

Masarykova univerzita v Brně

Přírodovědecká fakulta

Ústav botaniky a zoologie

Ontogeneze a fylogeneze vláknitých řas z čeledi Klebsormidiaceae rostoucích v městských
biotopech

Bakalářská práce

2011

Vedoucí práce: RNDr. Bohuslav Uher, Ph.D.

Kateřina Perůtková

„Souhlasím s uložením této bakalářské práce v knihovně Ústavu botaniky a zoologie PřF MU v Brně, případně v jiné knihovně MU, s jejím veřejným půjčováním a využitím pro vědecké, vzdělávací nebo jiné veřejně prospěšné účely, a to za předpokladu, že převzaté informace budou řádně citovány a nebudou využívány komerčně.“

V Brně dne 5. 5. 2011

Kateřina Perůtková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Bohuslavovi Uherovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, ochotu a psychickou podporu při vypracovávání bakalářské práce. V neposlední řadě mu děkuji za poskytnutí potřebných materiálů, prostor pro vypracování práce a cenných rad. Bakalářská práce byla vypracována na Ústavu botaniky a zoologie Masarykovy univerzity.

Upřímné poděkování patří mým rodičům, Haně a Martinovi Perútkovým, kteří mě podporovali jak psychicky tak i finančně po celou dobu mého studia.

Dále chci srdečně poděkovat panu Pravoslavovi Milde za jeho psychickou podporu během psaní této práce.

Náklady spojené s výzkumem této bakalářské práce byly hrazeny z výzkumného záměru č. MSM 0021622416, se kterým tento výzkum souvisel.

ABSTRAKT

Vláknitá řasa rodu *Klebsormidium* patří mezi kosmopolitně rozšířené druhy. Její zástupci představují jednu z hlavních složek aerofytických synuzií městských biotopů. Obývá rozmanité substráty jako je půda, kámen, beton i sladká voda. Klasifikace rodu *Klebsormidium* je založena plně na morfologii, velmi málo je objasněná fylogeneze jednotlivých druhů. Cílem bylo zefektivnit kultivaci vláknitých řas rodu *Klebsormidium* a zjistit jejich jednotlivá ontogenetická stádia v laboratorních podmínkách, t.j. navození a pozorování rozmnožovacího procesu a výsledná rekonstrukce životního cyklu.

Klíčová slova: vláknité řasy, *Klebsormidium*, kultivace řas, Klebsormidiophyceae, fylogeneze, ontogeneze, městské biotopy

ABSTRAKT

Filamentous algae of the genus *Klebsormidium* belong to cosmopolitan widespread species. This taxon is one of the main component of aerophytic synusia in urban habitats. The representatives of genus *Klebsormidium* inhabit various substrates like soil, stone, concrete and freshwater habitats. Classification of the genus *Klebsormidium* is based entirely on morphology, phylogeny is rarely explained. The aim was to increase the efficiency of cultivation of filamentous algae of the genus *Klebsormidium* and to know their ontogeny in laboratory condition. This means induction and observation of reproductive process and the resulting reconstruction of the life cycle.

Keywords: filamentous algae, *Klebsormidium*, cultivation of algae, Klebsormidiophyceae, phylogeny, ontogeny, urban habitats

Obsah

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Úvod a cíle práce | 1 |
| 1.1. | Úvod | 1 |
| 1.2. | Cíle práce | 2 |
| 2. | Obecná charakteristika | 3 |
| 3. | Molekulární fylogeneze-polyfázický přístup | 6 |
| 3.1. | Metody | 6 |
| 3.2. | Výsledky molekulárních analýz | 6 |
| 4. | Ekologie a autekologie | 8 |
| 5. | Materiál a metodika | 10 |
| 5.1. | Odběr vzorků | 10 |
| 5.2. | Laboratorní kultivace | 11 |
| 5.2.1. | Příprava média | 11 |
| 5.2.2. | Očkování a kultivace | 12 |
| 5.3. | Obrazová analýza | 12 |
| 6. | Výsledky a diskuse | 13 |
| 6.1. | Kultivace zástupců rodu <i>Klebsormidium</i> | 13 |
| 6.2. | Výsledky obrazové analýzy | 14 |
| 6.2.1. | Morfologie | 14 |
| 6.2.2. | Morfometrie | 15 |
| 6.3. | Ontogeneze | 16 |
| 7. | Závěr | 20 |
| 8. | Seznam literatury | 21 |

1. Úvod a cíle práce

1.1. Úvod

Řasy spolu se sinicemi jsou nejjednodušší autotrofní organismy, které se řadí na začátek rostlinného systému a zároveň se považují za centrum vývoje vyšších rostlin a snad i části živočichů. Předmětem jejich studia je objasnění zákonitostí nejen evoluce rostlinných organismů a pochopení rostlinné říše jako celku. S bakteriemi a houbami patří mezi nejvíce rozšířené organismy v přírodě a významně zasahují do biochemických cyklů v prostředí, kde se vyskytují (Fott 1956).

Řasy mají širokou škálu využití. V přímořských státech slouží jako potrava a krmivo. Získávají se z nich některé důležité látky, jako je agar, karagen, algináty, sloučeniny jodu a mnohé další. Sladkovodní řasy se využívají k výrobě farmaceutických přípravků, které naše tělo obohacují o vitamíny a minerální látky. Zástupce řas známe jako testovací organismy v genetice, toxikologii a alergologii (Pouličková a Jurčák 2001).

Významné postavení mají i v potravním řetězci. Jsou nedílnou součástí vodních společenstev, jako je plankton, fytobentos a litorál. Stejně tak je nalezneme i v terestrickém prostředí, jak na přírodních, tak na umělých substrátech. Kromě kůry stromů, půdy a kamene tvoří nárosty na budovách, kašnách a betonových zídkách. Tyto organismy osidlují i extrémní biotopy s nedostatkem kyslíku, světla, velkým obsahem síry nebo s mimořádně vysokými a nízkými teplotami. Řasy jsou často prvními kolonizátory těchto nehostinných míst a vytvářejí zde první ekosystémy. Budují příznivé prostředí a zpřístupňují dané lokality jiným organismům, jako jsou ostatní mikroorganismy nebo vyšší rostliny (Ettl 1978).

Nemůžeme mluvit pouze o pozitivním vlivu řas, co se týče staveb a budov, které osidlují, označují se za biodeteriogeny (Krumbein a Urzi 1992). Neexistuje žádná přesná definice pro to, co biodeteriogen je. Takto označené organismy obvykle obývají umělé povrchy staveb a svou vedlejší aktivitou přispívají ke kloběhu částic. Tím způsobují výraznou destrukci a degradaci stavebního materiálu (Winkler 1994).

Studium biodeteriorace a procesů s ní spojených je velmi důležité pro zachování a ochranu kulturních památek. Řasy a sinice tvoří na jejich povrchu biofilm, který může mít rozmanité zabarvení (zelené, modré, černé, oranžové a červené). Tyto kolonie svou aktivitou mění vlastnosti substrátu, na kterém se vyskytují. Jejich činnost je velmi významná při zvětvávání povrchů a následky se dají srovnat s působením mechanických nebo chemických vlivů (Uher 2010).

Rod *Klebsormidium* je jedním z nejvíce zastoupených v městských biopotech (Büdel 1999, John 2002, Darienko a Hoffmann 2003, Uher et al. 2005). Jako ostatní vláknité řasy má složitou monenklaturu a taxonomii (Rindi et al. 2008). Jméno *Klebsormidium* bylo zavedeno Silva et al. (1972) pro vyřešení taxonomických nejasností vláknitých řas z rodu *Hormidium* (Lokhorst 1996). V současné době rod zahrnuje asi 22 druhů, je to pouze předběžný odhad, protože není jasné, zda se jedná o druhy nebo o poddruhy. Otázkou je, zda by mělo být více taxonů považováno za samostatné druhy nebo formy jiných druhů (Ettl a Gärtner 1995, Lokhorst 1996, John 2002, Škaloud 2006).

1.2. Cíle práce

1. Vypracovat rešerši týkající se současného polyfásického studia vláknitých řas rodu *Klebsormidium* (ontogeneze a molekulární fylogeneze).
2. Zjistit životní cyklus zástupců rodu *Klebsormidium* z přírodního materiálu a jednodruhových izolátů z městských biotopů.

2. Obecná charakteristika

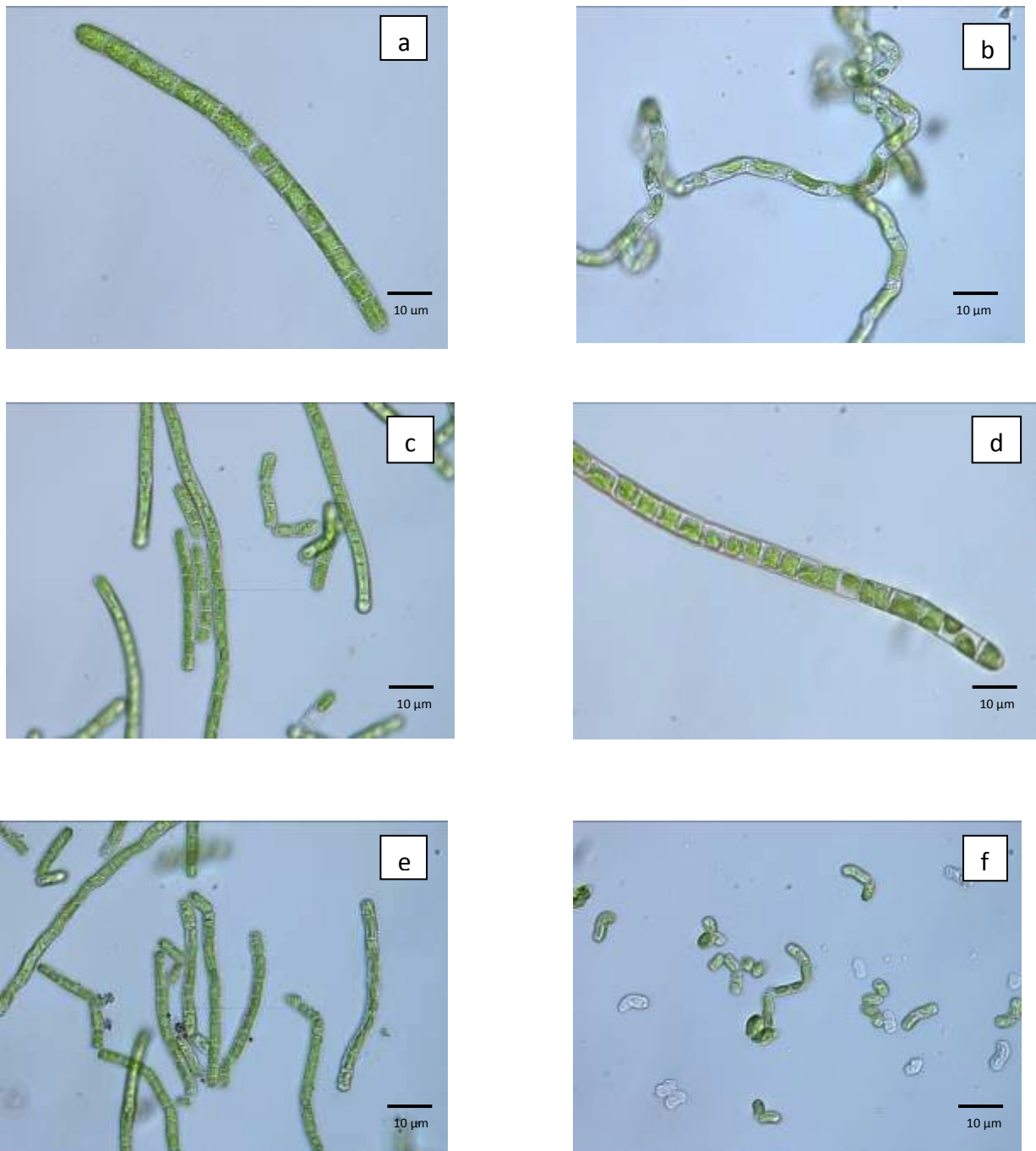
Vláknitá řasa rodu *Klebsormidium* patří do oddělení Charophyta, třídy Klebsormidiophyceae, řádu Klebsormidiales. Jedná se o kosmopolitně rozšířený rod, který se vyskytuje jak na přírodních, tak na umělých podkladech. Obývá terestrické, aero-terestrické i vodní prostředí, mnohdy přežívá v biotopech s extrémními biologickými, fyzikálními nebo chemickými podmínkami (Lokhorst 1996, Pouličková et al. 2001, Elster et al. 2002, Škaloud 2006, Rindi 2007, Sluiman et al. 2008). Vlákna jsou nevětvená s absencí slizových obalů. Na buňkách se mohou objevovat slizové terčíky, které pomáhají vláknu přichytit se k podkladu (Škaloud 2004). Vlákna tvoří nerozlišené, tenkostěnné buňky, které obsahují jeden parietální nebo diskovitý chloroplast, ten pokrývá méně než polovinu buněčného obvodu (Elster et al. 2007). U rodu *Klebsormidium* se vyskytuje fotosyntéza rostlinného typu. Fotosyntetická barviva jsou chlorofyl a+b, α -, β -karotenoidy a několik typů xantofylů (lutein, zeaxantin, violaxantin, anteraxantin a neoxantin). Zbarvení chloroplastů je jasně zelené. Tyto fotosyntetické organely vznikly procesem endosymbiózy sinic již před 2 miliony let (Kalina 2001). Součástí chloroplastu je pyrenoid, ve kterém je uložen aktivní enzym 1, 5-ribulózo bisfosfát karboxyláza/oxidáza (RuBisCo), který se účastní při fixaci CO₂ v temnostní fázi fotosyntézy. Během buněčného dělení postupně pyrenoid degeneruje a vytváří se až po ukončení dělení v dceřiných buňkách. Mitóza je otevřená, rozdělení dceřiných protoplastů zajišťuje tzv. dělicí rýha. V příčných přehrádkách se nevyskytují plasmodesmy. Hlavní zásobní látkou je škrob (α -1, 4-glukan), který je v buňce uložený v chloroplastech (stromatický škrob) nebo v pyrenoidech (pyrenoidový škrob). Rozmnožování u tohoto rodu probíhá dělením buněk, fragmentací vláken nebo pomocí zoospor. K rozlamování vláken (fragmentaci) dochází velmi snadno a je to nejjednodušší způsob rozmnožování u rodu *Klebsormidium*. Po fragmentaci zůstanou na koncích vláken zbytky buněčné stěny, které připomínají písmeno H. Ke vzniku zoospor může dojít v každé buňce vlákna. Ven se uvolní kruhovým otvorem (okénkem) nebo prasklinou v buněčné stěně. Zoospora je asymetrická a mírně zploštělá. Pohyb je zajištěn dvojicí asymetrických bičíků, které obsahují MLS-systém (mnohovrstevná struktura) (Kalina a Váňa 2005). U druhu *K. marinum* nebyla zatím zoosporulace prokázána. Zato druh *Klebsormidium flaccidum* vytváří zoosporu nejnádhleji ze všech druhů rodu *Klebsormidium*. Kromě zoospor se mohou vytvářet i nepohyblivé aplanosporu, které klíčí často přímo v aplanosporangiu (Škaloud 2004). Sexuální rozmnožování bylo popsáno pouze jednou (izogamie) a není více probádáno (Wille 1921).

Podle morfologických znaků je těžké mezi sebou rozlišit jednotlivé druhy rodu *Klebsormidium*, většina evropských vzorků se podle určovacích klíčů řadí do druhu

Klebsormidium flaccidum (Printz 1964, Ramanathan 1964, Ettl a Gärtner 1995, Lokhorst 1996, Rifón-Lastra a Noguerol-Seoane 2001, John 2002). Vymezení tohoto druhu však není jasné, je označován za polymorfní (Ramanathan 1964, Farooqui 1968, Ettl a Gärtner 1995). V minulosti došlo k popsání nových taxonů, přitom se mohlo jednat o různé formy druhu *Klebsormidium flaccidum*. Zvláště zavádějící je rozčlenění na základě šířky vláken. Proto se v dnešní době považuje za směrodatnou molekulární analýza vzorků a od určování na základě morfologických znaků se upouští. Jednoduchá morfologie rodu *Klebsormidium* totiž neodráží veškeré fylogenetické rozmanitosti (Rindi et al. 2008). Některé druhy jsou natolik odlišné a typické svými morfologickými znaky (hodně široká vlákna, odlišný struktura buněčných stěn), že se podle nich dají s velkou pravděpodobností správně určit, ale i přesto se toto musí potvrdit molekulární analýzou. Definice druhů v celém rodu *Klebsormidium* bude muset být přehodnocena. Například *Klebsormidium elegans* a *Klebsormidium bilatum* (Lokhorst 1996) mají shodné rbcL a ITS sekvence, proto je sporné, zda se tyto dva druhy nemají považovat za jeden shodný. Současná fylogeneze ukazuje, že se v Evropě vyskytují alespoň čtyři různé linie rodu *Klebsormidium*, ale zatím není určeno jejich mezidruhové vymezení. Je potřeba provést více analýz dalších evropských vzorků, aby se mohly objasnit vztahy uvnitř fylogenetických stromů (Rindi et al. 2008).

Tabulka 1: Přehled doposud známých druhů rodu *Klebsormidium*

| druh | publikace | šířka buňky | výskyt | biotop |
|---|---------------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| <i>Klebsormidium acidophilum</i> | Novis (2006) | 5-9 µm | Nový Zéland, Evropa | vodní |
| <i>Klebsormidium bilatum</i> | Lokhorst (1996) | 6-9 µm | | vodní |
| <i>Klebsormidium catenatum</i> | Guiry (1996) | | Velká Británie | vodní |
| <i>Klebsormidium crenulatum</i> | Lokhorst (1985) | 9-18 µm | západní, centrální Evropa | suchozemský |
| <i>Klebsormidium dissectum</i> | Ettl, Gärtner (1995) | 7,5-10 µm | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium drouertii</i> | Wagner, Zaneveld (1988) | | | suchozemský |
| <i>Klebsormidium elegans</i> | Lokhorst (1996) | 5-9 µm | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium flaccidum</i> | Silva, Mattox, Blackwell (1972) | 5-8 µm | kosmopolitní | suchozemský |
| <i>Klebsormidium fluitans</i> | Lokhorst (1996) | 6,5-9 µm | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium fragile</i> | Wagner, Zaneveld (1988) | | | suchozemský |
| <i>Klebsormidium lamellosum</i> | Wei, Hu (1984) | | Čína | vodní |
| <i>Klebsormidium marinum</i> | Silva, Mattox, Blackwell (1972) | 3 µm | | vodní |
| <i>Klebsormidium montanum</i> | Watanabe (1983) | | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium mucosum</i> | Lokhorst (1985) | 12-20 µm | západní Evropa | vodní |
| <i>Klebsormidium nitens</i> (syn. <i>Klebsii</i>) | Lokhorst (1996) | 5-10 µm | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium pseudostichococcus</i> | Ettl, Gärtner (1995) | | Evropa | vodní |
| <i>Klebsormidium rivulare</i> | Morison, Sheath (1985) | 4-11 µm | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium scopulinum</i> | Ettl, Gärtner (1995) | 5-7 µm | Evropa, Asie | vodní |
| <i>Klebsormidium sterile</i> | Silva, Mattox, Blackwell (1972) | | | vodní |
| <i>Klebsormidium subtilissimum</i> (syn. <i>subtile</i>) | Silva, Mattox, Blackwell (1972) | 4-8 µm | kosmopolitní | vodní |
| <i>Klebsormidium tribonematoideum</i> | Hindák (1996) | | | vodní |



Obr. č. 1: Druhy rodu *Klebsormidium* ze sbírky mikroorganismů Culture Collection of Algae v Gottingenu (orig. K. Perůtková) (a) *Klebsormidium bilatum*, (b) *Klebsormidium elegans*, (c) *Klebsormidium flaccidum*, (d) *Klebsormidium fluitans*, (e) *Klebsormidium nitens*, (f) *Klebsormidium subtilissimum*.

3. Molekulární fylogeneze-polyfázický přístup

3.1. Metody

Izolace DNA se provádí pomocí kitu NucleoSpin (Macherey-nagel). Přítomnost DNA se ověřuje na agarovém gelu. Úsek malé ribozomální podjednotky 5S rRNA, 18S rRNA nebo 25S rRNA se amplifikují PRC pomocí primerů 5'-3' CTGGTTGATC CTGCCAGTAG (Oligo 1) a 5'-3' GTGAACCTGC AGAAGGATCA (Oligo 2), dizajnovaných z konzervativních oblastí daných genů. Výsledky se porovnávají s dosud známými sekvencemi z GenBank u rodu *Klebsormidium* (Šramková et al. 2006). Fylogenetické analýzy se dají provádět také na ITS a rbcL sekvencích. Analýzy je třeba dělat vždy na více sekvencích, protože 5S rRNA a 18S rRNA jsou dost malé na to, aby se z jejich výsledků daly vyvozovat nějaké závěry. Popřípadě se tyto informace musí doplnit jinými údaji (Wilcox et al. 1993).

3.2. Výsledky molekulárních analýz

Podle všech dosavadních výsledků je zjištěno, že Charophyta jsou vývojově úzce spojena s vyššími rostlinami. Jejich genomy jsou z části shodné. Samotný rod *Klebsormidium* se odštěpil zároveň s rodem *Coleochaete* a vytvořil s ním jednu vývojovou větev, namísto dvou samostatných pro oba rody. Vývojová větev vedoucí k těmto rodům je kratší než u jiných, to vyjadřuje, že se vyvíjely pomaleji (Wilcox et al. 1993).

Podle nejnovějších studií je rod *Klebsormidium* rozdělen do šesti kládů (B, C, D, E, F, G), klád A obsahuje rod *Interfilum*, který je s rodem *Klebsormidium* úzce spjat. Klády B a C mezi sebou mají sesterský vztah, který byl potvrzen i ITS a rbcL analýzou (obr. 2). Klád B je složen z neidentifikovatelných zástupců rodu *Klebsormidium*, které pocházely především z měst východní Evropy. Tito zástupci měli podobnou morfologii jako *Klebsormidium flaccidum*, ale jejich chloroplasty vypadaly odlišně. Klád C zahrnuje *Klebsormidium flaccidum* získané ze sbírky kultur a vyizolované z různých míst západní Evropy. Klády D a E byly opět uznány za sesterské. D se skládá z kmenů identifikovaných jako *K. bilatum* a *K. elegans*. E je heterogenní, obsahuje kmeny s rozdílnou morfologií, z různých stanovišť a regionů. Tento klád měl velmi omezené rozlišení v ITS analýzách, lepší výsledky byly získány z rbcL analýz. Klád E je rozdělen do šesti podskupin. E₁ obsahuje *K. fluitans*, *K. nitens*, *K. scropulinum*, *K. acidophilum*. E₂ zahrnuje *K. nitens*, *K. flaccidum*, *K. dissectum*. Součástí E₃ jsou druhy *K. flaccidum* a *K. fluitans*. V E₆ je obsaženo *K. subtilissimum*. Klád F

je tvořen dvěma dobře morfologicky charakterizovatelnými druhy a to *K. crenulatum* a *K. mucosum*. Podle ITS analýz je klád F sesterskou větví ke kládu G. Toto ale rbcL analýzy nepotvrdily, proto je jejich vztah dosud neobjasněn (Rindi et al. 2011).



Obr. č. 2: Vzájemné fylogenetické vztahy druhů rodu *Klebsormidium* vyplývající z rbcL analýzy (orig. F. Rindi et al.)

4. Ekologie a autekologie

Řasy rodu *Klebsormidium* jsou schopné růst na rozmanitých substrátech a v různých ekologických podmínkách. Druhy tohoto rodu jsou rozšířeny po celém světě. Nejvíce jsou zastoupeny v aero-terestrickém, terestrickém a aquatickém prostředí. Rod *Klebsormidium* je častým kolonizátorem městských oblastí, nečiní mu tedy problém se přizpůsobovat novým ekologickým podmínkám (Lokhorst 1996, Pouličková et al. 2001, Elster 2002, Škaloud 2006, Rindi 2007, Sluiman et al. 2008). Výskyt řas limitují tři hlavní faktory, je to vlhkost, ozáření a pH. Tento druh toleruje různou míru vlhkosti. Dokáže přežívat v suchých podmínkách, ale zároveň se vyskytuje ve vodním prostředí. Nevadí mu ani velké výkyvy a nepravidelný přísun vody.

Důležitá je i intenzita ozáření ($W.m^{-2}$), přesto že *Klebsormidium* využívá sluneční energii k fotosyntéze, velká míra UV záření může být fatální a vést k destrukci buněčných struktur. Proto se *Klebsormidium* nejčastěji nachází na stinných stanovištích.

Posledním limitujícím faktorem je hodnota pH. *Klebsormidium* toleruje poměrně velké výkyvy. Vyskytuje se na stanovištích s hodnotami pH od 3,5 až 9. Mezní hodnotu představuje pH 12, v takových podmínkách nejsou schopny přežít žádné rody řas. V roce 2004 byl objeven druh *Klebsormidium acidophilum*, který žije ve velmi kyselém prostředí o pH menším než 3. Tento druh byl nalezen v důlních vodách na jihu Nového Zélandu (Novis 2006).

Typická pro rod *Klebsormidium* je i rezistence vůči extrémním teplotám. Autoři (Elster et al. 2008) uvádějí, že vzorky tohoto rodu pocházející z různých biotopů a odlišných zeměpisných pásem (střední Evropa, Arktida), se chovají při teplotním stresu stejně, i přestože jsou zvyklé na jiné životní podmínky. Bylo zjištěno, že tyto vláknité řasy jsou schopné bez větších obtíží tolerovat teploty $-40^{\circ}C$. Někteří zástupci dokážou přežít v rozmezí teplot $-196^{\circ}C$ (Cameron a Blank 1966) až $113^{\circ}C$ (Booth 1946). Druhy rodu *Klebsormidium* jsou tedy schopné přežít zamrzání, ale i vysoké teploty, až okolo bodu varu.

Substráty, kde se tyto řasy vyskytují, jsou také velmi rozmanité. Mohou to být podklady přírodního charakteru (kámen, dřevo, půda) nebo umělého charakteru (stavební materiály a jiné). Kameny, které rod *Klebsormidium* nejčastěji osídluje, obsahují uhličitany a ve větším zastoupení kalcit (Uher et al. 2005). Mezi nejméně kolonizované druhy kamenů patří mramor a granodiorit, což je dané jejich strukturou a chemickým složením (Darienka a Hoffmann 2003).

Dalším druhem substrátu je dřevo a kůra stromů. Řasy si vybírají stanoviště podle fyzikálních podmínek, konkrétní druh hostitele většinou nehraje velkou roli. Různé nerovnosti a pukliny v kůře stromů nebo ve dřevě vytváří mikroklima a řasy jsou zde chráněné před

vnějšími nepříznivými vlivy a zároveň se na těchto místech zadržuje vlhkost, což řasám rodu *Klebsormidium* vyhovuje (Good a Chapman 1978). *Klebsormidium* je součástí společenstva *Prasioletum crispae*, které je v kontinentálním podnebí Evropy málo zastoupené. Toto společenstvo tvoří na kůře stromů sametové povlaky se střídajícími se vlhkými a suchými místy. Hlavními zástupci jsou *Prasiola crispa* a právě *Klebsormidium flaccidum*.

Klebsormidium je také součástí společenstva řas v půdě, to je nejpočetnější na povrchu, kde můžeme pozorovat zelené nárosty. Řasy se nacházejí i pod povrchem půdy, ale většinou pouze do hloubky, kde jsou schopné využívat prostupující světlo k fotosyntéze. V hlubších vrstvách se vyskytují nejvíce klidová stádia, která nejsou metabolicky aktivní nebo druhy řas, u kterých byla prokázána chemoheterotrofní výživa (Metting 1981). Řasy plní v půdním ekosystému několik důležitých rolí. Zlepšují přístupnost dusíku v půdě, udržují vlhkost a tím podporují růst vyšších rostlin (Booth 1941). Další nepostradatelnou funkcí řas je uvolňování živin z nerospustných sloučenin a tvorba půdy z organické hmoty (Aristovskaya et al. 1969, Smith et al. 1978). *Klebsormidium* dominuje na kyselých půdách, ale výjimkou není ani výskyt na neutrálních a alkalických půdách.

Rod *Klebsormidium* tvoří své kolonie i na umělých substrátech. Předmětem zkoumání je jejich výskyt hlavně na budovách. Vlákňité řasy neobývají jen stavební památky a historické budovy, objevují se i na novostavbách. Obecně lze říci, že se řasy vyskytují na místech, kde je na nějaký čas zadržována voda (římasy a okapy). Vlákna řas rostou jak na povrchu stavebního materiálu, tak v jeho pórech (Uher 2010). Stejně jako u kůry stromů se v nerovnostech zadržuje vlhkost, to tvoří ideální podmínky pro výskyt řas. Tento rod je tedy rozptýlen nejčastěji na vlhkých a stinných stanovištích. Řasovými nárosty jsou v největší míře zasaženy objekty orientované na sever. Nejvíce vyhovujícím substrátem pro řasy rodu *Klebsormidium* je beton a starší vlhké omítky s pH okolo 7 (Steuer 2008).

5. Materiál a metodika

5.1. Odběr vzorků

Vzorky jsem odebírala ve městě Brně a v Prostějově v období od srpna 2010 do ledna 2011. Kameny s nárosty jsem sbírala na šesti lokalitách. Tři z toho jsou na území města Brna. První lokalita je situovaná v městské části Žabovřesky, jedná se o mateřskou školku na ulici Poznaňská číslo popisné 2568/6 (49°13'4.605"N, 16°34'48.89"E). Vzorky jsem odebrala z betonové zídky orientované na západ. Místo druhého odběru se nachází v téže městské části, v areálu Biofyzikálního ústavu akademie věd, sídlící na ulici Královopolské 2590/135 (49°13'16.196"N, 16°34'44.316"E). Nárosty zde byly opět na betonové zídce plotu, která byla v tomto případě směřována na jihozápad. Poslední lokalitou v Brně byla betonová konstrukce nadchodu na křižovatce ulic Zvonařka a Plotní, položená východním směrem (49°11'13.599"N, 16°37'1.519"E). Brno je centrem Jihomoravského kraje a rozkládá se na soutoku řek Svratky a Svitavy. Jižní část Brna zasahuje do nížin Dyjskosvrateckého úvalu. Z ostatních stran je Brno obklopeno kopci, kde se nachází i nejvyšší bod Kopeček. Město je položeno v nadmořské výšce v rozmezí 190–479 m. Průměrná roční teplota je 8,4 °C a roční úhrn srážek 509 mm.

Místem prvních dvou odběrů v Prostějově byla ulice Partyzánská číslo popisné 3738/20. Jeden vzorek pocházel z betonové zídky plotu situované severním směrem. Druhý byl odebrán z východní stěny sousedící s příjezdovou cestou k domu (49°28'31.942"N, 17°6'45.534"E). Třetí odběr jsem prováděla na křižovatce ulic Havlíčkova a Šafaříkova (49°28'35.544"N, 17°6'50.968"E). Jedná se o vstupní schody rohového domu položené severovýchodně. Město Prostějov se nachází na západním okraji roviny Hané, na severu navazuje na Hornomoravský úval a na východ je položena Dražanská vrchovina. Okraj města lemují říčky Hloučela a Romže. Prostějov se rozkládá v nadmořské výšce 225 m. Průměrná roční teplota činí 6,9°C, úhrn srážek 606 mm.

Vizuální detekci jsem vyhledala na budovách nárosty trávově zelené barvy, které značí výskyt vláknitých řas rodu *Klebsormidium*. Vzorky jsem odebírala vždy 10 až 15 cm od země. Ze všech lokalit jsem vzala úlomky substrátu s nárostem, popřípadě nárosty seškrábala pomocí sterilní laboratorní jehly do plastických sáčků. Na každém vzorku nesmí chybět označení lokality odběru, data odběru, základních mikroklimatických podmínek a čísla vzorku.



Obr. č. 3: Odběrové lokality (orig. K. Perútková) (a) zídka na ulici Partyzánská, (b) schody na ulici Havlíčkova, (c) detail zídky z ulice Partyzánská, (d) detail z ulice Havlíčkova.

5.2. Laboratorní kultivace

5.2.1. Příprava média

Pro kultivaci jsem používala médium BBM (Bold's Basal Medium), které je vhodné pro terestrické sinice a řasy jako je *Klebsormidium* a další jiné, například *Chlamydomonas*, *Heterococcus*, *Colacium*. Substrát pro kultivaci jsem si připravovala v Erlenmeyerově baňce tak, že do 250 ml BBM média jsem přisypala 15 g agarů a dobře rozmíchala. Tekutinu je potřeba povařit, nejjednodušším způsobem je mikrovlnná trouba, která zajistí i sterilizaci média, je lepší médium povařit vícekrát po sobě. Výhodou oproti jiným druhům sterilizace je to, že je velmi efektivní a zároveň není toxická. Uvádí se, že v 1-1,5 litru mořské vody vymřou během 5 minut veškeré řasy, během 8 minut bakterie a za 10 minut houby (Keller et al. 1988). Takto připravené médium jsem dále rozlévala do Petriho misek. Tento krok jsem prováděla ve flowboxu, kvůli omezení kontaminace média. Jakmile médium zchladlo, dalo se použít pro očkování.

5.2.2. Očkování a kultivace

Před očkováním je nutné, aby každá miska popřípadě zkumavka byla správně označena místem nálezu, datem a číslem vzorku. První kultivaci jsme prováděla tak, že jsem celý kámen ponořila do agarů v Petriho miskách nebo jsem na agar nasypala vzorky seškrábané omítky s nárůstem řas. Řasy se postupně z přírodního substrátu rozrůstaly na médium. Očkování a práce s kulturami musí probíhat ve sterilním prostředí, místnost by neměla být prašná a neměl by zde být průvan. Je to jeden z faktorů, který eliminuje kontaminaci spory. Všechny úkony jsem prováděla ve flowboxu, který jsem hodinu před očkováním nechala vysterilizovat UV zářením. Další kultivace jsem dělala tak, že jsem si z prvních kultur vybrala jednotlivé kolonie rodu *Klebsormidium* a ty jsem naočkovala do nových Petriho misek. To jsem prováděla plastikovou nebo kovovou kličkou. Plastiková klička je určena na jedno použití, takže se nemusí sterilizovat. Kovovou jsem vždy sterilizovala pomocí plamene a denaturovaného 98% etylalkoholu. Postupným přeočkováváním jsem získala čisté kultury. Kultury byly očkované do malých (průměr 6 cm) nebo velkých (průměr 12 cm) plastových Petriho misek. Řasy byly kultivovány v pokojové teplotě v rozmezí 20-22 °C. Kultury byly udržovány na fluorescentním světle s dodržováním denního cyklu (12 hodin světlo, 12 hodin tma).

5.3. Obrazová analýza

Fotografickou dokumentaci jednotlivých stádií jsem vytvořila pomocí mikroskopu Olympus BX 50 s Nomarského kontrastem, který je vybavený obrazovou analýzou LUCIA a NIS Elements AR 2.30 CZ. Oba tyto systémy obrazové analýzy jsou určeny k sledování, snímání, archivaci a ručnímu nebo automatizovanému měření preparátů. Systém je tvořen optickým přístrojem (mikroskopem), kamerou nebo digitálním fotoaparátem, počítačem a softwarovým vybavením.

6. Výsledky a diskuse

6.1. Kultivace zástupců rodu *Klebsormidium*

Kultivace je zdlouhavá a časově náročná činnost. Po naočkování řas se první kolonie vytvářely po 7-14 dnech. Dospělá vlákna jsem pozorovala v kulturách přibližně po 3 týdnech. V letním období byl růst pomalejší, v některých kulturách se růst téměř zastavil. Mnohé kultury, které byly naočkovány v srpnu, začaly aktivněji růst až po 4-6 týdnech na začátku podzimu. V zimních měsících byl růst nejrychlejší a vlákna nejvitálnější. V místnosti kde byly kultury uchovávány se udržovala stabilní teplota, jediným odlišným faktorem bylo zkracování dne v zimních měsících. To se zřejmě projevilo na růstu, i přesto že byly kultury dosvécovány umělým světlem. Snažila jsem se najít co nejefektivnější metody při kultivaci. Zkoušela jsem různé způsoby očkovaní a kultivace. Používala jsem agar s různou hustotou. První kultivaci jsem prováděla dvěma odlišnými způsoby. V prvním případě jsem do misek s agarem ponořila celé úlomky betonu s nárostem. Druhý způsob očkovaní spočíval v tom, že jsem nasypala na agar seškrábané vzorky. V miskách se zanořenými kameny se začaly nárosty tvořit dříve než v miskách, kde byl seškrab na povrchu agaru. Tento výsledek souvisí s mým dalším pozorováním, kdy jsem řasy kultivovala na různě hustém médiu. Pokud bylo médium pevné a husté, řasy na něm hůře rostly, ačkoliv pro manipulaci a práci je to praktičtější. Nejlepší výsledky jsem zaznamenala na polotekutém médiu (0,5% agar). To vysvětluje zjištění, že pokud je médium moc tuhé vytvoří se na povrchu neprostupná vrstva a řasy na něm kultivované nejsou schopny z média čerpat živiny, to má za následek sníženou schopnost růstu těchto organismů. Řešením je řidší médium nebo odlišný způsob očkovaní. Očkovaní se provádí tak, že se klička vede po povrchu média. Když se ale klička s řasami dostane při očkovaní hlouběji do agaru pod jeho povrch, usnadní se tak rozrůstání mikroorganismů a umožní jim to plně využívat živiny média. Autoři Preisig a Andersen (2005) zmiňují, že pro očkovaní vláknitých řas je vhodnější penetrovat agar očkovací jehlou. Vlákna jsou vitálnější a jejich růst je rychlejší, protože mohou plně čerpat živiny. Proto jsem i při první kultivaci zaznamenala rychlejší růst u vzorků, které obsahovaly zanořený kámen, dá se to považovat za analogii penetrace agaru při očkovaní. Tím, že je kámen z části přímo uvnitř kultivačního média, řasy nemusejí překonávat bariéru, kterou vytváří svrchní vrstva agaru, jako tomu bylo v případě Petriho misek se seškrabem na povrchu. Nejefektivnějších výsledků při kultivaci jsem tedy dosáhla použitím polotekutého média a očkovaním penetrací do agaru.

V odebraných vzorcích byly i jiné organismy, které žijí ve stejných podmínkách a na stejných substrátech jako rod *Klebsormidium*. Při první kultivaci se tedy vytvořily kolonie i těchto mikroorganismů, postupnou selekcí a přeočkováním jsem se snažila jejich výskyt v kulturách eliminovat. Nejčastějšími spolukolonizátory kamene, betonu a jiných stavebních materiálů byly rody vláknitých i kokálních sinic (*Chroococciopsis*, *Leptolyngbya*, *Nostoc*, *Phormidium*), zelených řas (*Chlorella*, *Botrydiopsis*, *Desmococcus*, *Stichococcus*), rozsivek (*Navicula*, *Luticola*), mechů, hub a bakterií. *Klebsormidium* se poměrně lehce dalo oddělit od jiných řas a sinic, ikdyž se často v kulturách při první kultivaci vyskytovalo jako součást společenstva těchto rodů. Přeočkováním jsem vykultivovala jednodruhové kultury rodu *Klebsormidium*. Nejběžnější organismy, které způsobovaly kontaminace, byly bakterie a houby. V kulturách byly jak hyfy, tak spory hub, které jsou velmi odolné vůči extrémním teplotám a přežijí podmínky, kdy jiné mikroorganismy odumírají. Z toho důvodu bylo velice složité jejich výskyt v kulturách omezit. Houby jsou schopné se šířit vzduchem, takže mnoho kontaminací vzniklo při práci s kulturami, při očkování nebo při přípravě agaru. Kontaminacím se nepodařilo zamezit ani při práci ve flowboxu. Houby vytvářely na agaru nárosty různých zbarvení (bílé, šedé, žluté, červené, hnědé a černé). Schopnost růstu a rozmnožování těchto mikroorganismů je mnohem větší než u řas nebo sinic, takže houby byly vždy první organismy, které v kulturách narostly. V některých vzorcích se první houbové kolonie objevily už po 24 hodinách od naočkování řas. Toto samozřejmě zpomalilo jejich růst a dospělá vlákna jsem pozorovala až po 4-5 týdnech. Houby zjevně pouze znemožnily počáteční růst, vlákna rodu *Klebsormidium* však vypadala vitálně a přítomnost hub jejich fyziologii nijak neovlivnila. Ovšem takto kontaminované vzorky jsem nemohla dále používat jako zdroj pro následné kultivace. Přítomnost bakterií ve vzorcích neměla vliv na kultivované řasy, takto kontaminované kultury jsem používala dále k přeočkování. Jedinou viditelnou změnu, kterou bakterie způsobily, byla změna zbarvení agaru z čiré průsvitné barvy na mléčně zakalenou.

6.2. Výsledky obrazové analýzy

K determinaci druhů jsem používala literaturu Lokhorst (1996) a Uher (2010).

6.2.1. Morfologie

Kultury všech vzorků vypadaly z morfologického hlediska shodně. *Klebsormidium* tvořilo různě dlouhá vlákna podle stáří kultury. Jednotlivé buňky ve vláknech byly nerozlišené, pravidelně cylindrické a bez slizových pochev. Obsahovaly vždy jeden nástěnný chloroplast, který pokrýval asi 50% buněčné stěny. V chloroplastech se nacházel jeden pyrenoid.

V mladých kulturách se vyskytovala kratší vlákna, která měla zaoblené konce bez pozůstatků buněčných stěn. Chloroplasty byly sytě trávovitě zelené barvy a uvnitř buněk bylo minimální množství metabolitů. Dospělá vlákna byla podstatně delší (okolo 50 buněk) a v kulturách tvořila více početné shluky. Chloroplasty měly tmavší odstín než u mladých vláken. Na jejich koncích byly často úlomky buněčných stěn ve tvaru písmene H (obr. 5e), které jsou známkou fragmentace. Součástí dospělých vláken byly také prázdné buňky s okénky nebo prasklinami, ze kterých unikly zoospory (obr. 5f). Ty byly opatřeny dvěma bičíky, po jejich ztrátě se sférické buňky zoospor začaly formovat do cylindrického tvaru a dělit se. Ve vzorku z Brna-Žabovřesek se na dospělých vláknech objevovaly zduřeniny a jednotlivé buňky neměly pravidelný tvar. Tyto útvary pravděpodobně vznikly v důsledku pohlavního rozmnožování, které bylo v těchto vzorcích zjištěno. Rozšířením buněk v kulovité útvary se vytvořilo zoosporangium, kde posléze docházelo ke splývání gamet. Stará vlákna se vyznačovala velkým obsahem metabolitů, jejich chloroplasty byly světle zelené až průsvitné, na povrchu laločnaté.

6.2.2. Morfometrie

U všech vzorků jsem měřila šířku buněk ve vláknech. Z každého kmene jsem přeměřila nejméně 100 nativních buněk. V případě vzorků, které jsem kultivovala, jsem šířku buněk zaznamenávala vícekrát v jejich životním cyklu. Všeobecně vlákna dosahovala největších šířek v dospělosti, po ukončení reprodukční fáze se jejich šířka opět zmenšila a vlákna začala odumírat. Podle naměřených hodnot se ve všech vzorcích jedná o *Klebsormidium flaccidum*. Dá se ale předpokládat, že kmen z Poznaňské ulice, kde bylo pozorováno pohlavní rozmnožování, bude jiným druhem. Jednotlivé buňky byly ve většině případů delší než širší. Délka buňky se nepovažuje za tolik směrodatnou, je ovlivněna různými faktory (teplota, vlhkost, osvětlení, pH). Tyto vnější vlivy samozřejmě ovlivňují i šířku buněk, ale ne tak markantně jako délku. Rozdíly v šířkách se pohybují v rozsahu několika desetin mikrometru, zato u délky se to projeví v řádu několika mikrometrů (Škaloud 2006).

Tabulka 2: Šířka buněk rodu *Klebsormidium* - lokalita Brno

| Lokalita Brno | Technická | Poznaňská-školka | Zvonařka |
|----------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Šířka buňky/ μm | $7,85 \pm 1,05$ | $6,95 \pm 1,95$ | $7,35 \pm 1,05$ |

Tabulka 3: Šířka buněk rodu *Klebsormidium* - lokalita Prostějov

| Lokalita Prostějov | Havlíčková | Partyzánská-plot | Partyzánská-zed' |
|----------------------------|---------------|------------------|------------------|
| Šířka buňky/ μm | $7,5 \pm 1,5$ | $6,6 \pm 1,4$ | $6,7 \pm 0,8$ |

6.3. Ontogeneze

Během kultivace vláknitých řas rodu *Klebsormidium*, jsem pozorovala všechna známá vývojová stádia a zdokumentovala jsem je pomocí obrazové analýzy. Kultury jsem prohlížela pod mikroskopem jednou týdně, po tomto časovém intervalu byly již viditelné změny ve vývoji vláken. Pozorování zoospor v kulturách je možné už po 12 hodinách od navození stresu, já jsem pozorování prováděla po 24 hodinách.

V odebraných vzorcích byly nejvíce zastoupeny dlouhá a dobře vyvinutá vlákna (20-50 buněk). Jednalo se o dvě stádia, o mladá a dospělá vlákna. Rozdíl mezi nimi je schopnost rozmnožovat se, tu mají jen ta dospělá. Právě na dospělých vláknech se nacházely tzv. okénka, teda pozůstatky po zoosporulaci. Zoospory v preparátech přímo z místa odběru nebyly, mají totiž poměrně krátkou životnost, po několika hodinách se z nich stávají přisedlé buňky. Dále se v preparátech nacházely zbytky buněčných stěn, které značí druhý způsob rozmnožování, tedy fragmentaci. Právě proto že v odebraných vzorcích nejsou zastoupeny všechna vývojová stádia, je důležité řasy kultivovat. Bez tohoto procesu se nedají bezpečně určit jednotlivé druhy, musí se tedy vycházet ze všech ontogenetických stádií. Liší se svými specifickými vlastnostmi a napomáhají k determinaci.

Po naočkování se začala rozrůstat mladá vlákna (obr. 5c), která byla nejprve kratší (do 20 buněk) a postupem času se prodlužovala a dospívala. Jejich chloroplasty byly sytě zelené a v buňkách bylo málo metabolitů. Konce vláken byly zaoblené, bez úlomků buněčných stěn. Až vlákna dospěla (obr. 5d), mohla jsem pozorovat oba způsoby nepohlavního rozmnožování (obr. 5e, f). K fragmentaci docházelo snadno a samovolně, pozorovala jsem ji ve vzorcích ze všech lokalit. Tento typ rozmnožování probíhal téměř nepřetržitě, vyskytoval se i u starých vláken, které vytváří zoospory jen zřídka. Fragmentace (obr. 5e) je tedy nejčastějším a nejjednodušším typem rozmnožování z tohoto rodu. Autoři (Cain et al. 1973) se zmiňují o tom, že ke tvorbě zoospor dochází pouze za určitých podmínek, takže fragmentace, jako druhý způsob reprodukce, je nejfrekventovanější a nejsnadnější.

K tomu abych mohla pozorovat zoospory, jsem musela vzorky vystavit stresu. V žádné kultuře se totiž neuvolňovaly samovolně. Zoosporulace je komplikovanější proces než fragmentace a vyžaduje specifické podmínky. Existuje několik způsobů, jak tento jev navodit. Nejčastěji se kultury se zástupci rodu *Klebsormidium* ponechají několik hodin ve tmě (16-24 hodin), popřípadě se agar s nárosty zalije destilovanou vodou, zde se po 12-24 hodinách začnou tvořit a uvolňovat zoospory. Nejpočetněji se vyskytují u okrajů Petriho misky, odsud stačí kapalinu se sporami nabrat kapátkem a pozorovat pod mikroskopem. Já jsem používala právě tuto metodu k navození zoosporulace. Vybrala jsem si kultury, kde byl vyizolován pouze rod *Klebsormidium*, abych vyloučila, že jeho zoospory zaměním

se zoosporami jiných rodů řas. Jednalo se o vzorky z mateřské školky v Brně a o vzorky z Partyzánské ulice v Prostějově. Následující den od zalití kultur, jsem je prohlédla a zdokumentovala změny, které proběhly. Ne v každém vzorku se zoospory vyskytovaly, ale na většině vláken byly viditelné praskliny a okénka (obr. 5f). To dosvědčuje, že zde k vytvoření zoospor a následnému uvolnění došlo. Vysvětlení je takové, že pohyblivé zoospory již odloučily bičíky a staly se z nich přisedlé buňky kokálního tvaru, které jsem pozorovala sloučené v početnějších shlucích. Nebo k zoosporulaci došlo již před jejím umělým navozením a ve vzorku se již vyskytovala krátká mladá vlákna, která vznikla z těchto zoospor. Mohu tedy říci, že ve všech testovaných vzorcích řas rodu *Klebsormidium* se vytvořily zoospory, i když ne všude byly zdokumentovány.

Samotný proces vytváření spor sestává z několika kroků a ne vždy je úspěšně dokončen. První fází zoosporulace je vytvoření malé papily na boční stěně buňky (Mattox 1971). Dochází k nárůstu počtu refrakčních orgánů, mění se uspořádání organel i jejich vzhled, především mitochondrií. V rané fázi zoosporogeneze jsou papily umístěny na straně jádra nebo u chloroplastu. V další fázi dochází k natočení organel a výsledně by se měl chloroplast nacházet na straně papily. Tato skutečnost, že chloroplast i papila jsou na stejné straně buňky, je základním rysem celé zoosporogeneze. Jádro se stává méně zřetelným, protože jej překrývá chloroplast, stigma není v buňce během zoosporogeneze přítomno a pyrenoid zůstává nepozměněn. Jakmile z buňky vymizí velké vakuoly, začnou se formovat bičíky, které jsou zřetelné už v mateřské buňce, ještě předtím než se zoospora uvolní ven. Ta se vytlačuje z buňky perforovanou buněčnou stěnou a využívá k tomu améboidního pohybu. Jakmile je mimo mateřskou buňku, pohybuje se pomocí páru bičíků. Někdy je zoospora připevněná ke stěně mateřské buňky pomocí tenké cytoplasmatické vrstvy, toto spojení musí být přerušeno, aby zoospora mohla z buňky uniknout (Cain et al. 1973). V každé kultuře se vždy nacházelo několik buněk, kde se zoospora vytvořila, ale již neunikla z buňky ven. Tento jev mohl vzniknout právě na základě spojení zoospory se stěnou mateřské buňky, kdy nedošlo k odtržení a zoospora uvízla uvnitř (Floyd et al. 1972).

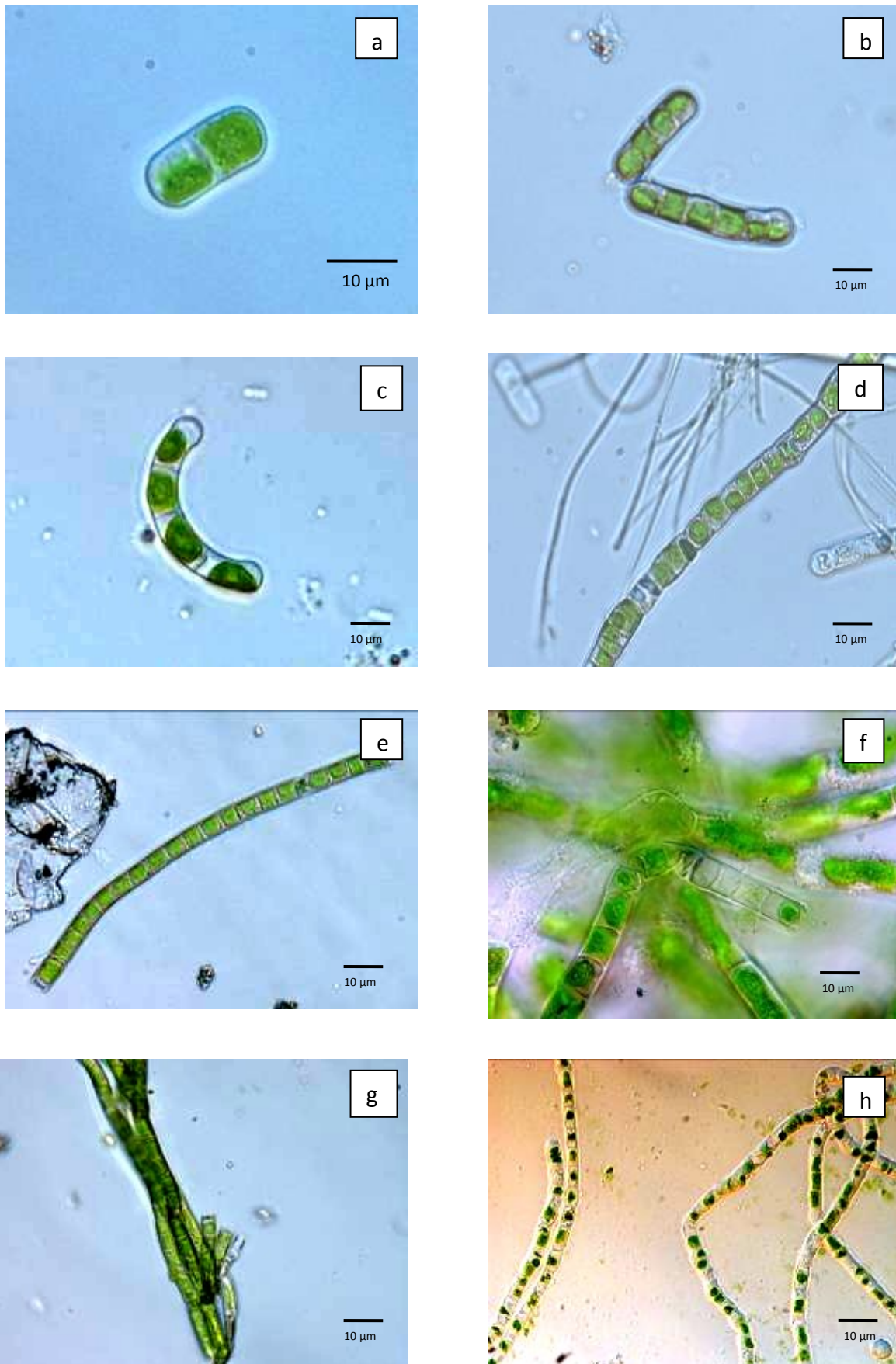
Dvoubičíkaté zoospory mají životnost několik desítek hodin, poté ztrácejí bičík a stávají se z nich nepohyblivé kokální buňky, které tvoří shluky. Z těchto buněk vzniká buněčným dělením vlákno. Nejprve se ale vytvoří dvoubuněčné stádium, buňky jsou spojeny buněčnou stěnou a svírají určitý úhel (od 75° do 110°). Buňky se dále dělí a jejich počet ve vláknech se zvyšuje (obr. 5b). Vzniknou dvě ramena a ty se od sebe oddělí, každé potom funguje jako samostatné vlákno, které až dospěje, je schopno reprodukce.

Pohlavní rozmnožování bylo popsáno pouze jednou (Wille 1921). Při kultivaci vzorků pocházejících z Brna-Žabovřesek jsem zaznamenala nezvyklý způsob rozmnožování. Jedná se

o typ pohlavního rozmnožování (obr. 4), které zatím nebylo u tohoto rodu nikdy v minulosti zdokumentováno. Jde pravděpodobně o autogamii (resp. kleistoizogamii) protoplastů dvou sousedních buněk. Nejprve dochází k lýze buněčné přepážky mezi danými buňkami, poté se začnou gamety přibližovat a splývají za vzniku zygoty. Vzniklé zoosporangium je kulovitého tvaru. Tento proces je ještě potřeba prověřit experimentálně, protože byl pozorován pouze jednou a v jednom vzorku. Jedná se tedy o nový typ doposud nepoznaného způsobu rozmnožování u rodu *Klebsormidium*.



Obr. č. 4: Pohlavní rozmnožování rodu *Klebsormidium* (orig. K. Perútková) (a,b) migrace gamet do středu zoosporangia, (c,d) splývání gamet v jeden protoplast.



Obr. č. 5: Životní cyklus rodu *Klebsormidium* (orig. K. Perútková) (a) dvoubuněčné stádium, (b) mladá vlákna spojená buněčnými stěnami pod úhlem 75° , (c) mladé vlákno, (d) dospělé vlákno, (e) fragmentované vlákno, (f) vlákno s okénky, (g) svazek dospělých vláken, (h) stará vlákna s prázdnými a nepravidelnými buňkami.

7. Závěr

Z přírodních vzorků jsem úspěšně vyizolovala vláknité řasy druhu *Klebsormidium flaccidum*. V průběhu kultivace jsem pomocí obrazové analýzy zdokumentovala všechna vývojová stádia životního cyklu a výsledně jsem mohla rekonstruovat ontogenezi tohoto druhu. Zjištěny byly oba způsoby nepohlavního rozmnožování, jak fragmentace vláken, tak tvorba zoospor, která probíhala ve většině kultur po navození stresu. V kulturách byly pozorovány jednobuněčná přisedlá stádia, dvoubuněčná stádia, mladá, dospělá a stará odumírající vlákna. Zvláštností byla přítomnost pohlavního rozmnožování, které nebylo u tohoto rodu doposud známé. Jde o zatím neprozkoumaný proces rozmnožování, který je potřeba ještě experimentálně ověřit. Tato skutečnost poukazuje, že v životním cyklu rodu *Klebsormidium* je stále mnoho neobjasněných faktů. Taktéž je potřeba podrobněji doplnit informace týkající se fylogeneze jednotlivých druhů rodu *Klebsormidium*.

8. Seznam literatury

- Aristovskaya T. V., Daragan A. Y., Zykina L. V. & Kutuzova R. S. (1969) Microbiological factors in the movement of some mineral elements in the soil. *Soviet Soil Science* 5: 538-546.
- Booth W. E. (1941) Algae as pioneers in plant succession and their importance in erosion control. *Ecology* 22: 38-46.
- Booth W. E. (1946) The thermal death point of certain soil inhabiting algae. *Proc. Montana Academy of Sciences* 5 (6): 21-23.
- Büdel B. (1999) Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions. *European Journal of Phycology* 34: 361-370.
- Cain J. R., Mattox K. R. & Stewart K. D. (1973) The Cytology of Zoosporogenesis in the Filamentous Green Algal Genus *Klebsormidium*. *Transactions of the American Microscopical Society* 92 (3): 398-404.
- Cameron R. E. & Blank G. B. (1966) Soil studies. Desert microflora. XI. Desert soil algae survival at extremely low temperatures. *J.P.L. Space Programs Summary* 37-37, IV: 174-181.
- Darienko T. & Hoffmann L. (2003) Algal growth on cultural monuments in Ukraine. *Biologia* 58: 575-587.
- Elster J. (2002) Ecological classification of terrestrial algal communities in polar environments. *Ecological Studies* 154: 303-326.
- Elster J., Francírková T. & Kylbergerová M. (2007) Ekologie fytobentosu dočasných tůní Horní Lužnice (Phytobenthos ecology of alluvial pools of the Lužnice River), In: Papáček M. (Ed.), *Biodiverzita a přírodní podmínky Novohradských hor*, Jihočeská univerzita and Entomologický ústav AV ČR, České Budějovice, pp. 123–130.

- Elster J., Degma P., Kováčik L., Valentová L., Šrámková K. & Pereira A. B. (2008) Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia* 63: 843-851.
- Ettl H. (1978) Xanthophyceae. In: Ettl H., Gerloff J. a Heynig H. (Eds.) *Süsswasserflora von Mitteleuropa*. Vol. 3., Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 1-549.
- Ettl H. & Gärtner G. (1995) *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, pp. 1-721.
- Farooqui P. B. (1968) A note on the genus *Chlorhormidium* Fott (Ulotrichaceae). *Preslia* 41: 1-7.
- Floyd G. L., Stewart K. D. & Mattox K. R. (1972) Cellular organization, mitosis, and cytokinesis in the ulotrichalean alga, *Klebsormidium*. *Journal of Phycology* 8: 176-184.
- Fott B. (1956) *Sinice a řasy*. Nakladatelství ČSAV, Praha, p. 373.
- Good B. H. & Chapman R. L. (1978) The ultrastructure of *Phycopeltis* (Chroolepidaceae: Chlorophyta). I. Sporopollenin in the cell walls. *American Journal of Botany* 65: 27-33.
- Guiry M. D. (1997) Benthic red, brown and green algae. In: *The Species Directory of the Marine Fauna and Flora of the British Isles and Surrounding Seas*. (Howson C. M. & Picton B. E. Eds.), Belfast & Ross-on-Wye: Ulster Museum & Marine Conservation Society, pp. 341-367.
- Hindák F. (1996) New taxa and nomenclatural changes in the Ulotrichineae (Ulotrichales, Chlorophyta). *Biologia* 51: 357-364.
- John D. M. (2002) Orders Chaetophorales, Klebsormidiales, Microsporales, Ulotrichales. In: John D. M., Whitton B. A. and Brook A. J. (Eds.), *The freshwater algal flora of the British Isles*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 433-468.

- Kalina T. (2001) Původ chloroplastů a zařazení řasových oddělení do systému organismů. *Czech Phycology* 1: 1-4.
- Kalina T. & Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, Praha, pp. 1-606.
- Keller M. D., Bellows W. K. & Guillard R. R. L. (1988) Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 117: 279-83.
- Krumbein W. E. & Urzi C. (1992) Biologically induced decay phenomena of antique marbles – some general considerations. In: Decrouez D., Chamay J., Zezza F. (Eds.), *The conservation of monuments in the Mediterranean Basin*, 2nd International Symposium, Genève, November 19.-21. 1991, Genève, pp. 219-235.
- Lokhorst G. M. & Star W. (1985) Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 21: 466-476.
- Lokhorst G. M. (1996) Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. In: Jülich, W. (Ed.) *Cryptogamic Studies*, Vol. 5, Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 1–55.
- Mattox K. R. (1971) Zoosporogenesis and resistant cell formation in *Hormidium flaccidum*. In: Parker B. C. a Brown R. M., Jr., (Eds.), *Contributions in Phycology*, pp. 137-144.
- Metting B. (1981) The systematics and ecology of soil algae. *The Botanical Review* 47: 195-312.
- Morison M. O. & Sheath R. G. (1985) Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia* 24: 129-145.
- Novis P. M. (2006) Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. *Phycologia* 45 (3): 293-301.

- Preisig H. R. & Andersen R. A. (2005) Historical review of algal culturing techniques. Academic Press, Burlington, San Diego, London, pp. 1-12.
- Printz H. (1964) Die Chaetophorales der Binnengewässer. Eine systematische Übersicht. *Hydrobiologia* 24: 1-376.
- Pouličková A. & Jurčák J. (2001) Malý obrazový atlas našich sinic a řas. Univerzita Palackého, Olomouc, p. 17.
- Pouličková A., Dřimalová D., Havránek P., Novotný R. & Válová P. (2001) Morphological responses to varying environmental conditions in *Klebsormidium flaccidum* isolated from Moroccan desert soils. *Nova Hedwigia Beih.* 123: 397-409.
- Ramanathan K. R. (1964) Ulotrichales. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India, pp. 1-188.
- Rifón-Lastra A. & Noguerol-Seoane A. (2001) Green algae associated with the granite walls of monuments in Galicia (NW Spain). *Cryptogamie, Algologie.* 22: 305-26.
- Rindi F. (2007) Distribution and Ecology of Green Algae and Cyanobacteria in Urban Habitats. In: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 619-638.
- Rindi F., Guiry M. D. & Lopez-Bautista J. M. (2008) Distribution, morphology and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *Journal of Phycology* 44: 1529-1540.
- Rindi F., Mikhailyuk T. I., Sluiman H. J., Friedl T. & López-Bautista J. M. (2011) Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 21-231.
- Silva P. C., Mattox K. R. & Blackwell W. H. (1972) The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon* 21: 639-645.

- Sluiman H. J., Guihal C. & Mudimu O. (2008) Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogeny and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *Journal of Phycology* 44: 183-95.
- Smith E. A., Mayfield C. I. & Wong P. T. S. (1978) Naturally-occurring apatite as a source of orthophosphate for growth of bacteria and algae. *Microbial Ecology* 4: 105-118.
- Steuer R. (2008) Studium fyzikálních vlastností materiálů vnějšího zateplení budov z hlediska snížení vlhkostí zátěže. Dizertační práce, Vysoké učení technické, Brno, pp. 1-99.
- Škaloud P. (2004) Aero-terestrické sinice a řasy ventarol NPP Borečský vrch. Dizertační práce, Univerzita Karlova, Praha, pp. 1-140.
- Škaloud P. (2006) Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium*. *Nova Hedwigia* 83: 533-50.
- Šramková K., Uher B., Minárik G., Slaninová M. & Kováčik L. (2006) Taxonomicko-morfologická charakterizácia kmeňov vláknitej zelenej riasy *Klebsormidium crenulatum* vs *K. flaccidum* a úvod do ich molekulárno-fylogenetických vzťahov. In: Študentská vedecká konferencia 2006, 1. zväzok – biologická a environmentálna sekcia. Kartprint, Bratislava, pp. 161-163.
- Uher B. (2004) Cyanobacteria and algae as significant actors of biodeterioration on stone monuments in Bratislava and Murcia-flora, ecology and taxonomy. Dizertační práce, Univerzita Komenského, Bratislava, pp. 1-135.
- Uher B., Kováčik L., Kučera P., Hindáková A. & Pivko D. (2005) Cyanobaktérie a riasy na kamenných subtrátoch objektov kultúrno-historického významu v Bratislave. *Bulletin Slovenskej Botanickej Spoločnosti* 27: 11-16.
- Uher B., Aboal M. & Kováčik L. (2005) Epilithic and chasmoendolithic phycoflora of monuments and buildings in South-Eastern Spain. *Cryptogamie, Algologie* 26 (3): 275-308.

- Uher B. (2010) Cyanobacteria and algae as significant actors of biodeterioration. Lambert academic publishing, Saarbrücken, pp. 1-125.
- Wagner H. P. & Zaneveld J. S. (1988) The Xanthophyceae and Chlorophyceae of the western Ross Sea, Victoria Land, Antarctica and Macquarie Island collected under the direction of Prof. Dr. J. S. Zaneveld (1963-1967). *Blumea* 33: 141-180.
- Watanabe S. (1983) New and interesting green algae from soils of some Asian and Oceanian regions. *Archiv für Protistenkunde* 127: 223-270.
- Wei Y. X. (1984) Some new green algae from Xizang (Tibet). *Acta Phytotaxonomica Sinica* 22(4): 321-336.
- Wilcox L., Fuerst P. & Floyd G. (1993) Phylogenetic Relationships of Four Charophycean Green Algae Inferred from Complete Nuclear-Encoded Small Subunit rRNA Gene Sequences. *American Journal of Botany* 80 (9): 1028-1033.
- Wille N. (1912) Om Udviklingen of *Ulothrix flaccida* Kutz. *Svensk Botanisk Tidskrift* 6: 447-458.
- Winkler E. M. (1994) Stone in Architecture, Properties, Durability. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-131.