3.3 PCR

PCR produkt byl úspěšně získán ze kmenů *Oscillatoria sancta* KÜTZ ex GOM, Koch 1970/Gött 74.79 a *Phormidium animale* AG ex GOM, Hindák 1967/39, z ostatních dosud nebyl.

### 3.4. Fylogenetická analýza

Výsledkem parsimoniální analýzy je fylogenetický strom (příloha 2), strom získaný metodou Maximum likelihood je v příloze 3.

## 4. Diskuze

### 4.1 Morfologie

Zkoumané kmeny rodů *Oscillatoria* a *Phormidium* se průkazně liší rozměry buněk, jejich taxonomické oddělení je po stránce morfologické oprávněné. Bližší pohled na zástupce rodu *Phormidium* odhaluje další rozdíly. *P. animale* AG ex GOM, Klabouchová 1987/1 má totiž výrazně užší vlákna než zbývající kmeny (mezi 1,5-2  $\mu\text{m}$  na rozdíl od ostatních se šířkou vláken mezi 3-4  $\mu\text{m}$ ) a mezi buňkami jsou patrná zaškrbení buněčné stěny. Navíc jsem nepozorovala nekrotické buňky při tvoření hormogonií a tento kmen se odlišuje i makroskopicky v kultuře - zatím co ostatní vytvářejí kompaktní povlaky s viditelnou vláknitou strukturou, *P. animale* AG ex GOM, Klabouchová 1987/1 vytváří víceméně homogenní zelený povlak bez zřetelných vláken. Zjištěné charakteristiky zařazují tento kmen do rodu *Geitlerinema* (ANAGNOSTIDIS 1989).

### 4.2 Izolace DNA

Úspěšná izolace DNA je důležitá především kvůli druhu *O. limosa*. Tento druh skoro nelze kultivovat a proto ještě není dostupná ani jedna z něj pocházející sekvence 16S rDNA. Mě se kultivace také nepodařila, ale DNA izolována z čerstvého terénního vzorku umožňuje další molekulární analýzy bez ohledu na neexistenci řádného kmene.

### 4.3. PCR

Získány byly PCR produkty ze kmenů *Oscillatoria sancta* KÜTZ ex GOM, Koch 1970/Gött 74.79 a *Phormidium animale* AG ex GOM, Hindák 1967/39 pomocí specifických cyanobakteriálních primerů. Nepřítomnost PCR produktů u ostatních kmenů může mít více příčin. DNA se často shlukuje v některých částech zkumavky, takže se snadno může stát, že v odebraném mikrolitru vzorku DNA zrovna nebyla. Navíc PCR u ostatních kmenů nebyl proveden současně s *Oscillatoria sancta* KÜTZ ex GOM, Koch 1970/Gött 74.79 a *Phormidium animale* AG ex GOM, Hindák 1967/39. Mohlo se tedy jednat o nějakou jinou chybu, např. neúčinnou polymerázu. Stále probíhající práce se soustřeďují nyní na tento problém.

### 4.4 Fylogenetická analýza

Množství sekvencí 16S rDNA sinic v GenBank se denně zvětšuje, nejvíce jich však pochází z několika pro člověka významných taxonů (ať už z hlediska toxikologického nebo komerčního). Jiná významná skupina sekvencí pak pochází z těch sinic, které lze snadno kultivovat. Takových sekvencí jsou desítky (Tab. 2), zatímco mnohé rody nebyly osekvenovány vůbec, což značně ovlivňuje i výsledky fylogenetických analýz. Z toho vyplývá potřeba sekvenovat taxonomicky problematické taxony. Některé z těchto druhů nejsou vůbec vzácné, v přírodě se snadno nacházejí, ale kvůli obtížím při kultivaci jsou dosud molekulárně nezkoumány - např. *Oscillatoria*. Navíc značný podíl dostupných sekvencí tvoří

krátké, méně než 1000 bp dlouhé úseky 16S rRNA genu, čímž je vypovídací hodnota omezena. Nezanedbatelný problém spočívá také v případném nesprávném taxonomickém zařazení sekvenovaných sinic, což je ve sbírkách obvyklým a častým jevem (osobně mám zkušenosti s nesprávně určenými kmeny ze sbírky v Třeboni). Do interpretace evolučních vztahů to pochopitelně vnáší dodatečný zmatek (opět viz rod *Oscillatoria*, *Phormidium* atd.). Proto je k vyjasnění taxonomického postavení jednotlivých kmenů nutné také důkladné morfologické zhodnocení, většinou jsou však dostupné informace týkající se morfologických charakteristik sinic v kulturách nepočtené a často nejsou k dispozici vůbec.

#### 4.3.1. Analýza fylogenetického stromu vytvořeného metodou Maximum parsimony

Tento fylogenetický strom byl vytvořen ze všech sekvencí 16S rDNA sinic řádu Oscillatoriales dostupných v GenBank. Na první pohled je patrné, že mnoho rodů tohoto řádu není zastoupeno vůbec a značný podíl stávajících sekvencí pochází z několika mála taxonů (rody *Microcoleus*, *Planktothrix*...).

Větev A je tvořena příslušníky čeledi Pseudanabaenaceae (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1988), vyznačujícími se parietálním uspořádáním thylakoidů a je rozdělena do dvou skupin. První skupinu tvoří rody *Pseudanabaena*, *Limnothrix* a kmeny několika dalších rodů. Mezi nimi jsou *Phormidium mucicola* a *Oscillatoria limnetica*, které jsou už přeřazeny do rodu *Pseudanabaena* (KOMÁREK & KAŠTOVSKÝ 2003), a *Oscillatoria* sp. UTCC 393 a *Phormidium* sp. E 18, o kterých nemám žádné informace, ale pravděpodobně se jedná o chybně určené kmeny. Druhou skupinu tvoří zástupci rodu *Leptolyngbya* s krátkými buňkami, *Plectonema boryanum*, už přejmenována na *Leptolyngbya boryanum* a několik dalších kmenů *Phormidium* a *Oscillatoria*. Už první fylogenetické analýzy ukázaly, že tyto dva rody jsou parafyletické (GIOVANNONI et al. 1988, WILMOTTE & GOLUBIC 1991). Opět zde vystupuje už zmíněný problém nesprávného taxonomického zařazení kmenů ve sbírkách, takže je pravděpodobnost, že zmíněné kmeny patří do nějakého rodu z čeledi Pseudanabaenaceae, dost vysoká - ale tato hypotéza nejde ověřit. Fakt že zástupci *Pseudanabaena*, *Limnothrix* a ostatní jsou navzájem v této větvi promícháni, může mít více příčin. Všechny sekvence jsou si velmi podobné, tedy jejich informační hodnota není vysoká. K tomu se připojuje i skutečnost, že obecně 16S rDNA nemá velkou rozlišovací schopnost a její význam spočívá především v odlišení vyšších taxonomických jednotek (FOX et al. 1992), a ne druhů nebo tak blízce příbuzných rodů. Navíc rod *Pseudanabaena* už ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1988 rozdělili do třech podrodů a jakékoliv členění na základě morfologie a dalších podobných charakteristik nemusí přesně odrážet evoluční vzdálenost mezi taxony zjištěnou molekulárními metodami. Kmeny patřící do různých podrodů *Pseudanabaena* mohou být molekulárně navzájem stejně vzdáleny jako od nějakého blízce příbuzného rodu.

Větev B tvoří především rod *Microcoleus*, zastoupen druhem *Microcoleus vaginatus*. Vedle něj je umístěna *Tychonema bourrellyi* a některé další kmeny problematických rodů *Phormidium* a *Oscillatoria*. Na bázi tohoto clusteru se nacházejí monofyletické *Trichodesmium*. Celá větev je ale polytomická a stěží lze z ní vyčíst něco jiného než soudržnost rodu *Trichodesmium* a uniformitu sekvencí u *Microcoleus vaginatus*. Ovšem už správné vymezení rodu *Microcoleus* je sporné, jelikož se *Microcoleus chthonoplastes* ve stromu nachází v jiné pozici (vedle kmenů *Symploca* a *Lyngbya*, ve větvi C). Rod *Microcoleus* bude z největší pravděpodobností rovněž polyfyletický rod. Většina kmenů této větve patří do čeledi Phormidiaceae (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1988), mezi ostatním typické radiálním uspořádáním thylakoidů. Opět předpokládám, že několik málo příslušníků jiných čeledí (např. *Oscillatoria sancta* PCC 7515) do této skupiny spadají jen díky determinačnímu omylu.

Rod *Planktothrix* (větev C) tvoří jednu velkou skupinu a rozpadá se na druhy *P. mougeotii*, *P. pseudagarhii* a na polytomickou větev se zástupci *P. agardhii* a *P. rubescens*. Od nich se odlišuje *Planktothrix/Planktothricoides raciborskii*. Ten také tvoří sourodou skupinu, nacházející se však v blízkosti kmenů *Microcoleus vaginatus* (větev B). Oddělení tohoto druhu do zvláštního rodu *Planktothricoides* bylo podle této analýzy plně oprávněné.

Dalším jasně vymezeným rodem je *Symploca*, také patřící do čeledi Phormidiaceae. Dříve byla zahrnována do rodu *Lyngbya* (BOURRELY 1970a, b), později pak od něj byla znovu oddělena (ANAGNOSTIDIS & ROUSSOUMUSTAKAKI, 1985). Sousední větev obsadilo právě několik kmenů *Lyngbya*, dost možné chybně určené.

Ve větvi C se nacházejí ještě *Oscillatoria spongelliae*, symbiont mořské houby *Dysidea* spp. (THACKER & STARNES 2003), a *Oscillatoria corallinae*. Tvoří kompaktní skupinu, která se však nachází mezi větvemi obsazenými čeledi Phormidiaceae. Popis morfologie *Oscillatoria spongelliae* se v publikaci THACKER & STARNES 2003 nevyskytuje, popsána morfologie *Oscillatoria corallinae* (NELISSEN et al. 1996) rozměry buněk neodpovídá modernímu pojetí rodu, tedy členy celé této skupiny jsou určitě chybně pojmenovány a s největší pravděpodobností spadají právě do Phormidiaceae.

Zbývající větve obsadily jasně vymezené rody *Arthrospira*, *Geitlerinema* a skupina zahrnující kmeny *Spirulina* a *Halospirulina*.

Podrobný pohled na získaný fylogenetický strom a na složení použitých sekvencí odhaluje skutečnost, že většina kmenů patří do čeledí Phormidiaceae a Pseudanabaenaceae, zatímco ostatní čeledi (Borziaceae, Homeotrichaceae, Oscillatoriaceae a Schizotrichaceae podle ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1988) nejsou zastoupeny skoro vůbec (těžko říci které z kmenů nesoucích jména rodů těchto čeledí tam skutečně patří; mohly by k nim patřit i některé neurčené kmeny z terénních vzorků, ze kterých byly sice získány sekvence 16S rDNA, nebyla však popsána morfologie). Nápadná je roztroušenost kmenů rodů *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lyngbya* a *Leptolyngbya* (kromě těch s krátkými buňkami) po celém stromu, buď kvůli chybnému určení jednotlivých kmenů anebo z důvodu neodpovídajících taxonomických definicí zmíněných rodů. Příčina asi částečně spočívá v obou skutečnostech.

#### 4.3.2. Analýza fylogenetického stromu vytvořeného metodou Maximum likelihood

Tento fylogenetický strom byl vytvořen ze sekvencí, které zbyly po vyloučení navzájem si velmi podobných sekvencí a po použití jen jednoho zástupce z takových skupin (např. *Microcoleus vaginatus* nebo jasné rody jako je *Arthrospira* atd.). Už zmíněná malá variabilita zakryla však skoro jakékoliv trendy. Čeleď Pseudanabaenaceae tvoří jedinou výraznější skupinu, opět se dvěma podskupinami: jedna kolem rodu *Pseudanabaena*, druhá se zástupci rodu *Leptolyngbya*. Přestože jinak není patrný žádný trend mezi skupinami, většinou se na konci větví sdružují kmeny s velice málo odlišnými sekvencemi a v některých případech jsou podporovány dost vysokými hodnotami bootstrapů (např. *Oscillatoria* sp. CYA 128/R a *Planktothrix rubescens* NIVACYA 1). Před provedením dalších fylogenetických analýz je třeba takové sekvence vyloučit, pak se snad objeví jasnější obraz evolučních vztahů mezi vláknitými sinicemi na úrovni širších taxonomických skupin.

## 5. Závěr

Byla prozkoumána morfologie vybraných kmenů z řádu Oscillatoriales patřících dle předchozího určení do rodů *Oscillatoria* a *Phormidium*. Byla vyizolována jejich DNA a ze dvou kmenů byl získán 16S rDNA PCR produkt. Zjištěné morfologické charakteristiky oddělují zkoumané kmeny do tří různých rodů – kmeny *Phormidium animale*, Growth 1459/-6, *P. animale*, Hindák 1967/39 a *P. animale*, Hindák 1963/108 patří do rodu *Phormidium*, *Oscillatoria sancta* Koch 1970/Gött 74.79 a *Oscillatoria limosa* do rodu *Oscillatoria* a *P. animale*, Klabouchová 1987/1 do rodu *Geitlerinema*. Dále byly shromážděny všechny dostupné sekvence 16S rDNA zástupců Oscillatoriales delší než 1000 bp a z nich byly vytvořeny fylogenetické stromy. Fylogenetickou analýzu však zkomplikovala malá variabilita mezi použitými sekvencemi, nedostupnost morfologických dat o sekvenovaných kmenech a jejich časté nesprávné taxonomické zařazení. Přesto se podařilo definovat několik základních vývojových větví a nastínit jejich taxonomickou validitu.

## 6. Literatura

- AAKERMANN T., SKULBERG O.M. & LIAANENJENSEN S. (1992): Carotenoids of blue-green algae .12. A comparison of the carotenoids of *Oscillatoria* and *Spirulina* (Cyanobacteria) - *Biochemical Systematics and Ecology*, 20 (8): 761-769.
- ABED R.M.M., GARCIA-PICHEL F. & HERNANDEZ-MARINE M. (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 (5): 361-370.
- ANAGNOSTIDIS K. (1989): *Getlerinema*, A New Genus of Oscillatorialen Cyanophytes - *Plant Systematics and Evolution*, 164 (1-4): 33-46.
- ANAGNOSTIDIS K. & PANTAZIDOU A. (1991): *Ammatoidea aegea* (Oscillatoriales), a new marine epilithic species from the Aegean sea, Hellas, with a reference to the validity of the genus *Ammatoidea* - *Archiv für Hydrobiologie/Suppl.* 92: 281-297.
- ANAGNOSTIDIS K. & ROUSSOUMOSTAKAKI M. (1985): On the validity of the genus *Symploca* KÜTZ. ex GOM. - *Archiv für Hydrobiologie/Suppl.* 71, *Algological Studies* 38/39: 221-234.
- ANAGNOSTIDIS K. & ROUSSOUMOSTAKAKI M. (1991): *Isocystis halobia* spec. nova, a benthic nostocalean cyanophyte from the heliothermal saltwork mats of Messolongion, Hellas (Greece) - *Archiv für Hydrobiologie/Suppl.* 92: 299-332.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK. J. (1985): Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 1: Introduction - *Archiv für Hydrobiologie* 71, *Algological Studies*, 38/39: 291-302.
- ANAGNOSTIDIS K. AND J. KOMÁREK (1988): Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 3: Oscillatoriales - *Archiv für Hydrobiologie* 80, *Algological Studies*, 50-53: 327-472.
- ANAGNOSTIDIS K. AND J. KOMÁREK (1990): Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 5: Stigonematales - *Algological Studies*, 59: 1-73.
- ASAYAMA M., KABASAWA M., TAKAHASHI I., AIDA T. & SHIRAI M. (1996): Highly repetitive sequences and characteristics of genomic DNA in unicellular cyanobacterial strains - *FEMS Microbiology Letters*, 137 (2-3): 175-181.
- BAILEYWATTS A.E. & KOMÁREK J. (1991): Towards a formal description of a new species of *Synechococcus* (Cyanobacteria Cyanophyceae) from the fresh-water picoplankton - *Archiv für Hydrobiologie/Suppl.* 88: 5-19.
- BAURAIN D., RENQUIN L., GRUBISIC S., SCHELDAMAN P., BELAY A. & WILMOTTE A. (2002): Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ("*Spirulina*"), (Cyanophyceae, Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year-old dried samples from Africa - *Journal of Phycology*, 38 (2): 384-393.
- BENPORATH J., CARPENTER E.J. & ZEHR J.P. (1993): Genotypic relationships in *Trichodesmium* (Cyanophyceae) based on *nifH* sequence comparisons - *Journal of Phycology*, 29 (6): 806-810.
- BENPORATH J. & ZEHR J.P. (1994): Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes - *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (3): 880-887.
- BERGSLAND K.J. & HASELKORN R. (1991): Evolutionary relationships among Eubacteria, Cyanobacteria and chloroplasts -evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC-7120 - *Journal of Bacteriology*, 173 (11): 3446-3455.

- BHAYA D., DUFRESNE A., VAULOT D. & GROSSMAN A. (2002): Analysis of the *hli* gene family in marine and freshwater cyanobacteria - FEMS Microbiology Letters, 215 (2): 209-219.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA M.D., DE OLIVEIRA M.C. & BOLCH C.J.S. (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 (5): 810-818.
- BOLCH C.J.S., BLACKBURN S.I., NEILAN B.A. & GREWE P.M. (1996): Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions - Journal of Phycology, 32 (3): 445-451.
- BOLCH C.J.S., ORR P.T., JONES G.J. & BLACKBURN S.I. (1999): Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria) - Journal of Phycology, 35 (2): 339-355.
- BOURRELY P. (1970a): *Les algues d'eau douce. III.* - N. Boubée & Cie., Paris. 512 pp.
- BOURRELY P. (1970b): Note sur la famille des Oscillatoiracées. - Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie, 32: 519-522.
- BORNET E. & FLAHAULT C. (1885): Tableau synoptiques des Nostocacées filamenteuses Hétérocystées - Mem. Soc. nat. Sci. Nat. Mat. Cherbourg 25: 195-223.
- BOYER S.L., JOHANSEN J.R., FLECHTNER V.R. & HOWARD G.L. (2002): Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region - Journal of Phycology, 38 (6): 1222-1235.
- CASAMATTA D.A., VIS M.L. & SHEATH R.G. (2003): Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data - Aquatic Botany, 77 (4): 295-309.
- CASTENHOLZ R.W. (1992): Species usage, concept and evolution in the Cyanobacteria (blue-green algae) - Journal of Phycology, 28: 737-745.
- DELWICHE C.F., KUHSEL M. & PALMER J.D. (1995): Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids - Molecular Phylogenetics and Evolution, 4 (2): 110-128.
- DOUGLAS S.E. & TURNER S. (1991): Molecular evidence for the origin of plastids from a Cyanobacterium-like ancestor - Journal of Molecular Evolution, 33 (3): 267-273.
- DROUET F. (1968): Revision of classification of the Oscillatoriaceae - Academy of Natural Sciences Philadelphia, monogr. 15, 370 pp.
- DROUET F. (1973): Revision of the Nostocaceae with cylindrical trichomes (formerly Scytonemataceae and Rivulariaceae) - Hafner Press, New York, 292 pp.
- DROUET F. (1978): Revision of the Nostocaceae with constricted trichomes - Beih. Nova Hedwigia, 57: 1-258.
- DROUET F. (1981): Summary of the classification of blue-green algae - Beih. Nova Hedwigia, 66: 135-209.
- DUFRESNE A., SALANOUBAT M., PARTENSKY F., ARTIGUENAVE F., AXMANN I.M., BARBE V., DUPRAT S., GALPERIN M.Y., KOONIN E.V., LE GALL F., MAKAROVA K.S., OSTROWSKI M., OZTAS S., ROBERT C., ROGOZIN I.B., SCANLAN D.J., TANDEAU DE MARSAL N., WEISSENBACH J., WINCKER P., WOLF Y.I. & HESS W.R. (2003): Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome - Proceedings of National Academy of Sciences. U.S.A., 100 (17): 10020-10025.
- FLECHTNER V.R., BOYER S.L., JOHANSEN J.R. & DENOBLE M.L. (2002): *Spirirestis rafaensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils - Nova Hedwigia, 74 (1-2): 1-24.

- FOX G.E., WISOTZKEY J.D. & JURTSCHUK P. (1992): How close is close - 16S ribosomal-RNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity - *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (1): 166-170.
- GARCIA-PICHEL F., NUBEL U. & MUYZER G. (1998): The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria - *Archives of Microbiology*, 169 (6): 469-482
- GARCIA-PICHEL F., PRUFERT-BEBOUT L & MUYZER G. (1996): Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium - *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9): 3284-3291.
- GEITLER L. (1932): Cyanophyceae. In: Rabenhorst's *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14*, Reprint by Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany. 1196 pp..
- GIOVANNONI S. J., TURNER S., OLSEN G. J., BARNS S., LANE D. J. & AND PACE N. R. (1988): Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts - *Journal of Bacteriology*, 170 (8): 3584-3592.
- GUGGER M., LYRA C., HENRIKSEN P., COUTE A., HUMBERT J.F. & SIVONEN K. (2002): Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon* - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 (5): 1867-1880.
- GUPTA R.S. & GRIFFITHS E. (2002): Critical issues in bacterial phylogeny - *Theoretical Population Biology*, 61 (4): 423-434.
- HENSON B.J., WATSON L.E. & BARNUM S.R.O.V. (2002): Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences - *Current Microbiology*, 45 (3): 161-164.
- HESS W.R., PARTENSKY F., VANDERSTAAY G.W.M., GARCIA-FERNANDEZ J.M., BORNER T. & VAULOT D. (1996): Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll a/b antenna in a marine prokaryote - *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93 (20): 11126-11130.
- HONDA D., YOKOTA A. & SUGIYAMA J. (1999): Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains - *Journal of Molecular Evolution*, 48 (6): 723-739.
- ISHIDA T., WATANABE M.M., SUGIYAMA J. & YOKOTA A. (2001): Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis - *FEMS Microbiology Letters*, 201 (1): 79-82.
- KANEKO T., SATO S., KOTANI H., TANAKA A., ASAMIZU E., NAKAMURA Y., MIYAJIMA N., HIROSAWA M., SUGIURA M., SASAMOTO S., KIMURA T., HOSOUCHI T., MATSUNO A., MURAKI A., NAKAZAKI N., NARUO K., OKUMURA S., SHIMPO S., TAKEUCHI C., WADA T., WATANABE A., YAMADA M., YASUDA M. & TABATA S. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions - *DNA Research*, 3 (3): 109-36.
- KANEKO T., NAKAMURA Y., WOLK C.P., KURITZ T., SASAMOTO S., WATANABE A., IRIGUCHI M., ISHIKAWA A., KAWASHIMA K., KIMURA T., KISHIDA Y., KOHARA M., MATSUMOTO M., MATSUNO A., MURAKI A., NAKAZAKI N., SHIMPO S., SUGIMOTO M., TAKAZAWA M., YAMADA M., YASUDA M. & TABATA S. (2001): Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 - *DNA Research*, 8 (5): 205-213.
- KARSTEN U. & GARCIA-PICHEL F. (1996): Carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds in members of the genus *Microcoleus* (Cyanobacteria): A chemosystematic study - *Systematic and Applied Microbiology*, 19 (3) : 285-294.

- KATO T., WATANABE M.F. & WATANABE M. (1991): Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference - *Archiv für Hydrobiologie. /Suppl.* 92: 129-140.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1986): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2:Chroococcales - *Algological Studies*, 43: 157-226.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4:Nostocales - *Algological Studies* 56: 247-345.
- KOMÁREK J. & ČASLAVSKÁ J. (1991): Thylakoid patterns in Oscillatorian - *Archiv für Hydrobiologie/Suppl.* 92: 267-270.
- KOMAREK J., KOMARKOVA-LEGNEROVA J., SANT'ANNA C.L., AZEVEDO M.T.D. & SENNA P.A.C. (2002): Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M-panniformis* sp. nov. - *Cryptogamie Algologie*, 23 (2): 159-177.
- KOMAREK J. (2003): Two *Camptylonemopsis* species (cyanoprokaryotes) from "Mata Atlantica" in coastal Brazil - *Preslia*, 75 (3): 223-232.
- KOMAREK J. & KAŠTOVSKÝ J. (2003): Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of Cyanobacteria - *Algological Studies*, 109: 305-325.
- KONDO R., YOSHIDA T., YUKI Y. & HIROISHI S. (2000): DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus *Microcystis* - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2): 767-770.
- LEE W.J.& BAE K.S. (2001): The phylogenetic relationship of several oscillatorian cyanobacteria, forming blooms at daecheong reservoirs, based on partial 16S rRNA gene sequences - *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11 (3): 504-507.
- LEE W.J.& BAE K.S. (2002): Inferring the molecular phylogeny of chroococcalian strains (Blue-green algae/Cyanophyta) from the Geumgang River, based on partial sequences of 16S rRNA gene - *Journal of Microbiology*, 40 (4): 335-339.
- LI R.H. & WATANABE M.M. (2001): Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes - *Phytochemistry*, 57 (5): 727-731.
- LI R.H. & WATANABE M.M. (2002): DNA base composition of planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) and its taxonomic value - *Journal of General and Applied Microbiology*, 48 (2): 77-82.
- LITVAITIS M.K. (2002): A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses - *Hydrobiologia*, 468 (1-3): 135-145.
- LU W.Q., EVANS E.H., MCCOLL S.M. & SAUNDERS V.A. (1997): Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region - *FEMS Microbiology Letters*, 153 (1):141-149.
- LYRA C., HANTULA J., VAINIO E., RAPALA J., ROUHIAINEN L. & SIVONEN K. (1997): Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene - *Archives of Microbiology*, 168 (3): 176-184.
- MAGRIN A.G.E., SENNA P.A.C. & KOMAREK J. (1997): *Arthrospira skujae*, a new planktic tropical cyanoprokaryote - *Archiv für Protistenkunde*, 148 (4): 479-489.
- MANEN J.F. & FALQUET J. (2002): The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3): 861-867.
- MARGHERI M.C., BOSCO M., GIOVANNETTI L. & VENTURA S. (1999): Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis - *FEMS Microbiology Letters*, 173 (1): 9-16.

- MARGHERI M.C., PICCARDI R., VENTURA S., VITI C. & GIOVANNETTI L. (2003): Genotypic diversity of oscillatoriacean strains belonging to the genera *Geitlerinema* and *Spirulina* determined by 16S rDNA restriction analysis - *Current Microbiology*, 46 (5): 359-364.
- MAZEL D., HOUMARD J., CASTETS A.M. & DEMARSAC N.T. (1990): Highly repetitive DNA-sequences in cyanobacterial genomes - *Journal of Bacteriology*, 172 (5): 2755-2761.
- MIYASHITA H., IKEMOTO H., KURANO N., MIYACHI S. & CHIHARA M. (2003): *Acaryochloris marina* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria), an oxygenic photosynthetic prokaryote containing chl d as a major pigment - *Journal of phycology*, 39 (6): 1247-1253.
- NAKAMURA Y., KANEKO T., SATO S., IKEUCHI M., KATOH H., SASAMOTO S., WATANABE A., IRIGUCHI M., KAWASHIMA K., KIMURA T., KISHIDA Y., KIYOKAWA C., KOHARA M., MATSUMOTO M., MATSUNO A., NAKAZAKI N., SHIMPO S., SUGIMOTO M., TAKEUCHI C., YAMADA M. & TABATA S. (2002): Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 - *DNA Research*, 9 (4):123-130
- NAKAMURA Y., KANEKO T., SATO S., MIMURO M., MIYASHITA H., TSUCHIYA T., SASAMOTO S., WATANABE A., KAWASHIMA K., KISHIDA Y., KIYOKAWA C., KOHARA M., MATSUMOTO M., MATSUNO A., NAKAZAKI N., SHIMPO S., TAKEUCHI C., YAMADA M. & TABATA S. (2003): Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids (supplement) - *DNA Research*, 10 (4): 181-201.
- NEILAN B.A., HAWKINS P.R., COX P.T. & GOODMAN A.E. (1994): Towards a molecular taxonomy for the bloom-forming Cyanobacteria - *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 45 (5): 869-873.
- NEILAN B.A., JACOBS D., GOODMAN A.E. (1995): Genetic diversity and phylogeny of toxic Cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus - *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11): 3875-3883.
- NEILAN B.A. (1995): Identification and phylogenetic analysis of toxigenic Cyanobacteria by multiplex Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR - *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (6): 2286-2291.
- NEILAN B.A., STUART J.L., GOODMAN A.E., COX P.T. & HAWKINS P.R. (1997): Specific amplification and restriction polymorphisms of the cyanobacterial rRNA operon spacer region - *Systematic and Applied Microbiology*, 20 (4): 612-621.
- NELISSEN B., WILMOTTE A., NEEFS J.M. & DEWACHTER R. (1994): Phylogenetic relationships among filamentous helical Cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal-RNA gene sequence-analysis - *Systematic and Applied Microbiology*, 17 (2): 206-210.
- NELISSEN B., VANDEPEER Y., WILMOTTE A. & DEWACHTER R. (1995): An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S ribosomal-RNA sequences - *Molecular Biology and Evolution*, 12 (6): 1166-1173.
- NELISSEN B., DEBAERE R., WILMOTTE A. & DEWACHTER R. (1996): Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis - *Journal of Molecular Evolution*, 42 (2): 194-200.
- NISHIHARA H., MIWA H., WATANABE M., NAGASHIMA M., YAGI O. & TAKAMURA Y. (1997): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61 (7): 1067-1072.
- NUBEL U., GARCIA-PICHEL F. & MUYZER G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria - *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (8): 3327-3332.
- NUBEL U., GARCIA-PICHEL F. & MUYZER G. (2000): The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of

- Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. - International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(3): 1265-1277.
- PALENIK B., BRAHAMSHA B., LARIMER F.W., LAND M., HAUSER L., CHAIN P., LAMERDIN J., REGALA W., ALLEN E.E., MCCARREN J., PAULSEN I., DUFRESNE A., PARTENSKY F., WEBB E.A. & WATERBURY J. (2003): The genome of a motile marine *Synechococcus* - Nature, 424 (6952): 1037-1042.
- RASMUSSEN U. & SVENNING M.M. (1998): Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences - Applied and Environmental Microbiology, 64 (1): 265-272.
- REKAR S. & HINDAK F. (2002): *Aphanizomenon slovenicum* sp. nov.: morphological and ecological characters of a new cyanophyte/cyanobacterial species from Lake Bled, Slovenia - Annales de Limnologie-International Journal of Limnology, 38 (4): 271-285.
- RIPPKA R. (1988): Recognition and identification of Cyanobacteria - Methods in Enzymology, 167: 28-67.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMANN, M. & STANIER, Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria - Journal of General Microbiology, 111: 1-61.
- ROCAP G., LARIMER F.W., LAMERDIN J., MALFATTI S., CHAIN P., AHLGREN N.A., ARELLANO A., COLEMAN M., HAUSER L., HESS W.R., JOHNSON Z.I., LAND M., LINDELL D., POST A.F., REGALA W., SHAH M., SHAW S.L., STEGLICH C., SULLIVAN M.B., TING C.S., TOLONEN A., WEBB E.A., ZINSER E.R. & CHISHOLM S.W. (2003): Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation - Nature, 424 (6952): 1042-1047.
- ROUHIAINEN L., SIVONEN K., BUIKEMA W.J., HASELKORN R. (1995): Characterization of toxin-producing Cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a Tandemly Repeated Heptamer - Journal of Bacteriology, 177 (20): 6021-6026.
- RUDI K., SKULBERG O.M., LARSEN F. & JAKOBSEN K.S. (1997): Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8 - Applied and Environmental Microbiology, 63 (7): 2593-2599.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. & ERLICH.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA - Science, 239 (4839): 487-491.
- SEO P.S. & YOKOTA A. (2003): The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences.- Journal of General and Applied Microbiology, 49 (3): 191-203.
- SHERIDAN P.P., FREEMAN K.H. & BRENCHELY J.E. (2003): Estimated minimal divergence times of the major bacterial and archaeal phyla - Geomicrobiological Journal, 20 (1): 1-14.
- SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999 pp.
- SCHON A., FINGERHUT C. & HESS W.R. (2002): Conserved and variable domains within divergent RNase P RNA gene sequences of *Prochlorococcus* strains - International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(4): 1383-1389.
- SCHOPF J.W. (1993): Microfossils of early Archean apex chert - New evidence of the antiquity of life - Science, 260 (5108): 640-646.
- STANIER R.Y., KUNISAWA R., MANDEL M. & COHEN-BAZIRE G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales) - Bacteriological Revue, 35: 171-205.
- STANIER R.Y., SISTROM W.R., HANSEN T. A., WHITTON B.A., CASTENHOLZ R.W., PFENNIG N., GORLENKO V.N., KONDRATIEVA E.N., EIMHJELLEN K.E., WHITTENBURY R., GHERNA,

- R.L. & TRUPER H.G. (1978): Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria - International Journal of Systematic Bacteriology, 28: 335-336.
- STULP B.K. & STAM W.T. (1984): Genotypic relationships between strains of *Anabaena* (Cyanophyceae) and their correlation with morphological affinities - British Phycological Journal, 19 (3): 287-301.
- THACKER R.W. & STARNES S. (2003): Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* in marine sponges, *Dysidea* spp. - Marine Biology, 142 (4): 643 - 648.
- TORNABENE T.G., BOURNE T.F., RAZIUDDIN S., BENAMOTZ A. (1985): Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales) - Marine Ecology-Progress Series, 22 (2): 121-125.
- TURNER S., BURGERWIERSMA T., GIOVANNONI S.J., MUR L.R. & PACE N.R. (1989): The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts - Nature, 337 (6205): 380-382.
- TURNER S., PRYER K.M., MIAO V.P.W. & PALMER J.D. (1999): Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis.- Journal of Eukaryotic Microbiology, 46 (4): 327-338.
- TURNER S. (1997): Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria - Plant Systematics and Evolution, Suppl. 117:13-52.
- URBACH E., ROBERTSON D.L. & CHISHOLM S.W. (1992): Multiple evolutionary origins of Prochlorophytes within the cyanobacterial radiation - Nature, 355 (6357): 267-270.
- VANCOPPENOLLE B., MCCOUCH S.R., WATANABE I., HUANG N. & VANHOVE C. (1995): Genetic diversity and phylogeny analysis of *Anabaena azollae* based on RFLPs detected in *Azolla-Anabaena azollae* DNA complexes using *nif* gene probes - Theoretical and Applied Genetics, 91 (4): 589-597.
- VENTER J.C., REMINGTON K., HEIDELBERG J., HALPERN A.L., RUSCH D., EISEN J.A., WU D., PAULSEN I., NELSON K.E., NELSON W., FOUTS D.E., LEVY S., KNAP A.H., LOMAS M.W., NELSON K., WHITE O., PETERSON J., HOFFMAN J., PARSONS R., BADEN-TILLSON H., PFANNKOCHE C., ROGERS Y.-H. & SMITH H.O. (2004): Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea - Science, In press.
- VITI C., VENTURA S., LOTTI E., CAPOLINO E., TOMASELLI L. & GIOVANNETTI L (1997): Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis - Research in Microbiology, 148 (7): 605-611.
- WERNER V.R. & SANT'ANNA C.L. (2000): A new species of *Aphanothece* (Cyanophyceae, Chroococcales) from a shallow coastal lagoon, south Brazil - Nova Hedwigia, 70 (1-2): 113-125.
- WILMOTTE, A. & GOLUBIC, S. (1991): Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria - Archiv für Hydrobiologie/Suppl. 64: 1-24.
- WILMOTTE A., VANDERAUWERA G. & DEWACHTER R. (1993): Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC 7518, and phylogenetic analysis - FEBS Letters, 317 (1-2): 96-100.
- WILMOTTE A. (1994): Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant, D. A. (ed.) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer, Dordrecht. 1-25.
- ZEHR J.P., MELLON M.T. & HIORNS W.D. (1997): Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: Evolutionary implications and potential applications to natural assemblages - Microbiology - UK, 143(4): 1443-1450.

ZWART G., CRUMP B.C., AGTERVELD M.P.K.V., HAGEN F. & HAN S.K. (2002): Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers - *Aquatic Microbial Ecology*, 28 (2): 141-155.