

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Fylogeneze a taxonomie vybraných druhů sinic čeledi  
Merismopediaceae s využitím metody single cell  
sequencing**

**Bakalářská práce**

**Jan Pokorný**

Školitel: prof. RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D.  
Školitel specialista: Mgr. Lenka Štenclová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Pokorný, J., 2022: Fylogeneze a taxonomie vybraných druhů sinic čeledi Merismopediaceae s využitím metody single cell sequencing. [Phylogeny and taxonomy of selected Cyanobacteria species of the family Merismopediaceae using single cell sequencing. Bc. Thesis, in Czech] – 81 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Thanks to new molecular methods, which have been used for revision of many traditional cyanobacterial taxa, their real systematic positions have become clearer. Merismopediaceae is a relatively understudied group of Cyanobacteria, therefore many subordinate taxa have not been sufficiently molecularly reviewed. In this thesis standard molecular methods of the polyphasic approach were used on environmental isolates as well as cultured strains of Merismopediaceae taxa. Subsequent phylogeny analysis based on 16S rRNA gene shows the polyphyly of genera *Merismopedia* and *Eucapsis*. The thesis also includes the very first molecular evidence of the taxonomic position of the genus *Microcrocis*.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 11. 4. 2022

---

Jan Pokorný

## Poděkování

Především děkuji své školitelce specialistce Lence Vykalence Štenclové za to, že mi ukázala taje molekulární fylogentiky a za její bezbřehou trpělivost a svému školiteli Janu Hanysovi Kaštovskému za vedení této práce a za to, že mě přesvědčil, jak krásné sinice umí být. Děkuji Bětce Vondráškové za to, že mě naučila izolovat buňky a Pepovi Juráňovi za pomoc s kultivací.

Děkuji všem členům algologické laboratoře za vytváření pohodového kolektivu i podnětné připomínky a rady, za to pak jmenovitě Tomáši Hauerovi. Děkuji Jaroslavu Piškotovi Kubínovi za možnost s ním odebírat vzorky, využívat je a že jsme se, doufám bez nadsázky, stali kamarády.

Obrovský dík patří mé rodině a přátelům za perfektní zázemí a všeobecnou podporu.

Veliké Díky Vám všem

# Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Polyfyletismus v současné taxonomii sinic.....	1
1.2	Typový rod čeledi <i>Merismopedia</i> Meyen, 1839.....	5
1.2.1	Ekologie.....	7
1.2.2	Morfologie.....	8
1.2.3	Přehled taxonomicky platných druhů rodu <i>Merismopedia</i> .....	10
1.2.4	Fylogenetické problémy a otázky.....	15
1.3	Čeď Merismopediaceae.....	16
1.3.1	<i>Aphanocapsa</i> Nägeli, 1849.....	17
1.3.2	<i>Cocopedia</i> Troitzkaja, 1922.....	17
1.3.3	<i>Cyanotetras</i> Hindák, 1988.....	18
1.3.4	<i>Eucapsis</i> Clements & Shantz, 1909.....	18
1.3.5	<i>Limnococcus</i> Komárková et al., 2010.....	19
1.3.6	<i>Mantellum</i> Dangeard, 1941.....	19
1.3.7	<i>Microcrocis</i> Richter, 1892.....	20
1.3.8	<i>Pannus</i> Hickel, 1991.....	20
1.3.9	<i>Synechocystis</i> Sauvageau, 1892.....	21
2	Cíle práce.....	23
3	Materiál a metody.....	24
3.1	Odběr vzorků.....	24
3.2	Izolace.....	24
3.3	Molekulární metody.....	24
3.3.1	MDA.....	24
3.3.2	PCR z MDA produktu.....	25
3.3.3	Nested single cell PCR.....	25
3.3.4	De novo metoda Nested ITS.....	25
3.3.5	Izolace gDNA z kultury.....	26
3.4	Fylogenetická analýza.....	27
3.5	Transmisní elektronová mikroskopie.....	27

4	Výsledky .....	29
4.1	Morfologie .....	30
4.2	Výsledky fylogenetické analýzy .....	33
5	Diskuse .....	38
5.1	Porovnání molekulárních metod .....	38
5.2	<i>Merismopedia</i> .....	39
5.2.1	Typový druh rodu – <i>Merismopedia punctata</i> .....	40
5.2.2	<i>Merismopedia glauca</i> .....	42
5.2.3	<i>Merismopedia tenuissima</i> .....	44
5.2.4	<i>Merismopedia angularis</i> .....	46
5.2.5	Obecné závěry .....	46
5.3	<i>Microcrocis</i> .....	48
5.4	<i>Eucapsis</i> .....	50
5.5	Naznačené trendy pro budoucí výzkum .....	52
6	Shrnutí .....	55
7	Literatura .....	56
8	Přílohy .....	75

# 1 Úvod

## 1.1 Polyfyletismus v současné taxonomii sinic

Sinice jsou kmen prokaryotních organismů náležících doméně Bacteria se širokou škálou ekologických nároků i morfologických zvláštností. Jsou monofyletické a výhradně foto-autotrofní. Disponují unikátními buněčnými strukturami – tylakoidy s chlorofylem a (někdy i b, c, d a f), karoteny a xantofyly, na nichž spočívají fykobilizomy obsahující barviva fykocyanin a fykoerytrin (Averina et al. 2019). Díky těmto strukturám dokáží fotosyntetizovat i za velmi omezeného přístupu světla. Některé druhy tvoří klidová stádia (akinetý) nebo heterocyty – buňky, jejichž jediným účelem je produkce dusíkatých látek fixací vzdušného dusíku. Žijí buď soliterně, koloniálně, nebo tvoří vlákna (Graham et al. 2009). Patří mezi jedny z nejstarších organismů na planetě Zemi – první fosilní záznamy odhadují jejich stáří na asi 2,5 miliardy let. Obývají téměř všechny představitelné ekologické niky od čistě vodního prostředí přes půdu až po extrémní biotopy, jako jsou termální vývěry (Whitton & Potts 2002; Cordeiro et al. 2020). Jsou považovány za jedny z nejzásadnějších ekosystémových inženýrů (Pietrasiak et al. 2019). Účastní se mnohých ekologických interakcí, z nichž bezesporu nejdůležitější je endosymbióza. Ta totiž dala vzniknout chloroplastům řas a posléze vyšších rostlin (Howe et al. 2008; Martin et al. 2015). Na počátcích vědeckého studia byly sinice považovány za příbuzné řasám (např. anglický termín blue-green algae) (Kützing 1836; Meyen 1839; Lagerheim 1883; Clements a Shantz 1909 aj.), teprve v sedmdesátých letech minulého století začaly být jasně chápány jako prokaryota (Stanier 1977).

Čistě morfologický přístup k taxonomii sinic má oproti moderním metodám zahrnujícím molekulární fylogenetiku mnohé limity (Komárek 2016). Moderní studie zabývající se taxonomií a fylogenezí sinic ukazují, že klasický pohled na systém sinic, který využíval pouze fenetických znaků, nezohledňoval jejich fylogenezi, a proto docházelo k seskupování taxonů bez ohledu na jejich oddělenou evoluci (Dvořák et al. 2015). Nereflektuje tedy velmi častou konvergentní evoluci morfologických znaků, která se týká velkého množství taxonů (Dvořák et al. 2014a). Některé morfologické znaky taxonů se navíc mohou lišit mezi populacemi vlivem vnějších ekologických vlivů, nebo se ztratit vlivem kultivace kmene v průběhu delšího časového úseku (Rippka et al. 1979; Palińska et al. 1996; Jezberová & Komárková 2007; Zhang et al. 2007; Zapomělová et al. 2008; Palińska & Surosz 2014). Morfologický systém samozřejmě nebral v potaz ani kryptickou diverzitu

(Ruse 1969; Komárek 2016), tedy existenci taxonů, které nelze odlišit pouze podle morfologických znaků (Dvořák et al. 2015). Vyřešit tento problém před příchodem molekulárních metod zčásti pomohlo studium ultrastruktur, jako je např. tvar tylakoidů (Komárek & Kaštovský 2003). K výzkumu těchto struktur se nejčastěji používá transmisní elektronová mikroskopie (Komárek & Kaštovský 2003; Mareš et al. 2019b), ale i skenovací transmisní mikroskopie (Sciuto et al. 2012; Vázquez-Martínez et al. 2018). Velká část systému sinic byla do dnešní podoby ustanovena až použitím molekulárních metod, ale nejasnosti stále přetrvávají (Komárek et al. 2014; Dvořák et al. 2017).

V současnosti lze nové taxony sinic popisovat dle dvou kódů (Oren & Ventura 2017). Tradičně podle Mezinárodního kódu pro řasy, houby a rostliny (ICN) je pro popis taxonu třeba herbářová položka v podobě sušené biomasy (Oren & Ventura 2017; Dvořák et al. 2018). Na velkou část prokaryot včetně sinic nelze tento postup využít, jelikož není možné je kultivovat a získat tak čistou herbářovou položku (Mareš et al. 2015). Proto je akceptovatelná i druhá možnost popisu dle Mezinárodního kódu pro nomenklaturu prokaryot (ICNP), kde je pro popis nového taxonu klíčová dostatečně odlišená genetická sekvence bez účasti morfologických a ekologických znaků (Dvořák et al. 2018; Li et al. 2019). Tento přístup na jednu stranu umožňuje nový pohled na skutečnou systematiku (např. polyfyletismus) tradičních taxonů (Komárková et al. 2010; Shen et al. 2018; Mareš et al. 2019a; Wang et al. 2021 aj.) a rozlišení kryptických taxonů (Li et al. 2020). Na druhou stranu s sebou nese problém v rapidně se zvětšujícím počtu nových taxonů a jejich jmén znesnadňujícím vědeckou komunikaci (Johansen et al. 2021). Komárek (2018, 2020) navrhuje tento problém částečně vyřešit spojením jména nově popsaného kryptického taxonu se jménem taxonu, od něž se tento oddělil. Rovněž navrhuje akceptovat nové popisy, pouze pokud je uvedena jejich fylogenetická pozice vůči již popsaným taxonům a zároveň jsou známé další markery pro odlišení konkrétního nově popsaného taxonu. Mnozí autoři proto dávají přednost polyfázickému přístupu (Komárek 2016) či alternativně „total evidence approach“ (Johansen et al. 2021) a stává se z něj jeden z nejpoužívanějších přístupů pro popis nových taxonů sinic (Korelusová et al. 2009; Mareš et al. 2015; Jahodářová et al. 2017; Genuário et al. 2018; Mai et al. 2018; Vázquez-Martínez et al. 2018; Kim et al. 2021; Pecundo et al. 2021 aj.). Polyfázický přístup zahrnuje klasický morfologický popis, ekologickou charakteristiku, popis ultrastruktury morfologických znaků (Komárek & Kaštovský 2003; Mareš et al. 2019b), biochemickou analýzu (např. složení pigmentů) a molekulárně-fylogenetické metody (Komárek 2016).

Molekulární a fylogenetické metody jsou zásadním aspektem polyfázického přístupu a vyžadují získání čistého genetického materiálu zkoumaného taxonu (Mareš et al. 2015). Toho lze dosáhnout kultivací, kdy je jako templát použita biomasa pokud možno axenické kultury (Geng et al. 2021). Mnoho druhů sinic je však obtížně kultivovatelných, nebo nejdou kultivovat vůbec (Lara et al. 2013). To platí pro celou škálu sinic, zejména pro ty vyžadující specifické podmínky (Mareš et al. 2015). Proto je v tomto případě vhodnou alternativou izolace jednotlivých buněk či kolonií z environmentálního vzorku např. pomocí skleněné mikrokapiláry (Zapomělová et al. 2007; Mareš et al. 2015). Vhodnými dalšími kroky pak bývá celogenomová amplifikace a následně namnožení genu pro 16S rRNA společně s ITS pomocí PCR (Lara et al. 2013), nebo jejich přímá amplifikace pomocí vnořené (Nested) PCR (Mareš et al. 2015). Gen pro 16S rRNA je výhodné používat, protože jeho evoluce není ovlivněna selekcí na základě fenotypu, a mutace tak lépe reprezentují časovou škálu, než tomu je u některých jiných genů (Janda & Abbott 2007). Zároveň je přítomen u všech prokaryot. Jeho sekvence je navíc dostatečně konzervativní pro definici taxonů na úrovni čeledí, rodů a často i druhů a dostatečně dlouhá pro statisticky průkazné výsledky (Stackebrandt & Goebel 1994; Janda & Abbott 2007). V současné době je akceptovaná hranice pro oddělení samostatného druhu prokaryotního organismu 98,65% podobnost 16S (Kim et al. 2014; Dvořák et al. 2015), pro oddělení rodu 95% podobnost (Komárek 2010). Tyto hranice se však s postupným rozšiřováním znalostí o systému sinic mění (Stackebrandt & Goebel 1994; Dvořák et al. 2015). ITS (Internal Transcribed Spacer) je variabilnějším úsekem ribozomálního genového klastru a ideální pro rozlišení druhové identity (Boyer et al. 2001). Kromě samotné sekvence lze u ITS porovnávat i unikátní sekundární struktury (Vázquez-Martínez et al. 2018; Soares et al. 2019; Konstantinou et al. 2021).

Na základě polyfázického přístupu bylo v poslední velké taxonomické revizi ustanoveno devět řádů sinic, Gloeobacterales, Synechococcales, Oscillatoriales, Chroococcales, Pleurocapsales, Spirulinales, Chroococcidiopsidales, Nostocales a Pseudanabaenales, s nejistými vzájemnými vztahy (Komárek et al. 2014). Některé rody však stále zůstaly nezařazeny a jsou označovány jako „incertae sedis“ (Komárek et al. 2014; Komárek 2015). Od té doby se taxonomicky uznávané řády rozšířily o čistě termofilní *Thermostycales* (Komárek et al. 2020).

Díky rozsáhlému sekvenování mnohých taxonů sinic se v posledních letech objevují poznatky o polyfyletismu mnohých tradičních rodů. Nejtypičtějším příkladem je nejběžnější pikoplanktonní sinice r. *Synechococcus s. l.*, známý jako masivní producent kyslíku (Dvořák



et al. 2014a). Od pilotních studií (Robertson et al. 2001) naznačujících jeho polyfyletismus bylo popsáno dvanáct oddělených linií o více než 100 druzích napříč systémem sinic zaujímavější obrovskou ekologickou variabilitu (Dvořák et al. 2014a; Jahodářová et al. 2018; Komárek et al. 2020; Salazar et al. 2020). Jako polyfyletické se ukázaly mnohé další rody, kokální – *Chroococciopsis* (Cumbers & Rothschild 2014), *Merismopedia* (Shen et al. 2018), *Chamaesiphon* (Loza et al. 2013; Kurmayer et al. 2018), *Synechocystis* (Korelusová et al. 2009), *Cyanothece* (Mareš et al. 2019a), *Chroococcus* (Komárková et al. 2010), i vláknité – *Nostoc* (Cordeiro et al. 2020), *Lyngbya* (Engene et al. 2010), *Leptolyngbya* (Johansen et al. 2011), *Oscillatoria* (Hauerová et al. 2021), *Spirulina* (Nübel et al. 2000), *Phormidium* (Sciuto et al. 2012), *Pseudanabaena* (Yu et al. 2015; Kim et al. 2021) *Limnothrix* a *Geitlerinema* (Perkerson III et al. 2010) a mnohé další.

Důvodů, proč se polyfyletismus objevuje u tolika tradičních morfologicky definovaných taxonomických jednotek, je několik. Práce Dvořák et al. (2014a) je shrnuje na příkladu rodu *Synechococcus s.l.* Značnou roli v evolučním formování hraje ekologická adaptace, díky které konvergentně vznikají stejné morfologické znaky, jako je postavení tylakoidů, tvar buněk, či formace kolonií (Dvořák et al. 2014a). Tento model lze označit jako model seriální konvergence (Jahodářová et al. 2018). V některých případech se naopak linie oddělily ve velmi dávné době a dodnes si zachovaly podobný plesiomorfni fenotyp (Mareš et al. 2019b). Starobylost dodnes uchovaných morfologických forem dokazují i četné mikrofosilie takřka nerozeznatelné od některých v současnosti známých druhů (Krings & Harper 2019; Krings 2021). U většiny bakterií včetně sinic dochází k výraznému horizontálnímu genetickému přenosu a homologní rekombinaci, což fylogenetickou rekonstrukci o to více komplikuje (Dvořák et al. 2014a). Díky jejich všudypřítomnosti je pravděpodobnost těchto transferů vysoká.

Polyfyletismus morfologicky definovaných skupin je častý právě u sinic s jednoduchou stavbou buňky nebo univerzálním typem kolonie. Zde se projeví limity morfologického přístupu v důsledku omezeného množství rozeznatelných morfologických odlišností (Komárek 2018). Rovněž existuje opačný případ, kdy bylo historicky ustanoveno dva a více taxonů, které však sdílejí morfologický překryv (Komárek et al. 2014), např. *Merismopedia punctata*, *M. hyalina* a *M. tranquilla* (Meyen 1839; Kützing 1845; Trevisan 1845).

Užitečným parametrem pro determinaci polyfyletických taxonů je i postavení tylakoidů. Existuje několik možností, jak jsou uvnitř buňky tylakoidy uspořádány, a toto

uspořádání částečně odpovídá i evolučně odděleným skupinám (Komárek & Kaštovský 2003). Základní typy postavení tylakoidů jsou parietální, paralelní, radiální, fascikulární a nepravidelné. Tento upravený systém byl použit ve velké molekulární revizi pro ustanovení většiny současných řádů (Komárek et al. 2014). Práce Mareš et al. (2019b) tuto myšlenku upřesňuje a částečně vyvrací. Ve skutečnosti jsou různé typy tylakoidů dobrým rozlišovacím znakem pro některé monofyletické skupiny rozdílných taxonomických úrovní. Zejména v rámci řádu Synechococcales není postavení tylakoidů příliš dobrým rozlišovacím znakem, jelikož řád samotný je vysoce polyfyletický (Salazar et al. 2020). V evoluci tylakoidů totiž docházelo ke značné konvergenci a četným homoplasím obdobně jako u samotného tvaru buněk, patrně zejména u rodu *Synechococcus s.l.* (Dvořák et al. 2014a). Několik vzorů je relativně dobře aplikovatelných. U celého bazálního řádu Gloeobacterales tylakoidy chybí úplně (Mareš et al. 2013; Rahmatpour et al. 2021). Paralelní postavení je unikátní pro malou monofyletickou skupinu kolem rodu *Geminocystis*. Rod *Cyanothece s.s.* má unikátní radiální postavení s nepravidelnostmi v centru buňky. Nepravidelné uspořádání je typické pro velkou skupinu evolučně mladých větvených vláknitých sinic. Tato skupina je však sama parafyletická a fascikulární uspořádání se vyvinulo několikrát nezávisle i mimo tuto skupinu (Mareš et al. 2019b). Postavení tylakoidů sehrálo roli v taxonomii rodů *Chroococcus s.l.* (Wang et al. 2021), *Cyanothece s.l.* (Mareš et al. 2019a) či *Chamaesiphon s.l.* (Kurmayer et al. 2018).

Pro svou práci jsem si vybral čeleď Merismopediaceae. Jedná se o taxonomickou skupinu, která je charakteristická specifickým způsobem tvorby kolonií, a protože až na výjimky netvoří příliš velkou ekologickou dominantu, není předmětem mnoha studií.

## 1.2 Typový rod čeledi *Merismopedia* Meyen, 1839

Dalšími ortografickými variantami označení rodu *Merismopedia* jsou *Merismopoedia*, *Merismopoedium* či *Merismopedium* (Joosten 2006). První záznam o existenci rodu pochází z práce Meyen (1829), kde jej však autor zaznamenal pouze kresbou a nepřidal mu žádné taxonomické označení. Nepochybně se ale jednalo o zástupce rodu *Merismopedia* v dnešním pojetí (Joosten 2006). Poprvé bylo jméno *Merismopedia* použito v knize Neues System der Pflanzen-Physiologie (Meyen 1839). Popisuje ji jako: „Malou řasu z rodiny Ulv... tvořící čtverhranné tenké tabulky... nejčastěji se 16 stejně velkými buňkami.“ Rovněž ustavuje typový druh – *Merismopedia punctata* Meyen 1839. Toto jméno však Joosten (2006) považuje za synonymum *Merismopedia tranquilla*

Ehrenberg 1845. Tento druh byl totiž původně popsán pod názvem *Gonium tranquillum* Ehrenberg 1834 v poeticky pojmenované práci Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes (Ehrenberg 1834).

V průběhu historie se rodu nevyhnulo množství taxonomických transferů. Všechny sinice byly po dlouhou dobu považovány pouze za podskupinu řas (Meyen 1839; Trevisan 1845 aj.). Proto byl rod *Merismopedia* jako řasa nejprve zařazen v čeledi Ulvaceae (Meyen 1839). Po odštěpení samostatného oddělení Cyanophyta (ale stále v systému řas) jej např. Skuja (1956) zařazuje do řádu Chroococcales. I po oddělení sinic od řas a jejich zařazení k bakteriím je rod *Merismopedia* jako sinice stále řazen do řádu Chroococcales (Fott 1967). V rámci Chroococcales je rod na základě morfologie řazen do čeledi Microcystaceae, podčeledi Merismopedioideae (Komárek & Anagnostidis 1986; Hindák 1992). Komárek & Anagnostidis (1999) vyčleňují Merismopediaceae jako samostatnou čeleď s podčeledí Merismopedioideae. Dle nejnovější taxonomické úpravy na základě molekulární fylogenetické analýzy byla čeleď Merismopediaceae přesunuta do řádu Synechococcales (Komárek et al. 2014).

Taxonomická situace uvnitř rodu také prošla vývojem. Práce Palińska et al. (1996) ukazuje, že mezi druhy popsány na základě morfologie je patrná výrazná fenotypová variabilita. Navrhuje dokonce, že tři zkoumané druhy – *M. glauca*, *M. punctata* a *M. elegans* jsou tím samým druhem, tzv. „genospecies“ s různým fenotypovým projevem. „Genospecies“ jsou definovány na základě molekulárních dat (Palińska et al. 1996). Naproti tomu pojem „morphotaxon“ (analogicky „morphospecies“ atd.) označuje taxonomickou skupinu definovanou pouze na základě morfologických znaků (Zapomělová et al. 2007; Skácelová & Zapomělová 2010; Komárek 2018) a „ecotaxon“ pak morfologicky podobné taxony definované ekologií a distribucí (Palińska & Krumbein 1995; Joosten 2006; Komárek 2016, 2018).

Druhové uspořádání v rámci rodu je z molekulárního hlediska poměrně málo známo. V současné době je popsáno 42 druhů tohoto rodu, uváděno je rovněž 18 infraspecifických jmen (Guiry & Guiry 2022). Dle NCBI (Agarwala et al. 2018) jsou známy pouze u tří určených druhů (*M. punctata*, *M. glauca* a *M. tenuissima*) (Dvořák et al. 2017) a rovněž množství sekvencí rodu *Merismopedia* bez určené druhové identity. Některé sekvenované kmeny však v původní literatuře byly určeny jinak, než pod jakým názvem byla vložena jejich sekvence (Palińska et al. 1996; Furtado et al. 2009; Albrecht et al. 2017). Molekulárních studií zahrnujících rod *Merismopedia* navíc není příliš mnoho a často se

vůbec nesoustředí na rod jako takový. Práce Thomazeau et al. (2010) na základě dvou izolovaných kmenů *M. punctata* ze subsaharské Afriky zařazuje rod do řádu Chroococcales a tvrdí, že je monofyletický.

Studie Rajaniemi-Wacklin et al. (2006) zařazuje *M. glauca* do bezprostřední blízkosti kmenů rodu *Synechocystis*, *Woronichinia* a *Snowella*. Zároveň ale tato práce potvrzuje komplikovanou situaci uvnitř rodu, jelikož jsou zde patrné dvě samostatné linie, kam spadají dva různé kmeny *M. glauca*. Náznaky polyfyletismu zaznamenávají i studie Furtado et al. (2009) a Shen et al. (2018). Polyfyletismus byl naznačen i na základě metagenomického sekvenování a porovnání ampliconů 16S rRNA. Li et al. (2020) ale operuje pouze s OTUs a nediskutuje jejich umístění do jednotlivých klastřů.

### 1.2.1 Ekologie

Práci zaměřujících se přímo na ekologii rodu *Merismopedia* není mnoho (Hindák 1992; Aktan & Aykulu 2003; Joosten 2006). Většina informací o ekologických preferencích a rozšíření pochází z různorodých lokálních floristických studií (Brannon 1952; Skuja 1956; Hindák 1992; Silva & Pienaar 1999; Aktan & Aykulu 2003; Lederer & Lukavský 2003; Furtado et al. 2009; Skácelová & Zapomělová 2010) či ze shrnující určovací literatury (Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999; McGregor 2013; Kaštovský et al. 2018). Přesto bývá často typ biotopu, ve kterém je organismus nalezen, zásadním určovacím znakem (Joosten 2006; Kaštovský et al. 2018). V tomto případě se ovšem často jedná o arbitrární rozhodnutí při popisu nového druhu a pravděpodobně neodpovídá druhovému pojetí z genetického hlediska (Palińska et al. 1996; Joosten 2006).

Není známo, že by r. *Merismopedia* v ekosystémech hrál zásadní roli. Biomasou až na výjimky (Somashekar 1983; Keliri et al. 2021) nijak nepřevyšuje ostatní fytoplanktonní zástupce. Zástupci jsou obecně považováni za složku ekosystému bez zásadních trofických interakcí. To jednak kvůli poměrně pomalému růstu kolonií a malé abundanci, a jednak kvůli faktu, že nejsou příliš častou složkou potravy spásáčů ani filtrátorů. Zároveň se díky pomalému růstu kolonií a dlouhé generační době stávají sinkem uhlíku (Bell & Tranvik 1993). Některé druhy mohou být použity jako bioindikátory v kontrole kvality vod (Radwan et al. 2018).

Většina druhů je sladkovodní, nejčastěji planktonní a metafyttonní. Několik málo druhů je vázáno na salinní biotopy, jako jsou slaniska či bentos mořského litorálu. Mezi takové patří např. *M. affixa* (Silva & Pienaar 1999; Pliński & Komárek 2017) či

*M. mediterranea* (Komárek & Anagnostidis 1999; Kaštovský et al. 2018; Guiry & Guiry 2022). V tomto kontextu jsou zajímavá zjištění v práci Palinska et al. (1996), která dokazuje vysokou odolnost vůči změně salinity u běžných sladkovodních druhů jako *M. elegans* či *M. punctata*. I primární zdroje hovoří o *M. glauca* jako o druhu nalézaném v mořské vodě (Kützing 1845). Aktan & Aykulu (2003) pak usuzují, že přítomnost tohoto druhu v mořském litorálu je dána eutrofizací pobřežních vod odpadními vodami. Jsou známy i aerofytické druhy jako *M. minima*, či druhy specializované na specifické biotopy. Mezi ně patří např. *M. sphagnicola* vázaná na oligotrofní rašelinné tůňky (Joosten 2006).

Za jeden z nejrozšířenějších a nejběžnějších druhů je považován druh *M. tenuissima*. Je nacházen v rámci velkého počtu floristických studií ve všech typech stojatých sladkovodních biotopů od oligotrofních skandinávských jezer po brazilské odpadní vody (Skuja 1956; Rojo & Alvarez Cobales 1992; Bell & Tranvik 1993; Aktan & Aykulu 2003; Furtado et al. 2009; Tian et al. 2012; Shen et al. 2018 aj.). *M. tenuissima* je dokonce prvním a dodnes jediným zástupcem rodu, u kterého byla zaznamenána tvorba sinicových toxinů, konkrétně microcystinu (Furtado et al. 2009). Kromě toho se předpokládá, že se vůči ostatním zástupcům fytoplanktonu může chovat alelopaticky, chybí pro to však více důkazů (Bell & Tranvik 1993).

*M. punctata* je dalším planktonním druhem nalézaným ve velkém množství floristických studií (Skuja 1956; Pentecost 2014; Albrecht et al. 2017; Yarovy et al. 2017 aj.), podle práce Kützing (1845) se nalézá rovněž v mořské vodě. Dokonce u něj, jako u jediného ze dvou byla zaznamenána tvorba vodního květu. Druhým takovým druhem je *M. tenuissima* (Somashekar 1983; McGregor et al. 2007; Keliri et al. 2021). Velmi často bývá rovněž nalézán především metafytovní a bentický druh *M. glauca*. Obdobnou ekologii a habitus má *M. elegans*, ta se však od *M. glauca* odlišuje větší velikostí buněk (Komárek & Anagnostidis 1999).

## 1.2.2 Morfologie

Rod *Merismopedia* je charakteristický kombinací několika morfologických znaků. Ploché kolonie jsou tvořeny navzájem kolmými řadami buněk. Dělení buněk je za normálního stavu synchronizované časově i prostorově, což dává vzniku charakteristického pravidelného postavení. Buňky se dělí na dvě stejně velké dceřiné. Dělení probíhá vždy rovnoběžně s rovinou kolonie ve dvou na sebe kolmých směrech. Řady buněk mohou být u některých druhů v pozdější fázi vývoje posunuté, či mírně nepravidelné (Komárek &

Anagnostidis 1986; Hindák 1992; Joosten 2006). Celá kolonie je obalena slizem, který je v naprosté většině případů průhledný, u některých druhů jasně ohraničený. Kulovité, po dělení polokulovité buňky mohou mít samostatné slizové obaly, u některých druhů obligátně. Obsah buněk je bledě modrý, modro- či šedozelený až načervenalý (Komárek & Anagnostidis 1999). Několik málo druhů, např. *M. paludosa*, má buňky čtvercové (Bennett 1886).

Od ostatních rodů v rámci čeledi Merismopediaceae se *Merismopedia* odlišuje pravidelným uspořádáním buněk do navzájem kolmých řad a zároveň kulovitým, při dělení polokulovitým tvarem buněk. Další rod v rámci čeledi tvořící navzájem kolmé řady je *Cyanotetras* (Komárek & Anagnostidis 1999). Ostatní rody čeledi buď kolonie netvoří vůbec, jako např. *Limnococcus* sp., či jsou jejich kolonie uspořádané nepravidelně jako u rodů *Microcrocis* nebo *Pannus* (Kaštovský et al. 2018). Kolonie tvořené navzájem kolmými řadami jsou v této čeledi charakteristické i pro rod *Eucapsis* (Hindák 1992). Dělení *Eucapsis* však probíhá ve třech směrech, a tudíž je jeho výsledkem pravidelná krychlovitá kolonie (Clements & Shantz 1909; Komárek et al. 2016).

Odhlédneme-li od toho, že morfologické znaky se mezi některými druhy překrývají, což může určování komplikovat, lze pro jejich determinaci použít některé významné morfologické znaky (Komárek & Anagnostidis 1999; McGregor 2013; Kaštovský et al. 2018). Druhů schopných tvořit aerotopy není v celkovém poměru mnoho a charakter aerotopů je většinou sám o sobě druhově specifický (Komárek & Anagnostidis 1999). Samostatnou linii aerotopy tvořících druhů představují *M. insignis*, *M. trolleri* a *M. marssonii* (Komárek 2015). *M. insignis* má v každé buňce jen 1–2 aerotopy, buňky jsou mírně protáhlé. Malé buňky do 2  $\mu\text{m}$  s více aerotopy jsou charakteristické pro *M. marssonii*, buňky větší než 2  $\mu\text{m}$  má *M. trolleri* (Lemmermann 1900; Bachmann 1920; Komárek & Anagnostidis 1999; Kaštovský et al. 2018). Hindák (1992) však uvádí, že *M. marssonii* nemívá více než 3 centrální aerotopy. Stejně jako Joosten (2006) však uvádí jako typický znak prstovité vychlípeniny aerotopů.

U druhů bez aerotopů je pak prvním determinačním znakem velikost buňky. Arbitrárně lze tuto skupinu rozdělit na druhy s malými buňkami do 2–2,4  $\mu\text{m}$  a druhy s buňkami většími (Komárek & Anagnostidis 1999; Kaštovský et al. 2018). Problematický přechod zde tvoří dva tradiční druhy, *M. hyalina* a samotný typový druh *M. punctata* (viz 1.2.4 Fylogenetické problémy a otázky). Buňky jsou u většiny druhů v rámci kolonie nahloučeny. Prostory mezi buňkami větší než dva průměry buňky jsou typické pro druhy

*M. danubiana* a *M. duplex* (Playfair 1918; Hortobágy 1974). Naprostá většina druhů tvoří kolonie mikroskopické, jen malá skupina makroskopicky viditelné (Kützing 1849; Askenazy 1894; Skácelová & Zapomělová 2010). Kolonie může být jasně zprohýbaná až srolovaná, což je typický znak pro *M. convoluta* (Kützing 1849). Lehce zvlhčené kolonie pak může mít *M. elegans* (Komárek & Anagnostidis 1999) či *M. africana* (Komárek & Cronberg 2001). Kolonie je u některých druhů rozdělena do subkolonií – pravidelných skupin buněk více či méně oddělených od sebe vrstvou slizu. Rozdělení do subkolonií je typické např. pro *M. glauca*, *M. tenuissima* či *M. convoluta* (Kützing 1849; Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999).

Kolonie všech druhů jsou obaleny společným slizovým obalem (Komárek & Anagnostidis 1986). U většiny druhů je sliz neohraničený, viditelný jen při barvení. Často se jeho vlastnosti mezi koloniemi téhož druhu mění od neohraničeného hyalinního po jasně ohraničený, jako např. u *M. punctata* (McGregor et al. 2007; McGregor 2013). Naopak jasně ohraničený sliz je typický pro *M. elegans* (Komárek & Anagnostidis 1999). Buňky některých druhů jako *M. minutissima* jsou obaleny samostatnou, jasně viditelnou slizovou pochvou (McGregor 2013).

U jediného druhu *M. ferrophila* je známa tvorba železitých kongrecí (Hindák 1982). Není však jasné, zda se nejedná o komplex více taxonů určených jako jeden druh vzhledem k poměrně velkému rozpětí velikosti buněk (Hindák 1982; Komárek & Anagnostidis 1999). Je také možné, že se jedná o jev vyskytující se u více druhů popsaných samostatně, způsobený specifickými vlastnostmi prostředí, a *M. ferrophila* jako samostatný „genospecies“ neexistuje.

### 1.2.3 Přehled taxonomicky platných druhů rodu *Merismopedia*

S pomocí databází Algaebase (Guiry & Guiry 2022), Index Nominum Algarum (Silva 2022), Nucleotide (Agarwala et al. 2018) a Global Catalogue of Microorganisms (Wu et al. 2017) jsem vytvořil přehledný seznam současně akceptovaných druhů rodu *Merismopedia* společně se synonymy i původními ortografickými variantami jmen (Tab. II). Bral jsem v úvahu, zda je druh jasně definován – byl popsán dostatečně obsáhle, s přiřazenou kresbou v primárním zdroji, či je brán jako jasně definovaný druh v determinační literatuře. Pro větší přehlednost používám symboly shrnuté v tabulce (Tab. I)

**Tab. I.** Symboly použité v přehledu druhů rodu *Merismopedia*.

Symbol	Význam
(B)	Basyonym
(O)	Původní ortografická varianta
*	Taxon nalezen od popisu opakovaně
+	Taxon nalezen od popisu pouze v jednotkách případů
-	Kmen v kultuře / sekvence / nález od popisu nenalezeny

**Tab. II.** Přehled současně taxonomicky uznávaných druhových označení rodu *Merismopedia sensu* Guiry & Guiry (2022).

Druh	Synonyma	Jasná definice	Kmen v kultuře	Sekvence	Nález od popisu	Reference	Poznámka
<b><i>Merismopedia punctata</i></b>							
<b>Meyen 1839 nom. inval.</b>							
	<i>Gonium tranquillum</i> Ehrenberg 1834 (B)						
	<i>Agmenellum tranquillum</i> (Ehrenberg) Trevisan 1842	Ne	CCAP 1448/2, NIVA-CYA 16	16S rRNA	*	Meyen 1829, 1839; Ehrenberg 1834	Extrémně nejasné vymezení vůči několika taxonům
	<i>Merismopedia kuetzingii</i> Nägeli 1849						
	<i>Merismopedia convoluta</i> f. <i>minor</i> Wille 1922						
	<i>Merismopedia haumanii</i> Kufferath 1942						
<b><i>Merismopedia affixa</i></b>							
<b>Richter 1895</b>							
	<i>Merismopedium affixum</i> Richter 1895 (O)	Ano	-	-	*	Richter 1895	Indické nálezy (Gupta 2012) asi samostatný druh
<b><i>Merismopedia africana</i></b>							
<b>Komárek a Cronberg 2001</b>							
		Ano	-	-	-	Komárek & Cronberg 2001	
<b><i>Merismopedia angularis</i></b>							
<b>Thompson 1939</b>							
		Ano	NIVA-CYA 199	-	*	Thompson 1939	
<b><i>Merismopedia arctica</i></b>							
<b>Anagnostidis 1995</b>							
	<i>Merismopedia punctata</i> f. <i>arctica</i> Kosinskaja 1933 (B)	Ano	-	-	*	Komárek & Anagnostidis 1995	
<b><i>Merismopedia boreocaspica</i></b>							
<b>Henckel 1909 nom. inval.</b>							
		Ne	-	-	*	Henckel 1909	Bez obrázku, vágní popis



<i>Merismopedia cantonensis</i> <b>Chu 1987</b>	Ano	-	-	*	Nenalezena původní publikace	
<i>Merismopedia caspica</i> <b>Henckel 1909 nom. inval.</b>	Ne	-	-	*	Henckel 1909	Bez obrázku, vágní popis
<i>Merismopedia chondroidea</i> <b>Wittrock 1878</b>						
<i>Merismopedium</i> <i>chondroideum</i> Wittrock 1878 (O)	Ano	-	-	*	Wittrock & Nordstedt 1878	
<i>Merismopedia convoluta</i> <b>Brébisson ex Kützing 1849</b>						
<i>Merismopoedia</i> <i>convoluta</i> Brébisson ex Kützing 1849 (O)	Ano	CCAP 1448/3,	-	*	Kützing 1849	Nejasná determinace v kultuře – shodné s kmeny SAG 48.79 a CCALA 099 jako <i>M. glauca</i>
<i>Pseudoholopedia</i> <i>convoluta</i> (Brébisson) Elenkin 1938		1481/1				
<i>Merismopedia willei</i> N.L.Gardner 1927						
<i>Merismopedia danubiana</i> <b>Hortobágyi 1974</b>	Ne	-	-	*	Hortobágyi 1974	Nejasné vymezení vůči <i>Coccolopedia</i> <i>linnetica</i> (Hindák 1992)
<i>Merismopedia duplex</i> <b>Playfair 1918</b>						
<i>Merismopedium duplex</i> Playfair 1918 (O)						
<i>Merismopedia cyanea</i> Playfair 1918	Ano	-	-	*	Playfair 1918	
<i>Merismopedia distans</i> Fedorov 1970						
<i>Merismopedia distans</i> Messikommer 1971						
<i>Merismopedia elegans</i> <b>Braun ex Kützing 1849</b>						
<i>Merismopoedium</i> <i>elegans</i> (O)	Ano	UTEX LB 1902 jako <i>Merismo-</i> <i>pedia</i> sp. cf. <i>M.</i> <i>elegans</i>	16S rRNA jako <i>M. glauca</i>	*	Kützing 1849	
<i>Merismopedia ferrophila</i> <b>Hindák 1982</b>	Ano	-	-	*	Hindák 1982	
<i>Merismopedia gardneri</i> <b>(Collins) Setchell 1906</b>						
<i>Prasiola gardneri</i> Collins 1904 (B)	Ne	-	-	+	Gardner 1906	Vágní popis bez obrázku
<i>Merismopedia glauca</i> <b>(Ehrenberg) Kützing 1845</b>						
<i>Gonium glaucum</i> Ehrenberg 1838 (B)	Ano	SAG 48.79, CCALA 099, CCAP 1448/2	Celý genom	*	Ehrenberg 1834; Kützing 1849	
<i>Merismopedia aerugi-</i> <i>nea</i> Brébisson 1849						
<i>Merismopedia nova</i> Wood 1873						
<i>Merismopedia hyalina</i> <b>(Ehrenberg) Kützing 1845</b>						
<i>Gonium hyalinum</i> Ehrenberg 1832 (B)	Ne	-	-	*	Kützing 1845	Překryv s <i>M. punctata</i>
<i>Merismopedia insignis</i> <b>Shkorbatov 1923</b>						
<i>Merismopedia glauca</i> f. <i>insignis</i> (Skorbatov) Geitler 1925	Ano	UTEX 550 jako <i>M. glauca</i> f. <i>insignis</i>	-	*	Nenalezena původní publikace	
<i>Merismopedia jeanne-</i> <i>lii</i> H.Bachmann 1938						

<b><i>Merismopedia litoralis</i></b> <b>(Ørsted) Rabenhorst 1865</b>						
<i>Erythroconis litoralis</i> Ørsted 1842 (B)						
<i>Merismopedia littoralis</i> (Ørsted) Rabenhorst 1865						
<i>Merismopedia glauca</i> subsp. <i>amethystina</i> Lagerheim 1883	Ne	-	-	*	Ørstedt 1842; Rabenhorst 1865	Komárek & Anagnostidis (1999) vyžadují revizi
<i>Merismopedia elegans</i> var. <i>mandalensis</i> Wille 1900						
<i>Merismopedia</i> <i>massartii</i> Kufferath 1942						
<b><i>Merismopedia major</i></b> <b>Kützing 1849</b>	Ano	-	-	*	Kützing 1849	
<b><i>Merismopedia marssonii</i></b> <b>Lemmermann 1900</b>						
<i>Merismopedium</i> <i>Marssonii</i> Lemmerman n 1900 (O)	Ano	-	-	*	Lemmermann 1900	
<b><i>Merismopedia mediterranea</i></b> <b>Nägeli 1849</b>						
<i>Merismopedia glauca</i> f. <i>mediterranea</i> (Nägeli) Collins 1910	Ne	-	-	*	Nägeli 1849	Kolonie s červenými buňkami asi jiný taxon (Komárek & Anagnostidis 1999)
<b><i>Merismopedia messikommeri</i></b> <b>Joosten 2006</b>						
<i>Merismopedia distans</i> Messikommer 1972 (B)	Ano	-	-	-	Joosten 2006	
<b><i>Merismopedia minima</i></b> <b>Beck 1897</b>						
<i>Merismopoedium</i> <i>minimum</i> Beck 1897 (O)	Ne	-	-	*	de Beck & Zahlbruckner 1897	Nejasné ekologické vymezení vůči <i>M. warmin-</i> <i>giana</i>
<b><i>Merismopedia minutissima</i></b> <b>Joosten 2006</b>						
<i>Merismopedia paludosa</i> Bennett 1886	Ano	-	-	-	Bennett 1886	
<b><i>Merismopedia quadruplicata</i></b> <b>(Meneghini) Trevisan 1845</b>						
<i>Trochiscia quadruplicata</i> Meneghini 1837 (B)						
<i>Agmenellum</i> <i>quadruplicatum</i> (Meneghini) Brébisson 1839	Ne	-	-	*	de Brébisson 1839; Trevisan 1845	Komárek & Anagnostidis (1999) vyžadují revizi, původní popis vágní bez obrázku
<b><i>Merismopedia regularis</i></b> <b>Komárek &amp; Cronberg 2001</b>						
<i>Merismopedia remota</i> Hirose & Chung 1970	Ne	-	-	-	Nenalezena původní publikace	INA tento druh neuvádí (Silva 2022)
<b><i>Merismopedia revoluta</i></b> <b>Askenazy 1894</b>						
<i>Merismopoedia</i> <i>revolutiva</i> (O)	Ano	-	-	*	Askenazy 1894	
<b><i>Merismopedia sinica</i></b> <b>Ley 1947</b>						
<i>Merismopedia smithii</i> De Toni 1939	Ano	-	-	*	Smith 1920	Evropské nálezy asi

<i>Merismopedia elegans</i> var. <i>major</i> G.M.Smith 1920 (B)						špatně určené (Komárek & Anagnostidis 1999)
<i>Merismopedia maior</i> (G.M.Smith) Geitler 1925						
<b><i>Merismopedia sparsa</i> Komárek &amp; Cronberg 2001</b>	Ano	-	-	*	Komárek & Cronberg 2001	
<b><i>Merismopedia sphagnicola</i> Joosten 2006</b>	Ano	-	-	*	Joosten 2006	Od <i>M. glauca</i> se liší jen ekologií (Joosten 2006)
<b><i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann 1898</b>						
<i>Merismopedium</i> <i>tenuissimum</i> Lemmermann 1898 (O)	Ne	CHAB 7021, NIES-230	16S-23S rRNA, cpcB, cpcA	*	Lemmermann 1898	Nejasná horní hranice velikosti buněk
<b><i>Merismopedia tereki</i> A.Henckel 1909 nom. inval.</b>						
<i>Aulacodiscus exiguus</i> var. <i>undulata</i> Ratray 1888 (B)	Ne	-	-	-	Henckel 1909	Popis vágní bez obrázku, obrázek v Ratray (1888) vůbec nevypadá jako <i>Merismopedia</i>
<b><i>Merismopedia thermalis</i> Kützing 1843</b>						
<i>Merismopodia</i> <i>thermalis</i> Kützing 1843 (O)	Ano	-	-	*	Kützing 1843	
<i>Agmenellum thermale</i> (Kützing) Drouet & Daily 1956						
<b><i>Merismopedia tranquilla</i> (Ehrenberg) Trevisan 1845</b>						
<i>Gonium tranquillum</i> Ehrenberg 1834 (B)						
<i>Merismopedia</i> <i>punctata</i> Meyen 1839						
<i>Agmenellum tranquil-</i> <i>lum</i> (Ehrenberg) Trevisan 1842	Ne	-	-	*	Ehrenberg 1834; Trevisan 1845	Nejasné vymezení vůči <i>M. punctata</i>
<i>Merismopedia</i> <i>kuetzingii</i> Nägeli 1849						
<i>Merismopedia</i> <i>convoluta</i> f. <i>minor</i> Wille 1922						
<i>Merismopedia</i> <i>haumanii</i> Kufferath 1942						
<b><i>Merismopedia trolleri</i> Bachmann 1920</b>	Ano	-	-	*	Bachmann 1920	
<b><i>Merismopedia vangoorii</i> Joosten 2006</b>	Ano	-	-	*	Joosten 2006	
<b><i>Merismopedia venezuelica</i> Schiller 1956</b>	Ano	-	-	*	Schiller 1956	
<b><i>Merismopedia violacea</i> Kützing 1849</b>						
<i>Merismopedium</i> <i>violaceum</i> Kützing 1849 (O)	Ano	-	-	+	Kützing 1849	
<b><i>Merismopedia warmingiana</i> (Lagerheim) Forti 1907</b>	Ne	-	-	*		Synonymita dle De Toni (1907)

<i>Merismopedia hyalina</i> subsp. <i>warmingiana</i> Lagerheim 1883 (B)	Lagerheim 1883; De Toni 1907	s <i>M. punctata</i> f. <i>minor</i> , ale neodpovídá velikostí, nejasný vztah s <i>M. minima</i>
<i>Merismopedia punctata</i> f. <i>minor</i> Lagerheim 1883		

#### 1.2.4 Fylogenetické problémy a otázky

Zásadním systematickým problémem je polyfyletický status samotného rodu. Práci zabývajících se fylogenezí rodu nebo čeledi není mnoho, a ne vždy se jejich výsledky podporují (Palińska et al. 1996; Rajaniemi-Wacklin et al. 2006; Furtado et al. 2009; Thomazeau et al. 2010; Shen et al. 2018), ale současný pohled na tuto problematiku je takový, že *Merismopedia* je sice taxonem polyfyletickým, není však jasné, na kolik samostatných skupin se rozpadá a kam přesně spadají jednotlivé druhy.

Dále se vyskytují nesrovnalosti ohledně typového druhu, a tedy i stanovení, která z linií představuje rod *Merismopedia* s.s. Obecně ustálené pojmenování *Merismopedia punctata* je dle botanického kódu ilegitimní (Joosten 2006), avšak v literatuře takřka bez výjimky používané. Původně byl tento organismus pojmenován *Gonium tranquillum* Ehrenberg 1834 (Ehrenberg 1834) pro podobnost se zelenou řasou rodu *Gonium*. Tatáž publikace ovšem zahrnuje i popis organismu *Gonium punctatum*, lišícího se od *G. tranquillum* černými tečkami uvnitř buněk – patrně aerotopy. Popis *G. tranquillum* v této publikaci přesně odpovídá dnešnímu chápání rodu *Merismopedia*. Avšak Meyen (1839) tento organismus pojmenovává *Merismopedia punctata* bez přesného popisu a ilustrace. Rovněž připouští, že tento organismus byl popsán pod dvěma názvy, *Gonium tranquillum* Ehrenberg 1834 a *Gonium glaucum* Ehrenberg 1838. Toto pojmenování je tím pádem v rozporu s botanickým kódem, nicméně je po celou dobu až na výjimky používáno v literatuře (Joosten 2006). Neplatně je druh *M. punctata*, resp. *M. tranquilla* označen i v práci de Brébisson (1839) jako *Agmenellum tranquillum*. Dle botanického kódu je tento organismus platně popsán až v práci Trevisan (1845) jako *Merismopedia tranquilla* (Ehrenberg) Trevisan 1845 v domnění, že jde o jiný druh než *M. punctata*. Popisy jsou však téměř identické, jen se mírně liší velikostí buněk, a je tedy logické předpokládat, že se jedná o tentýž druh s běžnou variabilitou ve velikosti buněk (Ehrenberg 1834; Joosten 2006).

Určování typového druhu *M. punctata* rovněž komplikuje morfologický překryv s druhem *M. hyalina*. Původně byl tento organismus popsán dokonce dříve než *M. punctata*, byl však zařazen do jiného rodu (Ehrenberg 1832). Determinační literatura udává pro *M. punctata* počet buněk 16–64(–128) a velikost buněk (2–)2,5–3,6(–4)  $\mu\text{m}$ . Zatímco druh

*M. hyalina* by měl mít 4–8(–16) buněk v kolonii, pouze vzácně více, a jejich velikost by se měla pohybovat v rozmezí (1–)2–3(–3,5?)  $\mu\text{m}$ , McGregor (2013) udává počet buněk v kolonii *M. punctata* 2–16(–64) a Hindák (1992) dokonce *M. punctata* popisuje v podstatě stejně, jako Komárek & Anagnostidis (1999) popisují *M. hyalina*. Autoři se neshodují ani na jednoznačném odlišení podle barvy buněčného obsahu, přestože práce McGregor et al. (2007) navrhuje, že barva buněčného obsahu *M. hyalina* by měla být spíše šedivá a *M. punctata* bledě modrozelená. Předpokládá se tedy, že by tyto dva tradiční druhy mohly ve skutečnosti být jediným taxonem (Komárek & Anagnostidis 1999; Kaštovský et al. 2018).

Jednotu v taxonomicko-nomenklatorickém problému *M. punctata*, *M. tranquilla*, *M. hyalina* nepřinesla ani publikace Nägeli (1849), která vyvrací myšlenku se synonymitou *Gonium tranquillum* = *M. punctata* a *Gonium hyalinum* = *M. hyalina* na základě rozdílných velikostí buněk. Některé hodnoty, které v argumentaci používá, se ale neshodují s těmi publikovanými v citovaných publikacích. Není navíc jasné, zda jeho argumentace není podložena hodnotami založenými na rozdílné délce jednotky „palce“ používané v Prusku (Ehrenberg 1832, 1834) a ve Švýcarsku (Nägeli 1849). Navíc zde popisuje druh *Merismopedia kützingii* popisem téměř shodný s *M. tranquilla*, dnes považovaný za jeho synonymum (McGregor 2013).

Mnohé dnes akceptované druhy *sensu* Guiry & Guiry (2022) byly popsány neplatně, např. *M. caspica* (Henckel 1909), jiné nedokonale bez kresby či fotodokumentace, např. *M. tenuissima* (Lemmermann 1898), či nebyly od svého popisu vůbec nalezeny, např. *M. regularis* (Komárek & Cronberg 2001).

### 1.3 Čeleď Merismopediaceae

Čeleď Merismopediaceae je poměrně dávno ustanoveným taxonem, který však za svou historii dostal značných změn (Elenkin 1923). Na základě morfologických kritérií byla mj. považována i za podčeď Merismopedioideae (Microcystaceae, Chroococcales) zahrnující oproti dnešku i rody *Gomphosphaeria* a *Coelosphaerium* (Komárek & Anagnostidis 1986). Později byla opět ustanovena jako samostatná čeleď v řádu Chroococcales, stále na základě morfologie, rozdělená na podčeď Merismopedioideae a Gophosphaearioideae (Komárek & Anagnostidis 1999). Už na základě molekulárně fylogenetické analýzy byla ustanovena v poslední velké molekulárně-fylogenetické revizi do dnešní podoby, mnohé příbuzenské vztahy však zůstávají nejasné a dynamicky se vyvíjí

(Komárek et al. 2014; Komárek 2015). Morfologicky obsahuje pouze kokální formy – solitérní i tvořící kolonie. Kolonie pak mohou být nepravidelné i pravidelné složené z jedné vrstvy buněk, nebo krychlovité. Dělení probíhá nejčastěji ve dvou či třech rovinách, u koloniálních zástupců rozmnožování probíhá rozpadem kolonie (Komárek & Anagnostidis 1986, 1999; Hindák 1992; da Silva Malone et al. 2014; Komárek 2015; Komárek et al. 2016). Vzhledem k nejistému postavení taxonů v rámci čeledi pro účely této práce považují tuto skupinu jako čeleď Merismopediaceae *sensu* Komárek et al. (2014).

### 1.3.1 *Aphanocapsa* Nägeli, 1849

Typovým druhem velmi početného rodu je *Aphanocapsa parietina* (Nägeli ex Kützing) Nägeli 1849. V současné době je taxonomicky akceptováno 72 druhů (Guiry & Guiry 2022). Rod s tak velkým počtem druhů přirozeně disponuje značnou morfologickou variabilitou. Rozptyl velikosti buněk se pohybuje od 1  $\mu\text{m}$  až po 12  $\mu\text{m}$ . Mikroskopické, u některých druhů výjimečně makroskopické kolonie jsou kulovité, ale často nepravidelné a amorfní, většinou obalené neohraničeným slizovým obalem. Buňky jsou většinou kulovité, po dělení polokulovité, vzácně s vlastním slizovým obalem, v rámci kolonie umístěné nahusto i velmi volně, až nepravidelně. Barva obsahu buněk se pohybuje od světle modrošedé přes modrozelenou po olivově zelenou, někdy s jasně viditelnou periferní chromoplasmou. Aerotopy se v buňkách vyskytují jen zřídka. Rozmnožování probíhá rozpadem kolonie, výjimečně náhodným odloučením jednotlivých buněk (Komárek & Anagnostidis 1999; McGregor 2013; Kaštovský et al. 2018; Guiry & Guiry 2022).

Rod jako takový je kosmopolitní, známý ze všech typů biotopů. Některé druhy jsou vázané na specifické biotopy, jako aerofytické druhy *A. muscicola* či *A. fusco-lutea*. *A. thermalis* se specializuje na termální biotopy, druh *A. fonticola* je nacházen v čistých horských bystřinách i ve studních. Velké množství druhů je známo z mořského litorálu i bentosu běžných sladkovodních biotopů (Komárek & Anagnostidis 1999; Guiry & Guiry 2022), přičemž se spekuluje, že mořské druhy mohou patřit jinému rodu (Komárek et al. 2014). Jen relativně malé množství je typicky planktonní (Komárek 2015). Obecně je tento rod z molekulárního hlediska velmi málo probádán, zejména je potřeba značná revize planktonních a aerotopy tvořících druhů (Komárek et al. 2014; Guiry & Guiry 2022).

### 1.3.2 *Coccopedia* Troitzkaja, 1922

Nepočetný rod o třech druzích se vyznačuje plochými koloniemi, které pohromadě drží neohraničený slizový obal (Troitzkaja 1922). Dělení buněk probíhá stejně jako u rodu

*Merismopedia*, avšak buňky nejsou uspořádány do kolmých řad, pouze nepravidelně umístěny v tetradách v rámci společného slizového obalu (Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999). Typovým druhem je *Coccolopia limnetica* Troitzkaja, 1922, který Hindák (1992) považuje za druh shodný s *Merismopedia danubiana* kvůli stejnému volnému uspořádání buněk v kolonii a značnému překryvu velikosti buněk. I *C. andina* má nejasné systematické postavení a Komárek & Anagnostidis (1999) ji považují za zástupce rodu *Chroococciopsis*. *C. turkestanica* je jediný druh nalézáný v salinních biotopech (Guiry & Guiry 2022). Pro tento rod nejsou dostupná žádná molekulární data (Agarwala et al. 2018), navíc bývá nalézán jen zřídka (Guiry & Guiry 2022).

### 1.3.3 *Cyanotetras* Hindák, 1988

V tomto rodu jsou dnes uznávány pouze tři druhy. Typovým a zároveň jediným evropským druhem je *Cyanotetras fusca* Hindák 1988. Tento druh rovněž jako jediný vytváří železité konkrce. Na rozdíl od rodu *Merismopedia* má slizový obal nahnědlou barvu a tvoří souvislou oválnou až kulovitou masu (Hindák 1988). Kolonie jsou většinou jen čtverbuněčné, výjimečně jsou tvořeny větším počtem buněk. Druhy mimo Evropu jsou známé zejména ze střední Ameriky – *C. crucigenielloides* a *C. aerotopa* (Komárek 1995; Komárek & Komárková-Legnerová 2002; Muciño-Márquez et al. 2021). *C. crucigenielloides* se odlišuje mimo jiné i netypickým dělením kolonie do subkolonií a nepravidelným tvarem buněk (Muciño-Márquez et al. 2021). *C. aerotopa* je jediným druhem tohoto rodu tvořícím aerotopy. Skutečné systematické postavení je však podpořené pouze morfologicky a nejasné (Komárek & Komárková-Legnerová 2002).

### 1.3.4 *Eucapsis* Clements & Shantz, 1909

Rod *Eucapsis* je sice uváděn v rámci čeledi Merismopediaceae *sensu* Komárek et al. (2014), avšak Komárek & Anagnostidis (1999) jej uvádějí v rámci čeledi Microcystaceae. Po poslední obsáhlé molekulárně-morfologické revizi rodu je patrné, že je blíže příbuzný čeledi Merismopediaceae, ne-li skutečně její součástí (Komárek et al. 2016). Pro nedostatečné množství sekvenovaných taxonů však není postavení rodu jasné. Do dneška bylo popsáno 15 druhů (Komárek et al. 2016; Guiry & Guiry 2022). Typový druh *Eucapsis alpina* Clements & Schantz 1909 je však problematicky definovaný. Dle původního popisu ze Severní Ameriky je nejčastější počet buněk v kolonii 32–128 (Clements & Shantz 1909), avšak z Evropy a Jižní Ameriky je tento druh znám s menším počtem buněk, nejčastěji 8–16 (Guerrera & Ferrario 1978; Komárek et al. 2016). Je tedy možné, že se jedná o komplex

více taxonů. Tomuto předpokladu nahrává i fakt, že bylo popsáno pět různých variet tohoto druhu (Guiry & Guiry 2022). Druh *E. alpina* o malém počtu buněk by tedy správně měl být určován jako *E. pseudalpina* (Komárek et al. 2016). Na rozdíl od rodu *Merismopedia* se buňky dělí ve třech kolmých rovinách, a kolonie jsou tak typicky krychlovité (Komárek & Anagnostidis 1999).

Kolonie tvořené tímto způsobem jsou evidentně velmi starou ekologickou adaptací. Fosilie připomínající *Eucapsis* jsou nalézány na druhohorních nalezištích Nového Mexika (Beraldi-Campesi et al. 2004), ve Rhyne (Krings & Sergeev 2019) ze spodního devonu i v australském Paradise Creek ve starohorních stromatolitech (Licari et al. 1969).

### **1.3.5 *Limnococcus* Komárková et al., 2010**

Typovým druhem poměrně nedávno na základě molekulární revize ustanoveného rodu *Limnococcus* je *L. limneticus* Komárková et al. 2010. Do této doby byl rod považován pouze za podrod *Limnococcus* rodu *Chroococcus* (Komárek & Anagnostidis 1999; Komárková et al. 2010). Kulovité, po dělení polokulovité buňky jsou umístěny jednotlivě či po dvojicích v nepravidelné kolonii obalené jedním společným neohraničeným průhledným slizovým obalem. Počet buněk v kolonii je velmi variabilní i v rámci jednoho druhu. Dělení probíhá nepravidelně ve 2-3 na sebe kolmých směrech, což může občas vést k tvorbě kolonií podobných *Eucapsis* (Komárek et al. 2016).

Všechny druhy vzniklé rekombinací (*L. limneticus*, *L. dispersus*, *L. distans* a *L. cumulatus*) jsou známé jak ze sladké vody, tak z pobřežních mořských vod a morfologicky se liší zejména postavením buněk v rámci kolonie a jejich velikostí (Pliški & Komárek 2017). Kromě typového druhu je však jejich definice nejasná. Nejrecentněji popsáný druh *L. fonticola* je znám pouze z horských sladkovodních biotopů a od ostatních druhů se liší jasně ohraničeným a lamelovaným slizovým obalem. Je ale zřejmé, že tento druh má nepravidelně uspořádané tylakoidy a bude patrně nakonec umístěn mimo Synechococcales, tedy i mimo Merismopediaceae (Wang et al. 2021). Tomu odpovídají i výsledky posledních molekulárních revizí (Komárek et al. 2016; Wang et al. 2021).

### **1.3.6 *Mantellum* Dangeard, 1941**

Typovým druhem je *Mantellum adherens* Dangeard 1941. V současnosti jsou uznávány čtyři samostatné druhy. Všechny jsou známy jako epifytické zejména na vláknitých řasách a jiných sinicích, *M. commune* pak v kultuře tvoří neustonickou blanku (Hindák 2002). Dva druhy včetně typového jsou popsány ze salinních biotopů (Tavera &



Komárek 1996), druhé dva pak ze sladké vody (Komárek & Watanabe 1998). Rod jako takový je kosmopolitní a překvapivě ekologicky diverzní, nejsou však k dispozici žádná molekulární data, a tedy lze uvažovat o jisté kryptické diverzitě zejména u *M. commune* (Hindák 2002). Kolonie jsou tvořeny různým počtem buněk od čtyř po vyšší desítky. Starší kolonie vykazují náznak pravidelných řad (Komárek & Anagnostidis 1999; Hindák 2002).

### 1.3.7 *Microcrocis* Richter, 1892

Rané růstové fáze některých jiných taxonů (*Merismopedia*, *Synechocystis*) bývají často morfologicky velmi podobné raným vegetačním fázím *Microcrocis*. Proto bývalo morfologické vymezení jednotlivých druhů rodu *Microcrocis* poměrně nejasné (Fott 1972; Komárek & Anagnostidis 1999). Patrné je to u samotného typového druhu *Microcrocis dietelii* P.G.Richter syn *Microcrocis geminata* (Lagerheim) Geitler 1942, syn *Merismopedia* (subg *Holopedium*) *geminata*, Lagerheim 1883 syn *Holopedia geminata* (Lagerheim) Lagerheim 1893 syn *Holopedium dietelii* (Richter) Migula 1905 (Fott 1972; Pokorný et al. 2022 in review; Guiry & Guiry 2022).

Kolonie jsou ploché, mikroskopické, někdy makroskopicky viditelné (Lagerheim 1883; Kaštovský et al. 2018). Buňky v některých mladých koloniích tvoří pravidelné řady, starší kolonie pravidelnosti pozbývají (Fott 1972). Buňky jsou oválné až válcovité, u podrodu *Beckia* (Komárek & Anagnostidis 1999) s jasně polygonálním průřezem, s oblými konci, postavené nastojato v rovině kolonie. Většina druhů je sladkovodní, *M. sabulicola* a *M. marina* jsou známy jako mořské až brakické, *M. gigas* je druhem čistě brakickým (Komárek & Anagnostidis 1999). *M. pulchella* je sice popsán jako druh sladkovodní, avšak Werner a Sant'Anna (2006) jej nacházejí i v brakické vodě. Sladkovodní druhy preferují bentos méně úživných vod, sekundárně se pak nacházejí v planktonu, metafytonu a tychoplanktonu (Fott 1972; Skácelová & Zapomělová 2010). Žádný ze zástupců netvoří aerotopy, kolonie tvoří neohrazený slizový obal. Jediný druh *M. bella* tvoří mezi buňkami granule neznámého složení (Komárek & Anagnostidis 1999). Dosud nebyla dostupná žádná molekulární data (Agarwala et al. 2018).

### 1.3.8 *Pannus* Hickel, 1991

Typovým druhem je *Pannus spumosus* Hickel 1991. Kolonie tří ze čtyř známých druhů jsou duté, složené z velkého množství kulovitých buněk. Jen *P. planus* má po celý životní cyklus kolonie ploché. Mladé kolonie jsou nejčastěji sférické, v pozdějších fázích prodloužené, potrhané, až laločnaté (Komárek & Anagnostidis 1999; da Silva Malone et al.

2014). Buňky jsou ve vrstvě kolonie uspořádány nepravidelně (Kaštovský et al. 2018). Fylogenetické postavení rodu není i přes recentní molekulární analýzu jasné. Dříve jasné ukotvené aerotopy tvořící druhy *P. microcystiformis* a *P. leloupitii* byly přearženy do rodu *Sphaerocavum* (Azevedo & Sant' Anna 2003). Dle polyfázického přístupu bylo v práci Komárek (2015) potvrzeno zařazení rodu do čeledi Merismopediaceae. Nedávno popsany druh *P. brasiliensis* byl však na základě molekulárních dat zařazen do blízkosti rodu *Microcystis*, tedy čeledi Microcystaceae řádu Chroococcales (da Silva Malone et al. 2014). Naopak druh dříve označovaný za *Coelosphaerium punctiferum* (Komárek & Komárková-Legnerová 1992) byl přearžen do rodu *Pannus* jako *P. punctiformis* (Joosten 2006). Je tedy zřejmá nutnost obsáhlé revize tohoto rodu.

### 1.3.9 *Synechocystis* Sauvageau, 1892

Kmen zástupce tohoto rodu *Synechocystis* sp. PCC 6803 byl první sinicí, které byl sekvenován celý genom (Kaneko et al. 1995, 1996; Kaneko & Tabata 1997). Tento kmen je rovněž asi nejprostudovanějším kmenem sinice vůbec z molekulárního i fyziologického pohledu, protože je používán jako modelový organismus (Ajlaní & Vernotte 1998; Van De Meene et al. 2006; Sato et al. 2007; Zang et al. 2007; Tuji et al. 2021). Jak ukazují mnohé studie, rod *Synechocystis* s.s. je rodu *Merismopedia* pravděpodobně nejbližší fylogeneticky příbuzný (Palińska et al. 1996; Rajaniemi-Wacklin et al. 2006; Furtado et al. 2009; Korelusová et al. 2009; Dvořák et al. 2014b; Shen et al. 2018; Geng et al. 2021). Rod *Synechocystis* je však (stejně jako *Merismopedia*) zjevně polyfyletický (Korelusová et al. 2009; Komárek et al. 2014; Dvořák et al. 2017).

Na rozdíl od většiny zástupců čeledi *Merismopediaceae* rod *Synechocystis* tvoří kolonie jen vzácně, maximálně o tetradách buněk, a to pouze krátkou dobu po dělení (Hindák 1992). Buňky jsou typicky kulovité, po dělení polokulovité, většinou bez slizového obalu. Je-li sliz vyvinutý, bývá bez jasného ohraničení a v tenké vrstvě (Komárek & Anagnostidis 1999; Guiry & Guiry 2022). Většina druhů má buňky relativně malé, do cca 3,5 µm, např. *S. sallensis* však tvoří buňky o průměru až 30 µm (Komárek & Anagnostidis 1999).

Většina druhů včetně typového druhu *Synechocystis aquatilis* Sauvageau 1892 je planktonní, preferující salinní biotopy (Komárek 2015). Jiné druhy jsou ekologicky rozmanité, od epizoických (*S. tridemnii*) přes endogleické (*S. endobiotica*, *S. minima* a *S. pevalekii*) či subaerofytické (*S. buzasii*) po termofilní a mineralofilní (*S. thermalis*

a *S. minuscula*) (Komárek & Anagnostidis 1999; Komárek & Komárková-Legnerová 2002).  
Ve sladkovodních biotopech je relativně málo typicky planktonních druhů, spíše se jedná o druhy bentické či tychoplanktonní (Skuja 1956; Komárek & Anagnostidis 1999).

## 2 Cíle práce

Hlavními cíli této práce bylo:

- izolovat z environmentálních vzorků a kmenů čistou biomasu všech druhů z čeledi Merismopediaceae s pravidelnými koloniemi, které se podaří během přípravy bakalářské práce objevit;
- získat sekvence jejich úseků 16S rRNA a ITS;
- použít tyto sekvence pro fylogenetickou analýzu, získané výsledky vyhodnotit a konfrontovat s morfologií.

## **3 Materiál a metody**

### **3.1 Odběr vzorků**

Lokality pro odběr vzorku byly vybrány na základě dohody se školitelem. Proběhl screening potenciálně taxonomicky zajímavých lokalit v rámci Jihočeského kraje. Některé lokality byly součástí pravidelného odběru vzorků v rámci jiných projektů.

Z lokalit jsem odebíral vzorky několika společenstev. Plankton jsem odebíral planktonní sítí s průměrem ok 20  $\mu\text{m}$ , bentos jsem odebíral 30ml pipetou. Vzorky jsem uchovával ve 100ml odběrových lahvičkách. Prohlédl jsem je za použití optického mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Europa SE CO, Hamburk, Německo) pod zvětšením 20x10, nebo 40x10. Vhodné taxony jsem vybral na základě určovací literatury (Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999; Kaštovský et al. 2018). Byl-li ve vzorku nalezen zájmový organismus, vybral jsem tento vzorek jako vhodný pro izolaci a zdokumentoval jej softwarem Olympus cellSens Entry (Olympus Europa SE CO, Hamburk, Německo).

### **3.2 Izolace**

Samotnou izolaci jsem provedl na základě prací Zapomělová et al. (2007) a Mareš et al. (2015). Za sterilních podmínek jsem ze vzorku skleněnou mikrokapilárou izoloval kolonii cílové sinice a postupně jsem ji přečistil skrz alespoň 5 kapek sterilního TE pufru. Přečištěnou kolonii jsem s malým množstvím TE pufru umístil do 0,2ml zkumavky na PCR a uchovával ji při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **3.3 Molekulární metody**

### **3.3.1 MDA**

Multiple strand displacement amplification (MDA) je molekulární metoda, která využívá Phi29 DNA polymerázu a nasedání velkého množství nespecifických primerů. Používá se k celogenomové amplifikaci zejména u reakcí s malým množstvím templátové DNA (Spits et al. 2006; Rodrigue et al. 2009).

Ke své práci jsem použil kit Repli-G Mini (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA). Veškeré úkony protokolu jsem prováděl ve flowboxu sterilizovaném UV světlem po dobu 20–30 minut. Amplifikaci jsem nechal proběhnout v cycleru Biometra T3000 (Analytik Jena GmbH, Jena, Německo) s nastavením: alkalická denaturace, aneeling, elongace:  $30^{\circ}\text{C}$ , 960 min, denaturace:  $65^{\circ}\text{C}$ , 5 min, hold:  $4^{\circ}\text{C}$ . Zda MDA proběhla, jsem

zjišťoval gelovou elektroforézou za použití 1,5% agarózového gelu. Výsledek jsem zobrazil v transiluminátoru GenoSens 2000 (Clinx Science Instruments Co., Ltd, Šanghaj, Čína), kde jsem DNA vizualizoval integrovaným programem ClinX. Úspěšně amplifikované vzorky jsem použil jako templátovou DNA pro PCR.

### **3.3.2 PCR z MDA produktu**

Cílovým úsekem PCR byl úsek kódující 16S rRNA a navazující ITS. Na PCR jsem namíchal pro každý MDA produkt dvě reakce. Každá reakce obsahovala 0,5 µl MDA produktu, 20,5 µl PCR H<sub>2</sub>O, 25 µl master mixu (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika), 2 µl forward primeru a 2 µl reverse primeru v koncentraci 10 pmol. Jedna využívala primery specifické pro sinice (Cyano2F–Cyano1R), druhá semispecifické (Cyano2F–1494R). PCR proběhla v programu: denaturace: 94°C, 5 min, (denaturace: 94°C, 1 min; aneeling 50°C, 1 min; elongace 72°C, 2 min) 35x, elongace: 72°C, 2 min, hold: 4°C. Úspěšnost PCR jsem ověřil elektroforézou stejně jako u MDA. Viditelně úspěšné PCR produkty jsem přečistil roztokem enzymů exonukleázy a alkalické fosfatázy metodou ExoSAP (Bell 2008). Na 10 µl PCR produktu jsem použil 0,4 µl tohoto roztoku.

### **3.3.3 Nested single cell PCR**

Nested PCR jsem provedl dle metody popsané v práci Janse et al. (2004) upravené dle práce Mareš et al. (2015). Skládá se ze dvou po sobě následujících PCR reakcí. Reakce první fáze obsahovala 22,5 µl PCR H<sub>2</sub>O, 25 µl Master mixu, 0,75 µl primeru 359F a 0,75 µl primeru 23S30R o koncentraci 10 pmol. Tyto reaktanty byly přidány do zkumavek s izoláty. Reakce druhé fáze obsahovala 22,5 µl PCR H<sub>2</sub>O, 25 µl Master mixu, 0,75 µl primeru 359F, 0,75 µl primeru 1494R a 1 µl PCR produktu první fáze. První fáze proběhla dle protokolu v publikaci Mareš et al. (2015), druhá PCR proběhla s nastavením cycleru: denaturace: 94°C, 5 min, (denaturace: 94°C, 1 min; aneeling 56°C, 1 min; elongace 72°C, 90 s) 34x, elongace: 72°C, 10 min, Hold: 4°C. Úspěšnost metody jsem ověřil opět elektroforézou. Úspěšné PCR produkty jsem přečistil.

### **3.3.4 De novo metoda Nested ITS**

Jelikož výsledek původní metody Nested PCR amplifikuje pouze část 16S rRNA, a nikoli ITS, nelze ji použít pro determinaci druhové identity organismu. Rozhodl jsem se však vyzkoušet, zda nelze pozměněním této metody sekvenci ITS skutečně získat. Pracoval jsem stejným způsobem, jako kdybych připravoval druhou fázi Nested PCR. Použil jsem

stejné objemy reaktantů, stejné vybavení a stejný program v cycleru, avšak místo kombinace primerů 359F–1494R jsem použil kombinaci jako v první fázi 359F–23S30R. Metodu jsem použil pro ty vzorky, které byly úspěšně sekvenované po použití metody Nested PCR.

### 3.3.5 Izolace gDNA z kultury

Pro doplnění variability organismů byly objednány dříve nesekvenované kmeny v kultuře. Kultury jsem udržoval vitální pravidelným přeočkováním do doporučeného média v 100ml Erlenmayerových baňkách. Pro izolaci jsem z kultury sterilně odebral biomasu kmene do 2ml PCR zkumavky a zahustil ji centrifugací. Odebranou biomasu jsem zbavil přebytečného supernatantu a nechal týden vysušit v exsikátoru se silikagelem. Vysušenou biomasu jsem rozmělnil laboratorním mlýnkem Mixer Mill MM 400 (Retsch, Haan, Německo) za použití sterilních wolframových kuliček. Z takto rozmělněné biomasy jsem izoloval DNA pomocí izolačního kitu Mo Bio Laboratories UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, Kalifornie, USA) pomocí přiloženého protokolu. Koncentraci izolované DNA jsem změřil pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Izolovanou DNA jsem použil jako templát pro PCR sestávající z 2 µl primeru Cyano1R, 2 µl primeru Cyano2F, 20 µl PCR H<sub>2</sub>O a 25 µl Master mixu. PCR proběhla v programu shodném s protokolem PCR z MDA. Úspěšnost PCR jsem opět zkontroloval elektroforézou a produkty přečistil.

Z výsledného přečištěného produktu jsem namíchal dvě sekvenační reakce do 0,2ml zkumavek, jednu pro každý primer, který byl použit při PCR. Každá sekvenační reakce sestávala z 2,5 µl primeru a 8 µl PCR produktu. Výsledné reakce jsem poslal na StandardSeq Sangerovo sekvenování firmě SEQme (SEQme s.r.o., Dobříš, Česká republika). V případě potřeby jsem přidal sekvenační reakci s vnitřním primerem VRF7F. Primery, které jsem použil v rámci molekulárních metod, uvádím ve shrnující tabulce (Tab. III).

**Tab. III.** Primery používané při molekulárních metodách

Mé označení	Originál	Specificita	Sekvence	Citace
Cyano1R	Primer 18	Sinice	CTCTGTGTGCCTAGGTATCC	(Wilmotte et al. 1993)
Cyano2F	16S378F	Sinice	GGGGAATTTTCCGCAATGGG	(Taton et al. 2003)
1494R	16S1494R	Bakterie	GTACGGCTACCTTGTTACGAC	(Wilmotte et al. 2002)
23S30R	B23D	Bakterie	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	(Lepère et al. 2000)
VRF7F	CYA781F(a)	Sinice	AATGGGATTAGATACCCCAGTAGTC	(Nübel et al. 1997)
359F	CYA359F	Sinice	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	(Nübel et al. 1997)

### 3.4 Fylogenetická analýza

Pro kompletaci a oříznutí sekvencí jsem použil program Geneious Prime 2021.2.2 (<https://www.geneious.com>). Pomocí online vyhledávacího nástroje BLAST (Boratyn et al. 2018) jsem získal nejpříbuznější sekvence z genové banky. Z databáze NCBI Nucleotide (Agarwala et al. 2018) jsem rovněž získal vhodné sekvence reprezentující hlavní linie systému sinic. Výsledný soubor jsem exportoval do formátu fasta. V programu Mega 10.2.6 (Tamura et al. 2021) jsem vytvořil alignment pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al. 1994) a ručně jej upravil (viz přílohy). Pro přibližné určení fylogenetické pozice zkoumaných taxonů jsem analyzoval úsek 16S. Pomocí online převaděče ([http://phylogeny.lirmm.fr/phylo\\_cgi/data\\_converter.cgi](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/data_converter.cgi)) jsem výsledný soubor převedl do formátu nexus a phylip.

Výslednou matici ve formátu nexus o délce 984 pozic a 244 taxonech jsem analyzoval programem MrBayes (Ronquist et al. 2012) použitím metody Bayesianské fylogenetické inference s nastavením modelu GTR s gama distribucí (GTR+G) po 10 000 000 generací a s defaultním nastavením 2 řetězce po 4 replikacích. Byla spočítána posteriorní pravděpodobnost (PP) u jednotlivých větví, přičemž zaznamenány byly hodnoty 0,95 a větší. Maximum Likelihood (ML) jsem spočítal v programu PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) a nejlepší model jsem vybral pomocí Smart Model Selection (SMS) (Lefort et al. 2017). Na vybraném modelu (GTR+G+I) byly zaznamenány hodnoty bootstrap (1000 opakování) nad 50. Výsledný fylogenetický strom jsem upravil v programu FigTree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) a Inkscape 1.1.1 (<https://inkscape.org>).

### 3.5 Transmisní elektronová mikroskopie

Z kultury a vzorků s makroskopickou biomasou cílového taxonu (kolonie *Microcrocis geminata* a kmeny z Tab. V) jsem odebral biomasu, pomocí centrifugy ji zahustil a poté pipetou zbavil velké části supernatantu. Preparát byl zhotoven na odborném pracovišti Laboratoř elektronové mikroskopie (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice). Biomasa byla fixována 6% glutaraldehydem a ponechána v pokojové teplotě. Byla promyta 0.05M fosfátovým pufrem o pH 7,2 a finálně fixována 2% roztokem oxidu osmičelého v tomto samém pufre. Takto upravené vzorky byly inkubovány 2 hodiny v pokojové teplotě a opět promyty 0.05M fosfátovým pufrem. Biomasa byla poté sušena isopropanolovou řadou a zasazena do Spurrovy pryskyřice (Spurr 1969). Propylenoxid byl použit jako prostřední fáze. Ultratenké řezy byly obarveny uranyl acetátem a citrátem olova.



Výsledné vzorky jsem pozoroval transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM – 1010 1 (JEOL Ltd., Tokyo, Japonsko) a pořídil jsem fotografie softwarem Olympus cellSens Entry (Olympus Europa SE CO, Hamburk, Německo).

## 4 Výsledky

V následující tabulce (Tab. IV) uvádím přehled všech taxonů, které jsem izoloval, úspěšně sekvenoval a umístil do finální analýzy.

**Tab. IV.** Úspěšně izolované taxony a získané sekvence

Lokalita	Souřadnice	Taxon	Množství izolátů	Úspěšné sekvence 16S rRNA	Úspěšné sekvence ITS
Uhlíšťský rybník	48.6464664N, 14.6558161E	<i>Eucapsis pseudalpina</i>	8	3	3
Rybník u Stropnice	48.8814075N, 14.6279344E	<i>Microcrocis geminata</i>	16	11	10
Rybník Velký pode vsí	48.9354469N, 14.7702625E	<i>Merismopedia tenuissima</i>	18	10	3
Rybníky Potěšil a Klec	49.0787975N, 14.7661161E	<i>Merismopedia tenuissima</i>	10	5	0
Zběhov	48.9922422N, 14.3054439E	<i>Merismopedia tenuissima</i>	8	1	0
Rybník Velký pode vsí	48.9354469N, 14.7702625E	cf. <i>Merismopedia</i> sp.	2	1	0
Bažantula	49.7236786N, 18.1070217E	<i>Merismopedia</i> cf. <i>punctata/hyalina</i>	20	7	1
Velký Klikov (Velká pískovna)	48.8994169N, 14.8942692E	<i>Merismopedia glauca</i>	20	9	5
Malý Klikov (Malá pískovna)	48.8962589N, 14.9044006E	<i>Merismopedia glauca</i>	9	3	0
Zběhov	48.9922422N, 14.3054439E	<i>Merismopedia hyalina</i>	20	4	3

Kmeny v kultuře, jejichž sekvence jsem rovněž použil ve fylogenetické analýze, uvádím v tabulce (Tab. V).

**Tab. V.** Kmeny použité pro izolaci DNA a transmisní elektronovou mikroskopií

Rodové jméno	Druhové jméno	Označení kmene
<i>Eucapsis</i>	sp.	CCALA 889
<i>Merismopedia</i>	<i>tenuissima</i>	NIES-230
<i>Merismopedia</i>	<i>punctata</i>	NIVA-CYA 16
<i>Merismopedia</i>	<i>angularis</i>	NIVA-CYA 199

## 4.1 Morfologie

Na základě pozorování pomocí optické a transmisní elektronové mikroskopie jsem vytvořil popisy v analýze použitých taxonů a zhotovil obrazové tabule dokumentující tato pozorování (viz přílohy, Obr. 8–13).

### *Eucapsis pseudalpina* (Obr. 8F)

Kolonie mikroskopické, pravidelně krychlovité, někdy mírně nepravidelné, sliz často obalený fragmenty detritu, počet buněk v kolonii (4–)8–16(–32); sliz kolem kolonie bezbarvý, jasně ohraničený, přesahuje kolonii až o délku jedné buňky; buňky kulovité, po dělení polokulovité, o velikosti 5–8  $\mu\text{m}$ ; obsah buněk jasně zelený, s drobnými granulami; buňky a po dělení dvojice buněk v kolonii umístěny pravidelně, s mezerami o velikosti asi jedné šířky buňky, dělí se ve třech rovinách.

### *Microcrocis geminata* (Obr. 8I, 9 a 13G-H)

Kolonie makroskopické, ploché, široké až 3 mm, s nepravidelnými okraji, obsahující stovky až tisíce buněk; sliz kolem kolonie bezbarvý, tenký, ohraničený; buňky válcovité, široké (3–)4–6(–7)  $\mu\text{m}$  a 12–16  $\mu\text{m}$  dlouhé, na kolmém průřezu hexagonální i kulaté, při dělení polokulovité, s vlastním tenkým slizovým obalem; obsah buněk jasně olivově zelený až matně zelený, v pohledu ze strany se striací; buňky uspořádány převážně nepravidelně, místy s náznakem pravidelných řad v jedné rovině kolonie, dělí se ve dvou směrech; pod TEM viditelné tylakoidy paralelní rozmístěné po celém obsahu buňky.

*Merismopedia tenuissima* (Obr. 8C-E a 12)

Kolonie mikroskopické, většinou obdélníkové, starší kolonie s nepravidelnými okraji, velikostí variabilní s (4–)8–192, vzácně i více buňkami; větší kolonie často rozdělené na několik subkolonií připojených slizem; sliz kolem kolonií bezbarvý tenký, neohraničený; jednotlivé buňky oválné, po dělení polokulovité, s homogenním obsahem, bez vlastního slizového obalu; velikost buněk 0,8–1,6  $\mu\text{m}$ ; barva buněk žlutozelená, olivově zelená, či šedá; buňky v pravidelných kolmých řadách, nahloučené bez mezer, v mladých koloniích tvořící oddělené tetrády s mezerami menšími než jedna buňka; buňky uspořádány v jedné rovině, dělí se ve dvou směrech v rovině kolonie.

*Merismopedia cf. punctata/hyalina* (Obr. 8A, 13A-C)

Kolonie mikroskopické, nejčastěji čtvercové, ale i obdélníkovité, řady buněk oproti sobě mírně laterálně posunuté, někdy tvoří subkolonie o 4–16 buňkách; počet buněk v kolonii (16–)32–64(–128); sliz kolem kolonie kompaktní, ohraničený, po mrtvých buňkách vytváří jasný obrys; buňky kulovité, po dělení polokulovité, o velikosti 2,9–3,88  $\mu\text{m}$ ; obsah buněk olivově zelený až šedý, při proostření s patrnými světlými tělísky; buňky v pravidelných kolmých řadách, nahloučené bez mezer v jedné rovině, dělí se ve dvou směrech v rovině kolonie.

*Merismopedia glauca* (Obr. 8G-H a 13D-F)

Kolonie mikroskopické, se značně nepravidelnými okraji, některé ale pravidelně čtvercové, v epipelonu přilnuté k detritu a zrnkům písku; v některých koloniích řady buněk oproti sobě mírně laterálně posunuté, často tvoří subkolonie o 8–64 buňkách; počet buněk v kolonii velmi variabilní (16–)64–256, někdy i více; sliz kolem kolonie kompaktní, často viditelně ohraničený; buňky kulovité, či oválné, po dělení polokulovité, o velikosti (3,7–)4,26–5,1  $\mu\text{m}$ , z bočního pohledu některé buňky mírně válcovité; obsah buněk jasně olivově zelený, vzácně šedý, homogenní; buňky v pravidelných kolmých řadách, nahloučené bez mezer v jedné rovině, někdy s mezerami o velikosti 1–8 buněk, dělí se ve dvou směrech v rovině kolonie.

*Merismopedia hyalina* (Obr. 8B)

Kolonie mikroskopické, pravidelně čtvercové; počet buněk v kolonii 8–16(–32); sliz kolem kolonie neohraničený; buňky kulovité, po dělení polokulovité o velikosti 2,08–2,96  $\mu\text{m}$ ; obsah buněk homogenní, olivově zelený či šedý; buňky v pravidelných kolmých řadách, nahloučené bez mezer v jedné rovině, dělí se ve dvou směrech v rovině kolonie.

*Eucapsis* sp. CCALA 889 (Obr. 10A-C a 11A-C)

Kmen téměř ztratil schopnost tvorby pravidelných kolonií, tvoří nepravidelné makroskopické agregáty obalené silnou vrstvou slizu a sférické kolonie, náznak krychlovitých kolonií vzácný; buňky kulovité až oválné, o velikosti 2,5–5(–6)  $\mu\text{m}$ ; obsah buněk homogenní, olivově zelený až jasně zelený; pod TEM viditelné tylakoidy fascikulární při okraji buňky, někdy zasahující až k jejímu středu.

*Merismopedia tenuissima* NIES-230 (Obr. 10I a 11I)

Kmen tvoří pouze jednotlivé volné buňky o velikosti 0,8–1,8(–2,2)  $\mu\text{m}$  s homogenním, světle olivovým až tmavě zeleným obsahem; tvar buněk kulovitý i oválný, při dělení polokulovitý; pod TEM viditelné tylakoidy umístěné parietálně nejčastěji ve třech vrstvách při okraji buňky.

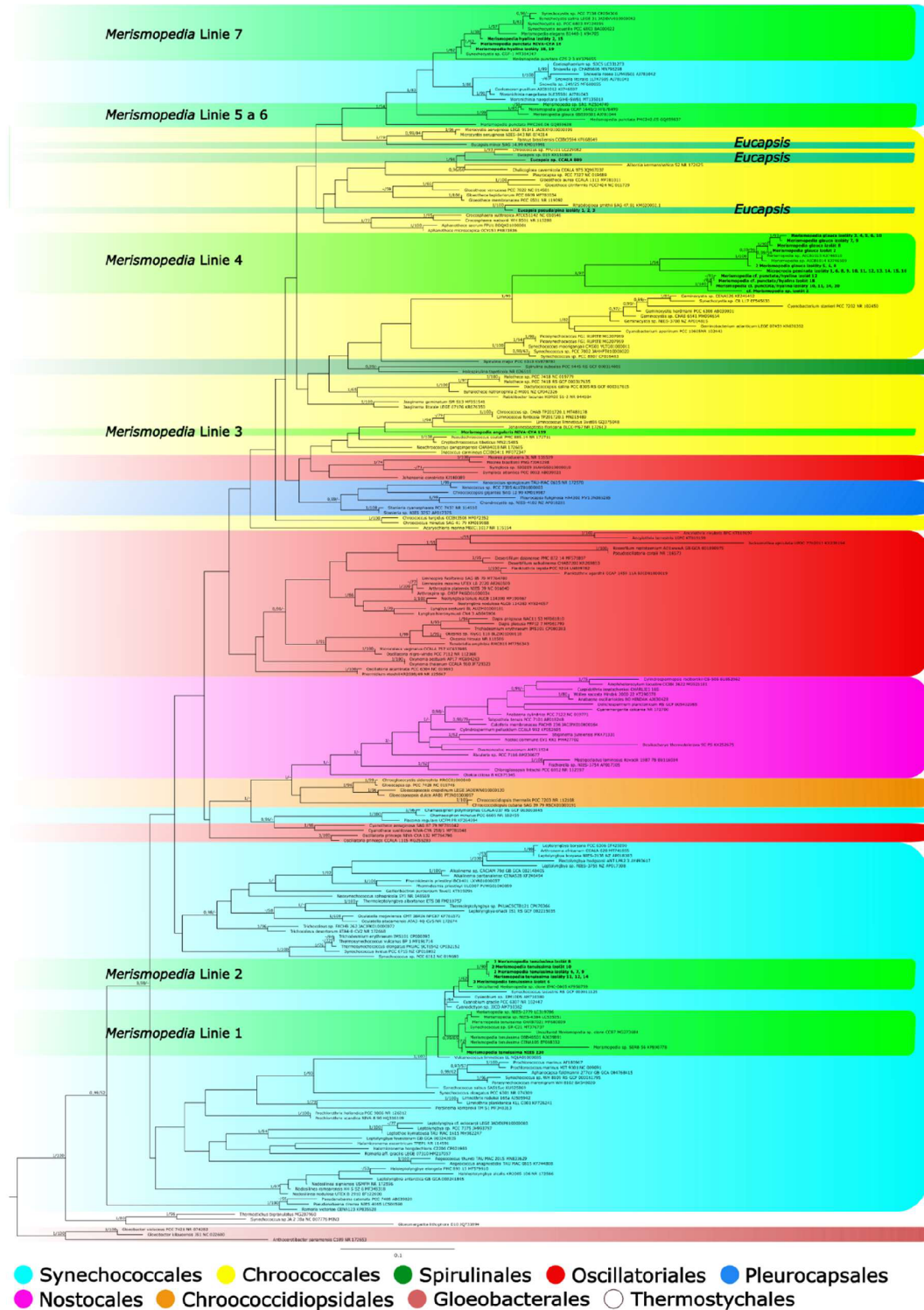
*Merismopedia punctata* NIVA-CYA 16 (Obr. 10G-H a 11G-H)

Kmen tvoří agregáty pouze o 2(–4) kulovitých či polokulovitých buňkách o velikosti 2,5–4,6(–6)  $\mu\text{m}$ ; obsah buněk bledě růžový, někdy s náznakem vnitřních nepravidlostí; kmen v kultuře zřejmě tvoří slizové exudáty, čímž vytváří v tekutém médiu hustou a viskózní suspenzi buněk; pod TEM viditelné tylakoidy parietální až fascikulární při okrajích buňky.

*Merismopedia angularis* NIVA-CYA 199 (Obr. 9D-F a 11D-F)

Kolonie mikroskopické, s 4–32(–64) buňkami uspořádanými do pravidelných řad, s oblými okraji, větší kolonie uprostřed ohnuté pod tupým úhlem; po delším časovém období tvoří na dně baňky s kulturou souvislou tenkou vrstvou; sliz kolem kolonie i buněk samotných zřetelně ohraničen; buňky velké 6,5–9(–10)  $\mu\text{m}$ , oválné, někdy hranaté, k okrajům kolonie nepravidelné, kulovité a polokulovité jen po dělení; obsah buněk jasně zelený s granulemi; pod TEM viditelné tylakoidy nepravidelně fascikulární rozmístěné po celé buňce.

## 4.2 Výsledky fylogenetické analýzy

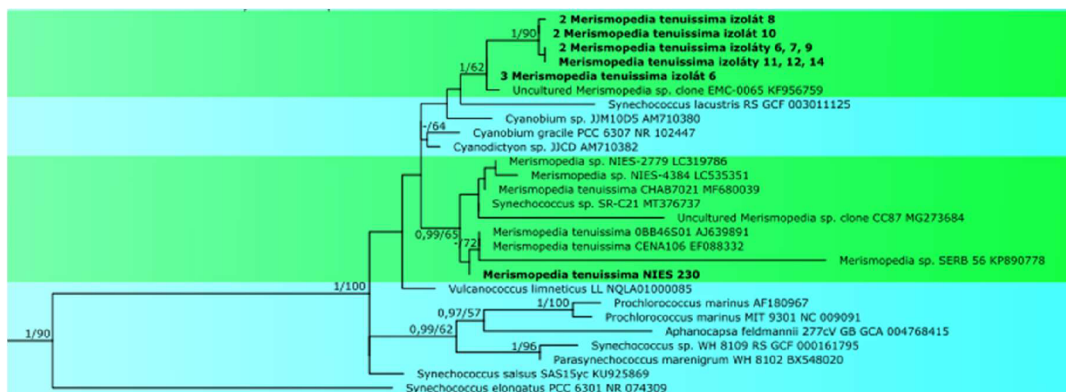


Obr. 1. Fylogenetický strom zobrazující výsledky analýzy genu 16S mých izolátů a kmenů (tučně) v systému sinic. Topologie je založena na metodě Maximum Likelihood. Délka větví

představuje evoluční vzdálenost (model GTR+I+G). Uvedeny jsou hodnoty vyšší než 50 pro Maximum Likelihood (ML) s 1000 opakováními a Posterior Probability (PP) s hodnotou nad 0,95 z Bayesovské analýzy. Jednotlivé řády jsou definované podle prací Komárek et al. (2014, 2020). Ačkoli v této analýze zůstaly nepodpořeny, jsou barevně rozlišeny pro přehlednou demonstraci zařazení jednotlivých linií rodu *Merismopedia* do taxonomických skupin. Pro bližší studium je tentýž obrázek s větším zvětšením volně přiložen ve formátu pdf; Hodnoty u větví: ML/PP.

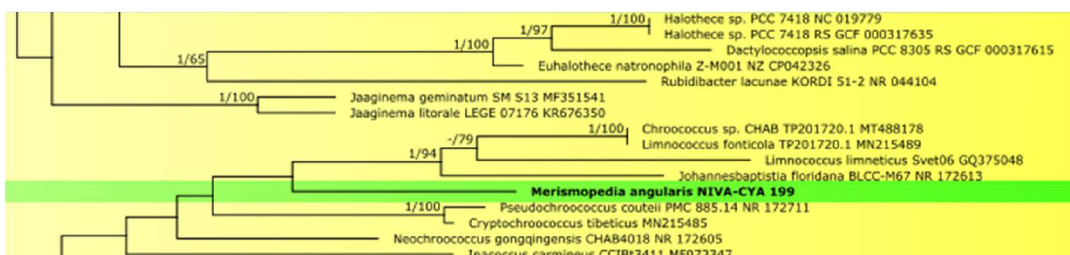
Z fylogenetického stromu (Obr. 1) je patrné několik skutečností. Sekvence rodu *Merismopedia* tvoří sedm oddělených monofyletických linií, přičemž tři tyto linie (5, 6 a 7) společně tvoří parafyletickou skupinu.

Dvě linie tvoří sekvence *Merismopedia tenuissima* a blíže neurčené sekvence rodu *Merismopedia* ve skupině jádrových Synechococcales, takzvaném PSC clade (Mareš et al. 2019b, Obr. 7), čeledi Prochlorococcaceae (Linie 1 a 2, viz Obr. 1 a 2). Jedna linie je tvořena několika sekvencemi blíže neurčených druhů rodu *Merismopedia* a *M. tenuissima* z genové banky (Mugnai et al. 2003; Shen et al. 2018). Do této skupiny také spadá mnou osekvenovaný kmen *M. tenuissima* NIES 230. Druhá linie je tvořena sekvencemi mých izolátů *M. tenuissima* ze všech tří zkoumaných lokalit společně se sekvencí nekultivovaného zástupce *Merismopedia* sp.



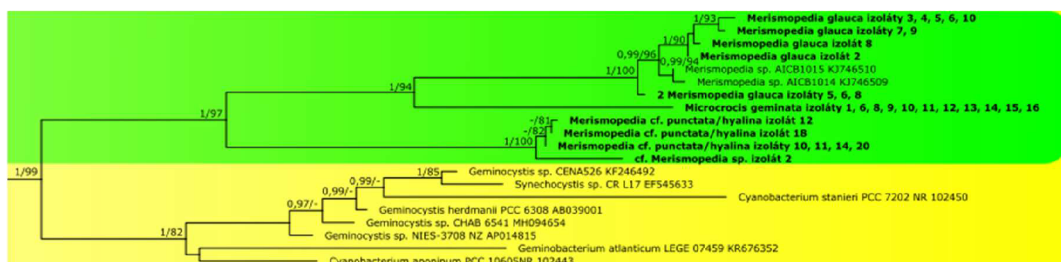
**Obr. 2.** Detail fylogenetického stromu (Obr. 1), linie 1 a 2, *Merismopedia* sp. a *M. tenuissima* v čeledi Prochlorococcaceae; Hodnoty u větví: ML/PP

Třetí, plně samostatnou linii tvoří jediný zástupce, mnou sekvenovaný kmen *Merismopedia angularis* NIVA-CYA 199, v čeledi Chroococcaceae (Chroococcales) (Komárková et al. 2010; Gama et al. 2019; Berthold et al. 2020; Geng et al. 2021; Wang et al. 2021; Duval et al. 2021, Obr. 7) (Linie 3, viz Obr. 1 a 3).



**Obr. 3.** Detail fylogenetického stromu (Obr. 1), linie 3, *Merismopedia angularis*; Hodnoty u větvi: ML/PP

Čtvrtá monofyletická skupina v čeledi Geminocystaceae (Chroococcales) (Tuji et al. 2021, Obr. 7) je tvořena sekvencemi mých izolátů určených jako *Merismopedia* cf. *punctata/hyalina*, cf. *Merismopedia* sp. a *Merismopedia glauca* z obou lokalit (Tab. IV) (Linie 4, viz Obr. 1 a 4). K sekvencím izolátů *M. glauca* jsou nejbližší příbuzné sekvence kmenů *Merismopedia* sp. AICB1014 a AICB1015. Doprostřed tohoto klastru spadají i sekvence izolátů *Microcrocis geminata*.



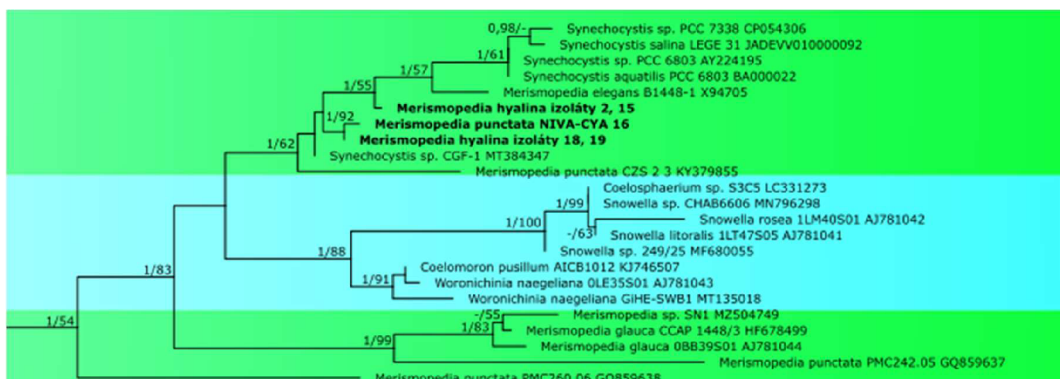
**Obr. 4.** Detail fylogenetického stromu (Obr. 1), linie 4, *Merismopedia glauca*, *Merismopedia* cf. *punctata/hyalina*, cf. *Merismopedia* sp., *Microcrocis geminata*; Hodnoty u větvi: ML/PP

Linie 5 je tvořena jen jednou sekvencí typového druhu *Merismopedia punctata* PMC260.06 (Thomazeau et al. 2010), nikoli však morfologicky dokumentovaného kmene.

Do linie 6 spadá sekvence morfologicky nedokumentovaného kmene *Merismopedia punctata* PMC242.05, sekvence *M. glauca* CCAP 1448/3, *M. glauca* 0BB39S01 (Mugnai et al. 2003) a další sekvence rodu *Merismopedia* bez druhové identity. Součástí linie 7 jsou sekvence mých izolátů určených jako *M. hyalina* a mnou sekvenovaný kmen *M. punctata* NIVA-CYA 16 společně s dalšími sekvencemi *M. elegans* B1448-1 (Palińska et al. 1996) a *Merismopedia* sp. CZS 2 3 (Albrecht et al. 2017) (viz Obr. 1 a 5). Do této linie spadá i několik sekvencí rodu *Synechocystis*.

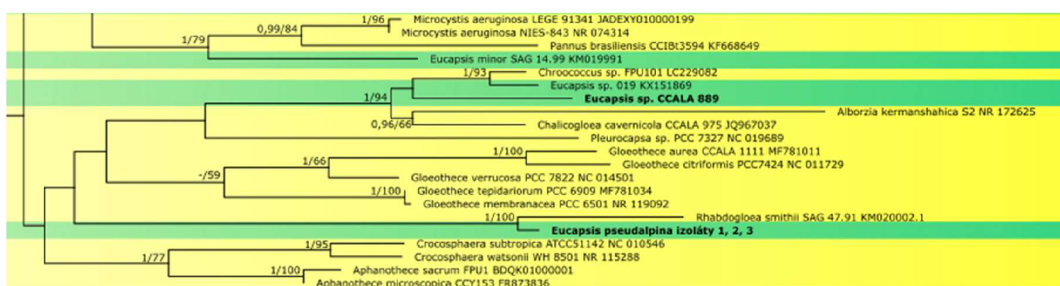
Tyto tři linie dohromady tvoří jednu parafyletickou skupinu.





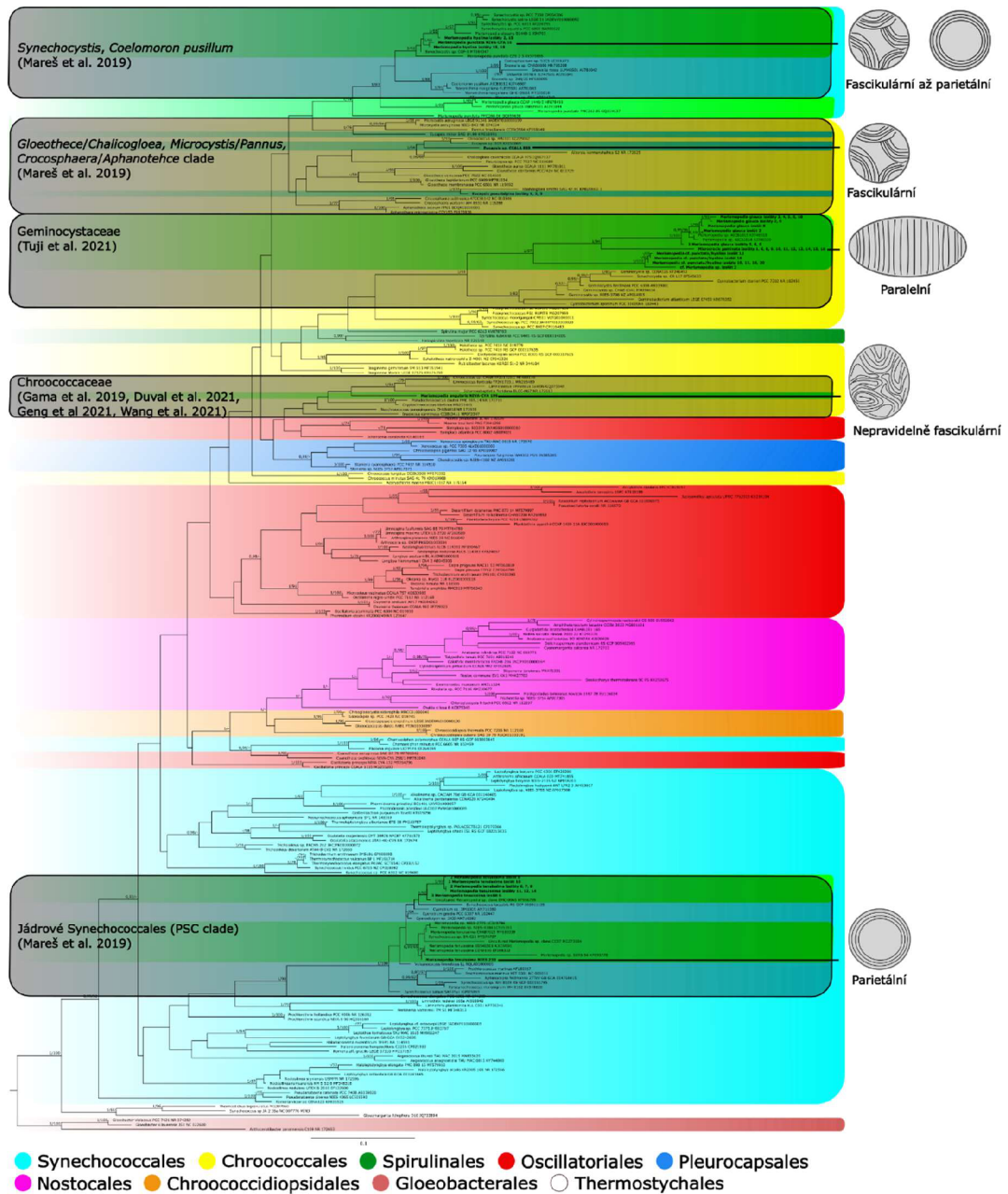
Obr. 5. Detail fylogenetického stromu (Obr. 1), linie 5, 6 a 7, *Merismopedia elegans*, *M. glauca*, *M. hyalina*, *M. punctata*; Hodnoty u větví: ML/PP

Sekvence izolátů *Eucapsis* tvoří tři linie v řádu Chroococcales (viz Obr. 1 a 6). Do jedné linie spadá *Eucapsis minor* SAG 14.99 (pravděpodobně čeleď Microcystaceae). Druhou linii představují *Eucapsis* sp. 019 (Komárek et al. 2016) a má sekvence *Eucapsis* sp. CCALA 889. Třetí linii tvoří sekvence mých izolátů *E. pseudalpina*.



Obr. 6. Detail fylogenetického stromu (Obr. 1), tři linie rodu *Eucapsis*; Hodnoty u větví: ML/PP

Postavení tylakoidů taxonů vybraných pro TEM uvádím na schématu (Obr. 7).



**Obr. 7.** Schéma postavení tylakoidů vybraných taxonů podle snímků TEM v rámci systému sinic korespondující s vybranými taxonomickými skupinami.

## 5 Diskuse

Je třeba brát v potaz, že finální fylogenetický strom stojí pouze na částečných sekvencích genu pro 16S rRNA. To mj. proto, že kombinace primerů specifická pro sinice nezabírá celou délku tohoto genu, ale mám díky ní vyšší jistotu, že finální sekvence budou patřit izolovaným sinicím, a nikoli bakteriální kontaminaci. Většina těchto sekvencí měla po finální úpravě asi 1000 bp. Dle předchozích studií používajících tuto metodu však tato délka pro základní fylogenetickou analýzu postačuje (Mareš et al. 2015). Taxonomické závěry tak lze činit maximálně na rodové úrovni. Pro výsledky na druhové úrovni by bylo třeba využít analýzu na základě úseku ITS, což bude pravděpodobně součástí dalšího výzkumu. Pro skutečně přesnou polohu jednotlivých taxonů ve fylogenetickém stromu by bylo třeba provést analýzu založenou na sekvencích celých genomů všech známých druhů sinic, což je za současných podmínek nedosažitelné. Jak je patrné i z mých zjištění, existují mnohé mezery ve znalostech i datech pro uskutečnění takto obsáhlé studie. Nicméně i navzdory těmto omezením v této práci přináším celou řadu zajímavých a vědecky využitelných výsledků.

### 5.1 Porovnání molekulárních metod

Při použití dvou základních metod pro získání sekvencí z jednotlivých izolovaných kolonií jsem narazil na několik rozdílů mezi nimi. Metoda MDA (Spits et al. 2006; Rodrigue et al. 2009) má výhodu v tom, že v prvním kroku zahrnuje amplifikaci celého genomu v izolovaném vzorku a má vyšší výtěžek výsledného produktu (Lara et al. 2013). Na druhou stranu může dojít k amplifikaci genomu případné bakteriální kontaminace. Tím pádem může výsledný PCR produkt obsahovat naamplifikované 16S geny těchto bakterií, nezískáme tedy čistou sekvenci. K takovému nepřesnostem někdy docházelo i v případě, že jedna kombinace primerů (Cyano1 a Cyano2) byla specifická pro sinice (Tab. III) z důvodu obsahu velkého množství kontaminujících bakterií (Wilmotte et al. 1993; Taton et al. 2003). Tato kombinace primerů by zároveň měla zaručit délku výsledné sekvence asi 1600 bp a zahrnovat i region ITS. Zejména u vzorků s malým množstvím templátové DNA (např. kolonie s malým počtem buněk) však výsledné sekvence často nedosahovaly požadované délky a čistoty, takže je nebylo možné v softwaru Geneious Prime 2021.2.2 (<https://www.geneious.com>) zkompletovat. Musel jsem proto využít vnitřní primer VRF7F (Nübel et al. 1997). Výsledný poměr úspěšně osekvenovaných izolátů také negativně koreloval s tloušťkou slizové pochvy kolem buněk. Silná slizová pochva nejspíše nebyla

u většiny vzorků rozložena lyzačním pufrem za dobu uvedenou v pracovním protokolu, a neumožnila tak uvolnění buněk do suspenze (Lara et al. 2013; Mareš et al. 2015). Důsledkem bylo to, že tato metoda úspěšně amplifikovala nižší poměr vzorků než Nested PCR. Vliv množství templatových buněk na úspěšnost MDA jsem oproti předchozím studiím (Rodrigue et al. 2009; Lara et al. 2013) nezaznamenal.

Nested PCR bylo naopak spolehlivější metodou, co se týče poměru úspěšně sekvenovaných izolátů i čistoty finálních sekvencí, a to i v případě taxonů se silnější slizovou pochvou. Avšak při použití původního protokolu (Mareš et al. 2015) byly finální sekvence pouze 1100 bp dlouhé a nezahrnovaly ITS. Tento problém jsem do jisté míry byl schopen vyřešit de novo metodou Nested ITS. Nested ITS zároveň představuje novou možnost, jak v budoucnu získat kvalitní sekvence genů 16S i ITS kombinovatelnou s jinými metodami pro dosažení co nejspolehlivějších výsledků (Janse et al. 2004; Zapomělová et al. 2008; Lara et al. 2013; Mareš et al. 2015). Na některé taxony však tato metoda z blíže neznámého důvodu nefungovala (např. *Merismopedia cf. punctata/hyalina*) a amplifikace cílového úseku 16S a ITS dle gelové elektroforézy vůbec neproběhla. Mohlo to být způsobeno postupnou degradací PCR produktu první fáze či nenasednutím primerů na příliš variabilní lokus (Lepère et al. 2000). Další nevýhodou této metody byla zvýšená variabilita mezi sekvencemi některých izolovaných taxonů. Velké množství po sobě jdoucích cyklů mohlo vést k nepřesnému zařazení nukleotidů polymerázou do nově amplifikovaných vláken DNA (Jan Mareš, pers. com.). Kombinací všech zmíněných molekulárních metod se podařilo získat velké množství nových dat, které přispěly k rozšíření pohledu na diverzitu taxonů čeledi Merismopediaceae.

## 5.2 *Merismopedia*

Jako polyfyletické se v minulosti ukázaly četné rody sinic (viz 1.1 Polyfyletismus v současné taxonomii sinic). Proto není potvrzení polyfyletismu u rodu *Merismopedia* překvapivým zjištěním. Obdobné poznatky publikovali už Rajaniemi-Wacklin et al. (2006), Shen et al. (2018) či Li et al. (2019, 2020), z omezených dat ale nebylo možné vyvodit patřičné taxonomické důsledky. Práce Rajaniemi-Wacklin et al. (2006) rozděluje rod na dvě větve s nejistým postavením. Práce Shen et al. (2018) jasně odděluje klastr *Merismopedia tenuissima* od hlavního klastru kolem typového druhu bez taxonomických změn a rozděluje rod do tří oddělených linií. Do tří linií rod rozděluje i Li et al. (2019, 2020) bez diskuse o umístění jednotlivých druhů. Mé výsledky obohacují zjištění zmíněných prací o větší

množství sekvencí „morfofaxonů“ odpovídajících rodu *Merismopedia*, u mnohých z nich dosud nebyla dostupná žádná molekulární data.

### 5.2.1 Typový druh rodu – *Merismopedia punctata*

Kvůli jasnému polyfyletismu rodu *Merismopedia* je třeba nejprve určit, která z linií představuje „pravou“ linii tohoto rodu a reprezentuje jak vlastní rod *Merismopedia s.s.*, tak i čeleď Merismopediaceae. Pro *M. punctata* bohužel není ustaven typový kmen, a neexistuje tak ani autentická referenční sekvence (Shen et al. 2018). Taxony identifikované jako typový druh *M. punctata* se v mé analýze nalézají ve čtyřech liniích. Ze současně dostupných dat proto nelze jasně určit, ve které skupině se nachází „pravá“ linie rodu. Nicméně v úvahu přichází některá z větví parafyletické skupiny obsahující linie 5, 6 a 7, nebo linie 4, protože obsahují taxony určené jako *M. punctata*, nejvíce morfologicky odpovídající popisu tohoto druhu.

Linie 7 obsahuje mnou sekvenovaný kmen *Merismopedia punctata* NIVA-CYA 16 (Obr. 10G-H). Nejblíže příbuzné tomuto kmenu se ukazují mé izoláty *M. hyalina*. Jelikož však kmen ztratil většinu důležitých morfologických znaků – tvoří kolonie o více než čtyřech buňkách (Palińska & Krumbein 1998), velikost buněk je variabilní 2,5–4,6(–6) – nelze jistě určit, zda se při izolaci morfologicky jednalo o stejný druh. Variabilita znaků je pro kmény rodu *Merismopedia* poměrně běžná, zaznamenaná a dobře popsána v pracích Palińska & Krumbein (1995, 1998), včetně tvorby neobvykle velkých či malých buněk právě u *M. punctata*. Postavení tylakoidů kmene *M. punctata* NIVA-CYA 16 (Obr. 11G-H) je dle fotografií z TEM na pomezí mezi parietálním a fascikulárním. Plně tedy neodpovídá ani jednomu typu popsanému v práci Mareš et al. (2019b). Tento klastr ve zmíněné práci představuje kmen *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko & Tabata 1997). Evidentně v této skupině došlo k sekundárnímu vzniku parietálních tylakoidů, a skupina taxonů kolem kmene *M. punctata* NIVA-CYA 16 tak může být mezičlánkem onoho vývoje.

Kmen *Merismopedia punctata* NIVA-CYA 16 tak mohl být při izolaci určen chybně kvůli výše zmíněnému morfologickému překryvu (Kaštovský et al. 2018), přestože se ve skutečnosti jednalo o zástupce druhu *M. hyalina*, který je sám o sobě odděleným druhem s relativně velkou morfologickou variabilitou (Palińska et al. 1996). To však z dostupných informací nelze zcela potvrdit. Za současné situace je toto vysvětlení nejpravděpodobnější, jelikož neexistují jiné dostupné sekvence patřící druhu *M. hyalina* kromě mých izolátů (Agarwala et al. 2018). Další sekvence druhu *M. punctata* CZS 2 3 v linii 7 dle fotografií

(Albrecht et al. 2017) morfologicky odpovídá popisu tohoto druhu *sensu* Komárek & Anagnostidis (1999).

V linii 5 a 6 jsou umístěny další dvě sekvence *Merismopedia punctata* dostupné z NCBI. Pocházejí z práce Thomazeau et al. (2010), kde ale chybí fotodokumentace sekvenovaného organismu. Umístění v jedné z linií parafiletické skupiny (linie 5, 6 a 7) v řádu Synechococcales by odpovídalo umístění čeledi v práci Komárek et al. (2014). Zároveň by to potvrdilo i blízkou příbuznost rodu k čeledi Coelosphaeriaceae (zde rody *Snowella*, *Coelomoron*, *Coelosphaerium* a *Woronichinia*) (Rajaniemi-Wacklin et al. 2006) i Microcystaceae (Komárek & Anagnostidis 1986, 1999).

Další možnou „pravou“ linií rodu je linie 4 (Obr. 13). V linii 4 jsou umístěny sekvence mnou izolované a nejistě určené *Merismopedia* cf. *punctata/hyalina* (Obr. 8A a 13A-C). Takovéto umístění hlavní linie r. *Merismopedia* nediskutuje žádná z předešlých prací (Palińska et al. 1996; Rajaniemi-Wacklin et al. 2006; Thomazeau et al. 2010; Albrecht et al. 2017; Shen et al. 2018). *M.* cf. *punctata/hyalina* byl takto určen kvůli výše popsanému problému s morfologickým překryvem druhů *M. punctata* a *M. hyalina* (viz kapitola 1.2.4 Fylogenetické problémy a otázky) (Ehrenberg 1834; Kützing 1845). Od izolátů *M. hyalina* se liší v několika parametrech. *M. hyalina* má buňky velké 2,08–2,96 µm, a kolonie o 8–16(–32) buňkách. Zatímco buňky *M.* cf. *punctata/hyalina* mají rozměry 2,9–3,88 µm a kolonie jsou složeny z (16–)32–64(–128) buněk. Rozdíl ve velikosti buněk oproti *M. punctata* tak odpovídá původnímu popisu *M. hyalina* (Kützing 1845). Lze tedy předpokládat, že mé izoláty *M.* cf. *punctata/hyalina* budou patřit druhu *M. punctata*, resp. kryptickému taxonu morfologicky odpovídajícímu *M. punctata*. Taxon *M.* cf. *punctata/hyalina* v této linii tvoří monofyletickou skupinu společně s jedinou úspěšně složenou sekvencí taxonu cf. *Merismopedia* sp. Tento nejistě určený taxon jsem vůbec nenalezl při prohlížení původního vzorku, a neexistuje tedy jeho dobrý morfologický záznam. Podle matice podobnosti sekvencí (Tab. VI) je však pravděpodobné, že taxony *M.* cf. *punctata/hyalina* a cf. *Merismopedia* sp. spadají pod stejný rod (Stackebrandt & Goebel 1994; Komárek 2010). Zdali se jedná o zástupce stejného druhu, není z takto malého množství dat jasné. Je také možné, že cf. *Merismopedia* sp. a *M.* cf. *punctata/hyalina* jsou jediným druhem, u kterého je běžná vnitrodruhová genetická variabilita (Kim et al. 2014). Tato variabilita je možná zvýšena uměle nedokonalostí jediné získané sekvence cf. *Merismopedia* sp. či metodou Nested PCR (viz výše). Morfologicky se tyto dva taxony dle celkového habitu shodují.

V rámci samotného druhu *Merismopedia punctata* tedy zřejmě existuje značná kryptická diverzita a bude třeba výrazně detailněji porovnat drobné morfologické detaily, pokud takové existují, které by jednotlivé genospecies oddělily pro přesnější determinaci v budoucnu. Kryptické taxony jsou v systému sinic neobyčejně běžné (Osorio-Santos et al. 2014; Li et al. 2019; Brown et al. 2021; Johansen et al. 2021; Kim et al. 2021 aj). Mé sekvence izolátů *M. cf. punctata/hyalina* mohou patřit dříve nepopsanému druhu, nebo samostatnému, již popsánému druhu *M. tranquilla*, což by odpovídalo představě nepřibuznosti *M. punctata* a *M. tranquilla* (Nägeli 1849). Dobrým determinačním znakem může v tomto případě být postavení tylakoidů. Lze předpokládat, že taxon určený jako *M. cf. punctata/hyalina* bude mít jakožto zástupce čeledi Geminocystaceae paralelní tylakoidy (Korelusová et al. 2009; Mareš et al. 2019b) na rozdíl od ostatních zástupců „morphospecies“ *M. punctata* s parietálními či fascikulárními tylakoidy (Obr. 7).

### 5.2.2 *Merismopedia glauca*

Linii 4 představuje jasně oddělená monofyletická skupina (1/99) tvořená takřka výhradně sekvencemi mých izolátů a nachází se v řádu Chroococcales. Zřejmě náleží čeledi Geminocystaceae ustanovené v práci Tuji et al. (2021). I tato práce do této čeledi zařadila kmeny *Merismopedia* sp. AICB1014 a AICB1015. Dle matice podobnosti genu pro 16S rRNA (Tab. VI) patrně zahrnuje tři samostatné rody s podobností 16S menší než 95% (Komárek 2010). Jeden je tvořen izoláty *Merismopedia cf. punctata/hyalina* (Obr. 8A a 13A-C) a *cf. Merismopedia* sp., druhý zahrnuje pouze *Microcrocis geminata* (Obr. 8I, 9 a 13G-H) a třetí izoláty *Merismopedia glauca* (Obr. 8G-H a 13D-E) spolu s kmeny *Merismopedia* sp. AICB1014 a AICB1015.

**Tab. VI.** Matice podobnosti (%) vybraných sekvencí v linii 4

	<i>Merismopedia cf. punctata/hyalina</i>	<i>Microcrocis geminata</i>	<i>Merismopedia glauca</i>	<i>cf. Merismopedia sp.</i>	<i>Merismopedia sp. AICB1015</i>
<i>Merismopedia cf. punctata/hyalina</i>					
<i>Microcrocis geminata</i>	90,87				
<i>Merismopedia glauca</i>	91,47	91,89			
<i>cf. Merismopedia sp.</i>	98,56	91,40	90,40		
<i>Merismopedia sp. AICB1015</i>	91,60	92,60	98,78	90,75	

Morfologicky odpovídají mé izoláty *Merismopedia glauca* dnešnímu pojetí velikostí buněk (3,7–)4,26–5,1 μm i počtem buněk v kolonii (Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999; Joosten 2006; McGregor 2013; Dvořák et al. 2017; Kaštovský et al. 2018). Velikostí

kolonie ale násobně přesahují limit popsany v primárním zdroji (Kützing 1845), což je –16 buněk v kolonii. Izoláty plně odpovídají *M. glauca* typickým rozdělením do subkolonií (Kaštovský et al. 2018), nepravidelnostmi u hrany kolonie (Hindák 1992) i nápadným slizem na okraji kolonie (Komárek & Anagnostidis 1999). Kmeny *Merismopedia* sp. AICB1014 a AICB1015 se morfologicky s mými izoláty i se současným pojetím *M. glauca* také shodují (Bogdan Drugá, pers. com.). Na druhou stranu některé pozorované kolonie odpovídají popisu i fotografiím *M. convoluta sensu* Joosten (2006) velikostí kolonie, i tvarem buněk z bočního pohledu (Obr. 13D).

Sekvence mých izolátů sice vykazují jistou variabilitu i v rámci izolátů z jedné lokality, ale tato variabilita může být způsobena nedokonalostí použitých molekulárních metod (viz 5.1 Porovnání molekulárních metod), nebo se jedná o běžnou vnitrodruhovou variabilitu. Je možné, že při vyšším počtu morfologicky shodných vzorků a vyšším počtu kvalitních sekvencí z více vzdálených lokalit bude potvrzena existence kryptického taxonu v rámci druhu *Merismopedia glauca*. Je však také možné, že se jedná pouze o populaci *M. convoluta* či *M. revoluta* s menšími roztrhanými koloniemi. Těmto druhům mé izoláty odpovídají velikostí buněk a tvorbou subkolonií (Joosten 2006). *M. convoluta* je za normálních podmínek typická až makroskopickými stočenými koloniemi (Kützing 1849; Skácelová & Zapomělová 2010) ne nepodobnými zástupcům rodu *Microcrocis* (Lagerheim 1883). *Merismopedia convoluta* byla dokonce považována za synonymum dnes neuznávaných taxonů *Merismopedia gigas* a *Pseudoholopedia convoluta* (Skácelová & Zapomělová 2010), která jsou ale dnes zároveň považována za synonyma *Microcrocis gigas* (Komárek & Anagnostidis 1995, 1999). *Microcrocis gigas* s *Merismopedia convoluta* koresponduje pravidelnými řadami buněk v kolonii a velikostí kolonie, nekoresponduje však ekologií a prodlouženým tvarem buněk. Druhy *M. convoluta* a *M. revoluta* by tak mohly být blízkým příbuzným rodu *Microcrocis* právě v čeledi Geminocystaceae se společným znakem makroskopických kolonií. Pro budoucí identifikaci a potvrzení, nebo vyvrácení této hypotézy by bylo třeba získat molekulární data typických zástupců *M. convoluta* a *M. revoluta*, stejně jako data o postavení tylakoidů *M. convoluta* a mých izolátů *M. glauca*.

Sekvence *Merismopedia glauca* se však nacházejí i v parařfyletické skupině linií 5, 6 a 7. Společně se sekvencí *M. elegans* B1448-1 (Palińska et al. 1996, v NCBI jako sekvence *M. glauca*) se v této parařfyletické skupině nachází další kmeny *M. glauca* CCAP 1448/3 a *M. glauca* 0BB39S01 (Mugnai et al. 2003; Rajaniemi-Wacklin et al. 2006). V práci Li et al. (2020) se objevuje OTU označená jako *M. glauca* spadající také do stejné pozice jako



tyto sekvence, neporovnává ji však s dalšími kmeny a nijak blíže ji nedokumentuje. Kmen, ze kterého pochází sekvence *M. glauca* CCAP 1448/3, je v této sbírce veden pod názvem *M. convoluta* (Culture Collection of Algae and Protozoa, Argyll, Spojené Království) a jako *M. convoluta* byl i izolován. Kmen v této kultuře tvoří nepravidelné kolonie, a morfologicky jej tak nelze přesně určit. Naproti tomu kopie tohoto kmene ve sbírkách SAG 48.79 (Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, Německo) a CCALA 099 (Botanický ústav AV ČR, Třeboň, Česká republika) jsou vedeny jako *M. glauca*. Ve sbírce SAG tvoří i kolonie podle dnešního chápání tohoto druhu a odpovídají popisu v práci Palinska et al. (1996). *M. glauca* 0BB39S01 dle původní publikace (Mugnai et al. 2003) také odpovídá dnešnímu chápání druhu, i když zmiňovaný izolát má oproti předchozím průměrně menší buňky.

### 5.2.3 *Merismopedia tenuissima*

Druh *Merismopedia tenuissima* je představován liniemi 1 a 2, které se nachází v jedné z linií řádu Synechococcales, tzv. Core (jádrové) Synechococcales – PSC clade (Mareš et al. 2019b, Obr. 7), v čeledi Prochlorococcaceae (Komárek et al. 2020). Zahnují všechny sekvence druhu *M. tenuissima* dostupné z NCBI (Agarwala et al. 2018), mé izoláty *M. tenuissima* ze všech tří lokalit, mnou sekvenovaný kmen *M. tenuissima* NIES-230 a některé blíže neurčené sekvence *Merismopedia* sp. Uvnitř celé čeledi Prochlorococcaceae jsou příbuzenské vztahy nejasné, jednotlivé větve často nejsou dobře podpořené, nicméně dle topologie je pravděpodobné, že mé izoláty a sekvence *Merismopedia* sp. EMC-0065 tvoří jednu samostatnou linii, zatímco kmeny *M. tenuissima* NIES-230, 0BB46S01 (Mugnai et al. 2003; Castiglioni et al. 2004), CHAB7021 (Shen et al. 2018) a CENA106 (Furtado et al. 2009) a další blíže nedokumentované sekvence r. *Merismopedia* druhou samostatnou linií. Všechny mé izoláty jsou umístěny v jediné oddělené monofyletické skupině s dobrou podporou (1/62) v linii 2, přičemž není patrný žádný významný rozdíl mezi sekvencemi izolátů ze všech tří izolovaných lokalit. Lze tedy předpokládat, že se jedná o jeden geneticky dobře definovaný druh.

Morfologie kolonie je mezi mými izoláty značně variabilní (Obr. 8C-E a 12). Počet buněk kolísá mezi (4–)8–192, někdy i více. Větší kolonie jsou často rozdělené do subkolonií, ohlé až zvlněné, někdy s dírami, okraje kolonií bývají nepravidelné. Avšak velikost buněk 0,8–1,6  $\mu\text{m}$  a kulovitý až oválný tvar buněk je uniformní pro všechny izoláty. Zjevně se jedná o případ toho, kdy je charakter kolonií konkrétní populace dán podmínkami prostředí, v němž se vyskytuje – nejspíše přítomností filtrátorů a spásáčů (Jezberová & Komárková 2007), či mechanickým pohybem okolního prostředí (Komárková et al. 2010). Tento jev byl

popsaný právě u rodu *Cyanobium* (Jezberová & Komárková 2007), jehož typová sekvence je blíže příbuzná linii 1 a 2. Jedná se o sekvenci kmene *C. gracile* PCC 6307 (Komárek et al. 1999), od kterého se všechny zmíněné sekvence *Merismopedia tenuissima* liší méně než 3 %. Lze předpokládat, že celý tento klastr podle běžně užívaných kritérií (Stackebrandt & Goebel 1994; Komárek 2010; Kim et al. 2014) odpovídá rodu *Cyanobium* a výše zmíněné oddělené linie představují zástupce tohoto rodu tvořící pravidelné kolonie, morfologicky shodné s definicí druhu *M. tenuissima* v dnešním smyslu s kryptickou diverzitou. Je také jisté, že se jedná o taxon jasně oddělený od všech dostupných sekvencí typového druhu *M. punctata* (Thomazeau et al. 2010; Albrecht et al. 2017).

Dle dostupných dat je postavení tylakoidů v tomto klastru parietální, reprezentované kmeny *Cyanobium gracile* PCC 6307 (Komárek et al. 1999; Mareš et al. 2019b), *Merismopedia tenuissima* NIES 230 (Obr. 7 a 11I) a *M. tenuissima* CHAB7021 (Shen et al. 2018), což plně odpovídá předpokládanému postavení tylakoidů ve skupině „PSC clade“ (Mareš et al. 2019b). Všechny kmeny *M. tenuissima* v obou liniích s dohledatelnou fotodokumentací (Mugnai 2003, Furtado 2009, Shen 2018) také morfologicky odpovídají mým izolátům *M. tenuissima* (Obr. 8C-E a 12). Velikost buněk se u všech pohybuje v rozmezí 0,7–1,4  $\mu\text{m}$  (podle Furtado et al. (2009) až 2  $\mu\text{m}$ ). Množstvím buněk v kolonii jsou variabilní obdobně jako u mých izolátů. Odpovídají tedy pojetí druhu *M. tenuissima* v současném smyslu (Komárek & Anagnostidis 1999; McGregor 2013; Kaštovský et al. 2018), avšak nikoli původnímu popisu (Lemmermann 1898), podle nějž jsou buňky 1,3–2  $\mu\text{m}$  velké a kolonie maximálně o 16 buňkách. Kmen *M. tenuissima* NIES-230 sice kolonie téměř netvoří (Obr. 10G-H), ale velikostí buněk a postavením tylakoidů pojetí druhu odpovídá (Shen et al. 2018).

Lze předpokládat, že právě tyto dvě linie budou představovat komplex druhů s malými buňkami o průměru menším než cca. 2,5  $\mu\text{m}$  – *Merismopedia tenuissima*, *M. minutissima*, *M. warmingiana*, *M. africana*, *M. affixa*, *M. venezuelica*, *M. minima* (Richter 1895, Lemmermann 1898; Schiller 1956; Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999; Komárek & Cronberg 2001; Joosten 2006) – liší se často jen ekologií či distribucí. Je tedy zřejmě potřeba hluboká taxonomická revize této morfologické skupiny společně s jasným vymezením jednotlivých druhů za použití sekvencí ITS. Pomoci může i ekologická charakteristika (Joosten 2006). Např. druh *M. minima* je v některých zdrojích uváděn jako typicky aerofytní na smáčených kamenech a planktonní jen vzácně v čistých horských biotopech (Komárek & Anagnostidis 1999), primární zdroj však o takovéto ekologii

nehovoří a popisuje tento druh jako planktonní až neustonický (de Beck & Zahlbruckner 1897). Dle jiných zdrojů je typicky planktonní a metafytonní na eutrofních stanovištích (Hindák 1992). *M. warmingiana* a *M. tenuissima* se dle prací Komárek & Anagnostidis (1999) a Pliški & Komárek (2017) liší pouze tvarem kolonie (čtvercové, resp. obdélníkové) a velikostí buněk, jejichž vymezení se ale překrývá. Jak je patrné z fotografií mých izolátů (Obr. 8C-E a 12), jeden druh může mít relativně variabilní tvar kolonie i velikost buněk. Pro větší přesnost bude proto třeba získat větší množství vzorků těchto „ecospecies“ z rozdílných biotopů – od eutrofních rybníků po horská prameniště a smáčené stěny – s morfologickou variabilitou zahrnující maximum variability představující výše zmíněnou skupinu druhů. Tyto vzorky by nejlépe měly pocházet z geograficky vzdálených lokalit.

#### **5.2.4 *Merismopedia angularis***

Linii 3 představuje jediný kmen *Merismopedia angularis* NIVA-CYA 199 (Obr. 10D-F a 11D-F), který spadá do skupiny v nedávné době popsáných taxonů z čeledi Chroococaceae (Chroococales) – *Neochroococcus* (Geng et al. 2021), *Cryptochroococcus* (Wang et al. 2021), *Pseudochoococcus* (Duval et al. 2021), *Inacoccus* (Gama et al. 2019), a *Limnococcus* (Komárková et al. 2010; Wang et al. 2021) společně se starším, ale teprve nedávno fylogeneticky zařazeným rodem *Johannesbaptistia* (Berthold et al. 2020). Kmen jako jediný z mnou sekvenovaných morfologicky přesně odpovídá původnímu popisu (R. H. Thompson 1939) i dnešnímu pojetí (Komárek & Anagnostidis 1999). Odpovídá *M. angularis* tvarem a velikostí kolonie, počtem a tvarem buněk i charakterem slizového obalu. S výše uvedenými taxony má shodné nepravidelné postavení tylakoidů (Obr. 7 a 11D-F). Také kolonie jsou podobného charakteru, často o sudém počtu buněk, s jasnou slizovou pochvou kolem buněk i kolonie samotné. Od ostatních druhů rodu *Merismopedia* se morfologicky liší nepravidelností tvaru buněk – pravidelně kulovité či polokulovité jsou vytvořené jen zřídka, a to hlavně těsně po dělení (Obr. 10D-F). Pro následné studie bude nutné analyzovat i přírodní populace *M. angularis* s typickou morfologií, a ověřit tak, zda se skutečně jedná o starý, dobře morfologicky definovaný druh vyžadující novou kombinaci v rámci jiného rodu, nebo v rámci samostatného nového rodu (Thompson 1939).

#### **5.2.5 Obecné závěry**

Jak vyplývá z mé fylogenetické analýzy, je tvar kolonie typu „*Merismopedia*“ běžný v mnoha geneticky oddělených skupinách. Jedná se patrně o podobný případ polyfyletismu jako u sinic s jednodušší životní formou, jako je *Synechococcus s.l.* (Dvořák et al. 2014a),

*Chroococcus s.l.* (Komárková et al. 2010) či *Synechocystis s.l.* (Korelusová et al. 2009), i s obdobně složitou jako *Eucapsis* (Komárek et al. 2016; Geng et al. 2021). Složitější formace kolonií pak není z evolučního hlediska náhodná. Lze předpokládat, že se jedná o evoluční reakci přinášející některé výhody, jako např. snazší akumulaci uhlíku a transport živin či ochranu vůči drobným filtrátorům a spásáčům (Bell & Tranvik 1993; Palińska & Krumbein 1998; Beardall et al. 2009). Pravidelný tvar kolonie může také být dán konkrétními podmínkami prostředí působícími na konkrétní populaci (Jezberová & Komárková 2007; Zapomělová et al. 2008; Komárková et al. 2010). Samotný tvar kolonie je pak zřejmě dalším případem mezi sinicemi běžné konvergence vzniklé kvůli jevům popsaným v práci Dvořák et al. (2014a). To, že je tvorba pravidelných čtvercových kolonií pravděpodobně starobylý znak, dokazují četné mikrofosilie sinic právě s takovýmto tvarem kolonie (Krings & Harper 2019; Krings & Sergeev 2019; Krings 2021). Obdobný tvar kolonií se objevuje napříč systémem jak u bakterií r. *Thiopedia* a *Lampropedia* (Eichler & Pfennig 1991; Xie & Yokota 2003), tak u zelených řas rodu *Crucigeniella s.l.*, kde je rovněž znám polyfyletismus (Štenclová et al. 2017). Z toho lze vyvodit, že tento typ kolonií může být pouze ekologickou adaptací vyvinutou nezávisle napříč systémem sinic (i bakterií a řas) v různých tradičně ustálených řádech, a je tedy nutná obsáhlá revize rodu *Merismopedia* založená na polyfázickém přístupu.

V rámci fylogenetického stromu se v příbuznosti linie 4 a parafyletické skupiny (linie 5, 6 a 7) zahrnujících rod *Merismopedia* objevují sekvence kmenů rodu *Synechocystis s.l.* Dle mnohých prací se jedná o polyfyletický taxon (Korelusová et al. 2009; Komárek et al. 2014; Komárek 2015 aj.), takže mé výsledky tento předpoklad jen potvrzují. Zřejmě se jedná o podobný případ tvorby kolonie založeném na konvergentní evoluci. Dalším možným vysvětlením je to, že tyto taxony určené jako *Synechocystis*, blízké příbuzné sekvencím rodu *Merismopedia*, jsou ve skutečnosti zástupci tohoto rodu a byly mylně určené jako *Synechocystis*, protože se jim v podmínkách laboratorní kultury rozpadly kolonie na jednotlivé buňky (Palińska & Krumbein 1995, 1998; Palińska et al. 1996, Obr. 11G-I). Referenční kmen *Synechocystis* sp. PCC 6803 je evidentně blízké příbuzný jedné z možných jádrových linií čeledi Merismopediaceae, což odpovídá výsledkům posledních molekulárních revizí (Korelusová et al. 2009; Komárek et al. 2014) i morfologicky založeným pracím (Komárek & Anagnostidis 1986, 1999). Je možné, že k vývoji pravidelných čtvercových kolonií v několika oddělených liniích docházelo přes „mezičlánek“ ve formě nepravidelné kolonie, kde se buňky už ale dělí ve dvou směrech

v rovině kolonie, nebo k vývoji docházelo nezávisle ze společného předka. Možné ale je i vysvětlení opačné, kdy by kolonie typu „*Synechocystis*“ vznikala sekundárně, obdobně jako sekundárně vznikaly v nezávislých evolučních událostech parietální tylakoidy (Mareš et al. 2019b). Molekulárně-fylogenetický pohled na vývoj převážně pikoplanktonního rodu pak zřejmě povede k rozdělení na mnoho nových samostatných toxonů analogicky k rodu *Synechococcus s.l.* (Komárek et al. 2020), jak naznačuje i práce Korelusová et al. (2009).

### 5.3 *Microcrocis*

Dle NCBI (Agarwala et al. 2018) dosud nebyla dostupná žádná sekvence rodu *Microcrocis*. Proto lze konstatovat, že mé sekvence izolátů *M. geminata* (Obr. 8I, 9 a 13G-H) jsou prvními sekvencemi tohoto rodu vůbec. Porovnat příbuznost k dalším taxonům tak dosud bylo možné pouze na základě morfologických předpokladů. Mé izoláty přesně odpovídají původnímu popisu jak velikostí ((3–)4–6(–7)  $\mu\text{m}$  na 12–16  $\mu\text{m}$ ) a cylindricky-oválným tvarem buněk, tak jejich nepravidelným postavením v kolonii i jejich velkým počtem (Obr. 8I, 9C-E a 13G-H) (Lagerheim 1883). Lagerheim (1883), Fott (1972), Komárek & Anagnostidis (1986, 1999) i Komárek et al. (2014) předpokládají blízkou příbuznost s rodem *Merismopedia* v čeledi Merismopediaceae (Synechococcales). Pokud výše zmíněná parafyletická skupina (linie 5, 6 a 7) zastupuje pravou linii rodu *Merismopedia*, a tedy čeleď Merismopediaceae, pak jsou má zjištění v rozporu s předpoklady založenými výhradně na morfologii. Je však pravdou, že *Microcrocis* spadá do jedné monofyletické skupiny společně s „morphotaxony“ určenými jako *Merismopedia* v čeledi Geminocystaceae a předpoklad o příbuznosti na základě morfologických znaků je do jisté míry pravdivý.

V optickém mikroskopu je morfologická podobnost izolátů *Microcrocis geminata* patrná zejména s mými izoláty taxonu určeného jako *Merismopedia glauca* – oba taxony mají ploché kolonie, v menších koloniích *Microcrocis* jsou některé řady buněk mírně pravidelné (Fott 1972), a naopak některé kolonie *Merismopedia glauca* mají řady nepravidelné či posunuté (Joosten 2006). Na plochém průřezu mají oba taxony polokulovitý až kulovitý tvar buněk. V kolmém průřezu jsou však buňky *Microcrocis* dlouze oválné, a nikoli kulovité. Další samostatné taxony v linii 4 ale samy plně neodpovídají popisu žádného dosud známého druhu r. *Microcrocis*. Izoláty *Merismopedia glauca* nejbližše odpovídají rozložením buněk v kolonii druhům *Microcrocis marina* a *M. gigas* (Komárek & Anagnostidis 1999), ty ale nekorespondují tvarem buněk a ekologií (Lagerheim 1883;

Komárek & Anagnostidis 1995, 1999). Naopak tvarem a velikostí kolonie i buněk se izoláty *Merismopedia glauca* velmi podobají druhu *Microcrocis obvoluta* (Komárek & Anagnostidis 1999), neshodují se však rozložením buněk v kolonii – *Microcrocis obvoluta* má oproti izolátům *Merismopedia glauca* značně nepravidelné uspořádání (Tiffany 1934).

*Merismopedia* cf. *punctata/hyalina* velikostí buněk nejvíce odpovídá druhům *Microcrocis irregularis* a *M. sabulicola* (Komárek & Anagnostidis 1999). Od *M. irregularis* se odlišuje pravidelnými řadami buněk (Lagerheim 1883). *M. sabulicola* naopak v inicálních fázích vývoje tvoří pravidelné řady (Komárek & Anagnostidis 1999), jedná se však o epipsamonní, mořský až brakický druh (Lagerheim 1883), a sladkovodnímu taxonu *Merismopedia* cf. *punctata/hyalina* tím pádem neodpovídá ekologii. Pravidelné řady buněk tvoří *Microcrocis gigas* a *M. marina*, ty ale *Merismopedia* cf. *punctata/hyalina* neodpovídají prodlouženým tvarem buněk a jejich velikostí (Lagerheim 1883; Komárek & Anagnostidis 1995, 1999).

Na snímcích *Microcrocis geminata* z TEM (Obr. 9A-B) je také jasně viditelné paralelní postavení tylakoidů dosud známé a typické pouze u rodu *Cyanobacterium* a *Geminocystis*, vzniklé pravděpodobně jedinou evoluční událostí z tylakoidů fascikulárních nebo parietálních (Mareš et al. 2019b). Právě tyto dva rody představované kmeny *Cyanobacterium stanieri* PCC 7202 (Rippka & Cohen-Bazire 1983), *Cyanobacterium aponinum* PCC 10605, *Geminocystis* sp. CENA526, *Geminocystis herdmannii* PCC 6308 (Korelusová et al. 2009), *Geminocystis* sp. CHAB 6541 a *Geminocystis* sp. NIES-3708 jsou dle fylogenetického stromu nejpříbuznější klastru zahrnujícímu *Microcrocis*. Pro nedostatek biomasy dalších mnou izolovaných taxonů v tomto klastru (*Merismopedia* cf. *punctata/hyalina*, *M. glauca*, cf. *Merismopedia* sp.) nebylo možné přítomnost paralelních tylakoidů potvrdit i u nich. V porovnání s nepravidelně fascikulárním postavením tylakoidů rodu *Geminobacterium* (Brito et al. 2017) a radiálním postavením rodu *Annamia* (Tuji et al. 2021) však paralelní postavení tylakoidů zjevně není univerzálním znakem čeledi Geminocystaceae. Byl by ale společný pro čeleď Cynobacteriaceae sensu Mareš et al. (2019b). Dle matice podobnosti sekvencí v linii 4 (Tab. VI) je *Microcrocis* zřejmě geneticky oddělený samostatný rod. Manuskript s těmito novými rozšiřujícími informacemi o rodu byl odeslán k recenznímu řízení (Pokorný et al. 2022 in review).

## 5.4 *Eucapsis*

Mé tři úspěšně sekvenované izoláty r. *Eucapsis* (Obr. 8F) – *E. pseudalpina sensu* Komárek et al. (2016) – spadají spolu se všemi dostupnými sekvencemi rodu *Eucapsis* a mnou sekvenovaným kmenem *Eucapsis* sp. CCALA 889 do jediného klastru zřejmě v řádu Chroococcales. V rámci tohoto většího klastru se ale dělí do tří samostatných monofyletických skupin, a rod je tak zjevně polyfyletický. Dosud nejsou dostupné sekvence typového druhu *E. alpina* (Agarwala et al. 2018). Mé izoláty tohoto rodu dle determinační literatury náleží druhu *E. alpina* (Komárek & Anagnostidis 1999), práce Komárek et al. (2016) ale druh s malým počtem buněk a evropským rozšířením označuje jako *E. pseudalpina*. S původním popisem *E. alpina* (Clements & Shantz 1909) se mé izoláty shodují velikostí buněk cca. 5–8 µm, krychlovitým tvarem kolonie i nápadným slizovým obalem. „Pravou“ linii rodu tak nelze s jistotou určit. Stejně tak je možné, že *E. alpina* a *E. pseudalpina* jsou jediným „genospecies“, u kterého je počet buněk v kolonii určen vlivem prostředí (Palińska & Krumbein 1995, 1998; Jezberová & Komárková 2007).

První linii rodu představují pouze mé izoláty. Nejbližším sesterským taxonem mých izolátů je v mé analýze *Rhabdogloea smithii* SAG 47.91. Tento konkrétní kmen nemá dostupnou dohledatelnou fotografickou dokumentaci, avšak Komárek (1983) popisuje rod *Rhabdogloea* jako koloniální, kokální, s podlouhlými až válcovitými buňkami umístěnými v rámci kolonie nepravidelně. Morfolgicky tak vůbec neodpovídá rodu *Eucapsis* (Clements & Shantz 1909; Komárek et al. 2016).

Druhou linii představuje mnou sekvenovaný kmen *Eucapsis* sp. CCALA 889 a *Eucapsis* sp. 019 (Komárek et al. 2016). V tomto klastru se nacházejí i sekvence kmenů nedávno posaného taxonu *Alborzia kermanshahica* S2 (Nowruzi & Soares 2021) a *Chalicogloea cavernicola* CCALA 975 (Roldán et al. 2013). Tyto dva taxony jsou v literatuře umísťovány do čeledi Chroococcaceae (Chroococcales) (Roldán et al. 2013; Nowruzi & Soares 2021). Pokud by tento klastr čeledi Chroococcaceae skutečně představoval, pak by umístění rodu *Eucapsis* odpovídalo předpokladům předmolekulárních studií (Clements & Shantz 1909). V mé analýze však čeledi Chroococcaceae tvoří linii naprosto nepřibuznou těmto kmenům a umístění klastru je podobnější výsledkům práce Komárek et al. (2016), tedy v blízkosti (pravděpodobného umístění) čeledi Merismopediaceae, nikoli však jako její součást. Morfolgicky jsou si všechny kmeny v tomto klastru podobné – tvoří nepravidelné kolonie a velké agregáty buněk s občasným náznakem pravidelných krychlovitých kolonií (Roldán et al. 2013; Nowruzi & Soares 2021,

Obr. 10A-C), jen *Eucapsis* sp. 019 tvoří krychlovité kolonie častěji (Komárek et al. 2016). Dle fylogenetického stromu bude celý tento klastř pravděpodobně vyžadovat oddělení jako samostatná čeleď řádu Chroococcales. Tyto výsledky však přirozeně budou vyžadovat potvrzení v rámci komplexnější analýzy.

Třetí klastř zahrnuje kmen *Eucapsis minor* SAG 14.99, jedinou dosud dostupnou sekvenci rodu určenou do druhu (Agarwala et al. 2018). Klastř nejspíše představuje čeleď Microcystaceae, obsahující i typový druh čeledi *Microcystis aeruginosa* (kmeny NIES-843 a LEGE 91341). Toto postavení rodu odpovídá některým na morfologii založeným studiím, odkazujícím se na dělení buněk ve třech rovinách (Komárek & Anagnostidis 1986). Molekulární revize rodu *Eucapsis* (Komárek et al. 2016) ale do fylogenetické analýzy sekvence *Microcystis* vůbec nezařazuje. Naproti tomu práce da Silva Malone et al. (2014) právě do čeledi Microcystaceae umisťuje rod *Pannus*, do té doby patřící do čeledi Merismopediaceae (Komárek & Anagnostidis 1999; Komárek et al. 2014). Do shodné pozice spadá sekvence *P. brasiliensis* CCIBt3594 i v mé analýze. Morfologicky se *P. brasiliensis* rodu *Microcystis* podobá laločnatými koloniemi, které jsou však duté (da Silva Malone et al. 2014). Naproti tomu kmen *E. minor* SAG 14.99 dle fotografií i popisu v práci Komárek et al. (2016) plně odpovídá rodu *Eucapsis*, a nikoli *Microcystis*, byť mohla být tvorba kolonií ovlivněna kultivací. Neodpovídá ale původnímu popisu ani dnešnímu pojetí druhu *E. minor* velikostí buněk (Skuja 1926; Komárek & Anagnostidis 1999; Komárek et al. 2016). Dle práce Palińska & Krumbein (1998) ale velikost buněk pro determinační účely nemusí v případě kultury druhu s takto postavenou kolonií hrát roli.

Dle dostupných dat z literatury mají všechny taxony klastřu ve všech třech liniích nepravidelné až fascikulární tylakoidy (da Silva Malone et al. 2014; Komárek et al. 2016; Mareš et al. 2019a, b; Nowruzi & Soares 2021). Mnou sekvenovaný kmen *Eucapsis* sp. CCALA 889 má na fotografiích z TEM fascikulární postavení tylakoidů (Obr. 7 a 11A-C). Práce Mareš et al. (2019b) sice *Eucapsis* v analýze nezahrnuje, klastřy *Microcystis/Pannus* a *Gloeothoece/Chalicoglea*, kam mé sekvence *Eucapsis* fylogeneticky spadají, fascikulárním postavením tylakoidů odpovídají. Toto odpovídá i zjištěním o postavení tylakoidů v původní literatuře (Roldán et al. 2013; da Silva Malone et al. 2014; Nowruzi & Soares 2021).

Tvorba kolonií typu „*Eucapsis*“ je tedy zřejmě ovlivněna obdobnými faktory jako u typu „*Merismopedia*“. Navíc může být tvar kolonií ovlivněn pohybem média nebo v přírodních podmínkách turbulencemi ve vodním prostředí, což se nejčastěji projevuje menšími buňkami, rozvolněnými koloniemi a tenčím slizovým obalem (Komárková et al.



2010). To vše vede ke stejnému důsledku – polyfyletismu a opakované tvorbě tohoto typu kolonií na více místech systému sinic jak v klastru, který popisují výše (Komárek et al. 2016; Nowruzi & Soares 2021), tak i mezi taxony, které za *Eucapsis* považovány nebyly, a přesto tvoří krychlovité kolonie. Např. kolonie rodu *Neochroococcus* (Geng et al. 2021) vznikají stejným způsobem dělení jako u *Eucapsis*, pravidelně ve třech rovinách (Komárek & Anagnostidis 1986). Na rozdíl od tohoto případu se v koloniích rodu *Pseudochroococcus* buňky dělí i ve více rovinách, ve starších koloniích i nepravidelně (Duval et al. 2021). Tento typ kolonie je obdobně jako u typu „*Merismopedia*“ starobylým znakem, což dokazují poměrně časté mikrofosilie (Licari et al. 1969; Beraldi-Campesi et al. 2004; Krings & Sergeev 2019).

## 5.5 Naznačené trendy pro budoucí výzkum

Z mých zjištění i z literatury (Salazar et al. 2020) je jasné, že oproti současnému zařazení některých taxonů a oproti výsledkům poslední velké revize (Komárek et al. 2014) bude pravděpodobně nutné provést velké množství změn a taxonomických transferů.

Bude potřeba vyřešit problematiku kryptické diverzity typového druhu *Merismopedia punctata* a zároveň vymezit rozdíly mezi *M. punctata*, *M. hyalina* a *M. tranquilla*, či potvrdit jejich synonymitu (Nägeli 1849). Nejjednodušším řešením by byla retypifikace *M. punctata* na základě nového typového materiálu z původní typové lokality (Meyen 1829), ustanovení typového kmenu a získání důvěryhodné referenční sekvence. Roli při budoucí determinaci může hrát postavení tylakoidů.

Pokud by byla za „pravou“ linii rodu *Merismopedia* (a tedy i čeledi Merismopediaceae) považována parafyletická skupina (linie 5, 6 a 7), pak z dostupných sekvencí taxonů čeledi Merismopediaceae *sensu* Komárek et al. (2014) by dle mé analýzy do této čeledi skutečně spadal pouze typový rod *Merismopedia* zastoupen sekvencemi kmenů *M. elegans* B1448-1, *M. glauca* CCAP 1448/3, 0BB39S01 a *M. punctata* NIVA-CYA 16, PMC242.05 a PMC260.06 společně s rodem *Synechocystis s.s.* (*Synechocystis aquatilis* PCC 680, *S. salina* LEGE 31). Čeď by pak zřejmě spadala do jedné z větví polyfyletického řádu Synechococcales, nikoli však do té zahrnující „pravou“ linii typového rodu *Synechococcus* (Salazar et al. 2020). Jak již naznačily předchozí studie (Wang et al. 2021), rod *Limnococcus* nepatří do čeledi Merismopediaceae (Komárková et al. 2010) nýbrž Chroococcaceae. V mé analýze zahrnující sekvence dvou druhů včetně typového druhu *L. limneticus* je tento rod monofyletický. Jediná dostupná sekvence rodu *Pannus*

(*P. brasiliensis* CCIBt3594) podporuje postavení rodu mimo Merismopediaceae v čeledi Microcystaceae (da Silva Malone et al. 2014).

Nejspíše tak bude třeba ustanovit nové taxony v čeledi Geminocystaceae (Chroococcales) (Tuji et al. 2021). Izoláty taxonu mnou určeného jako *Merismopedia glauca* jsou zjevně naprosto nepříbuzné ostatním kmenům *M. glauca* v parafyletické skupině linií 5, 6 a 7 a morfologicky se překrývají s některými dalšími druhy r. *Merismopedia*. Do čeledi Geminocystaceae bude pravděpodobně přesunut i rod *Microcrocis* (Pokorný et al. 2022 in review). Důležité proto bude také porovnat fylogenetické postavení přírodních populací zástupců r. *Merismopedia* s makroskopickými koloniemi a rozhodnout, zda se nejedná o příbuzný taxon rodu *Microcrocis*, jak do jisté míry naznačují mé výsledky.

Bude nutné provést revizi rodu *Cyanobium* zahrnující koloniální taxony dosud určované jako *Merismopedia tenuissima*. Při této revizi bude nutné brát na vědomí, že ve skupině druhů r. *Merismopedia* s malými buňkami je v současné době uznáváno několik oddělených taxonů (*M. tenuissima*, *M. minima*, *M. warmingiana*, *M. minutissima*, *M. africana*, *M. venezuelica*) lišících se zpravidla ekologií, distribucí či postavením buněk v kolonii (de Beck & Zahlbruckner 1897; Schiller 1956; Hindák 1992; Komárek & Anagnostidis 1999; Komárek & Cronberg 2001; Joosten 2006; McGregor 2013). Je tedy třeba zjistit, zda se tyto ustálené taxony liší mezi sebou i na molekulární úrovni. Jak je patrné i z mých zjištění, morfologická variabilita na úrovni postavení buněk v kolonii je u *M. tenuissima sensu* Komárek & Anagnostidis (1999) a *sensu* Kaštovský et al. (2018) běžným jevem. Rovněž bude nutné pro fylogenetickou analýzu použít i region ITS. Na základě těchto analýz bude možné vyvodit patřičné taxonomické závěry, jako je popis nových druhů a rodů, či nové kombinace (Komárková et al. 2010).

Otázka vnitrodruhové kryptické diverzity není vyřešena zejména u druhů nalézáných v diametrálně odlišných prostředích, jako např. *Merismopedia glauca*, *M. punctata*, *M. elegans* či *M. tenuissima* nalézáných kosmopolitně jak v méně úživných (Skuja 1956; Komárek & Anagnostidis 1999) tak i eutrofních (Aktan & Aykulu 2003; Radwan et al. 2018) sladkovodních biotopech a zároveň v salinních biotopech včetně mořského pobřeží (Kützing 1845; Palińska et al. 1996; Silva & Pienaar 1999; Pliński & Komárek 2017). Stejně podezřelá je u několika druhů i značná variabilita ve zbarvení obsahu buněk od modrozelené po načervenalou. Může se však také jednat o adaptaci na nedostatek světla ve větších hloubkách (Komárek & Anagnostidis 1999).

Zbylé zástupce čeledi bez dostupných sekvencí – *Coccopedia*, *Cyanotetras* a *Mantellum* je třeba molekulárně revidovat za použití polyfázického přístupu. První dva zmíněné taxony mohou být problematické svou distribucí – r. *Coccopedia* je nacházen hlavně v oblastech střední Asie a východní Evropy (Troitzkaja 1922; Guiry & Guiry 2022), navíc velmi sporadicky, r. *Cyanotetras* je naopak běžný zejména ve střední a jižní Americe (Komárek 1995; Komárek & Komárková-Legnerová 2002; Muciño-Márquez et al. 2021). Jediný druh *Cyanotetras fusca* je znám a popsán ze střední Evropy (Hindák 1988). U r. *Coccopedia* se navíc předpokládá, že by se ve skutečnosti mohlo jednat o nepřesně popsané zástupce r. *Merismopedia* (Hindák 1992). Původní popis typového druhu navíc není doplněn ilustrací (Troitzkaja 1922). Rod *Mantellum* by při zpracovávání revize mohl rovněž být problematický zejména ve fázi izolace čistého materiálu, jelikož se jedná o čistě epifytický rod, navíc nalézáný relativně sporadicky (Komárek & Watanabe 1998; Hindák 2002; Guiry & Guiry 2022).

## 6 Shrnutí

V rámci rešerše jsem shrnul současné znalosti o čeledi Merismopediaceae se zaměřením na typový rod *Merismopedia*. Sestavil jsem tabulku shrnující současně platné druhy tohoto rodu. V této práci jsem studoval sedm vybraných taxonů sinic čeledi Merismopediaceae z celkem devíti lokalit. Pomocí mikrokapilární izolace jsem získal 131 individuálních izolátů, z nichž 54 jsem úspěšně sekvenoval a použil ve fylogenetické analýze genu pro 16S rRNA. Pro fylogenetickou analýzu jsem použil i čtyři dosud nesekvenované kmeny. Použil jsem tři odlišné molekulární metody (MDA, Nested PCR, Izolace gDNA) úpravou jedné z nich jsem vytvořil de novo metodu Nested ITS. Výsledky fylogenetické analýzy jsem porovnal s morfologií včetně postavení tylakoidů a na jejím základě navrhl několik možných taxonomických transferů a úprav.

Některé závěry bude nutné doplnit o další data, ale jasných je již několik skutečností. Rod *Merismopedia* je zjevně polyfyletický a tvoří alespoň sedm monofyletických linií. Není dosud jasné, kde se nachází rod *Merismopedia* s.s., přičemž druhy *M. tenuissima* a *M. angularis* jsou zjevně naprosto nepříbuzné typovému druhu *M. punctata*. „Morphospecies“ *M. tenuissima* se naopak vymykají trendu ustanovování nových rodů sinic, jelikož zřejmě náleží tradičnímu rodu *Cyanobium*. Fylogenetická pozice rodu *Microcrocis* byla poprvé podpořena molekulárními daty a doplněna o snímky TEM. Rod *Eucapsis* je rovněž zjevně polyfyletický a rozpadá se nejméně do tří monofyletických linií.

Nová data a poznatky o rodech *Microcrocis* a *Merismopedia* budou součástí samostatných odborných publikací a pomohou rozšířit poznatky o systému sinic.

## 7 Literatura

- Agarwala R., Barrett T., Beck J., et al 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 46(1): 8–13
- Ajlani G. & Vernotte C. 1998. Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology* 37(3): 577–580
- Aktan Y. & Aykulu G. 2003. A study on the occurrence of *Merismopedia* Meyen (Cyanobacteria) populations on the littoral sediments of Izmit Bay (Turkey). *Turkish Journal of Botany* 27(4): 277–284
- Albrecht M., Pröschold T. & Schumann R. 2017. Identification of Cyanobacteria in a Eutrophic Coastal Lagoon on the Southern Baltic Coast. *Frontiers in Microbiology* 8(MAY): 923
- Askenazy E. 1894. Über einige australische Meeresalgen. *Flora, Jena* 78: 1–18
- Averina S. G., Velichko N. v., Pinevich A. A., et al 2019. Non-a chlorophylls in cyanobacteria. *Photosynthetica* 57(4): 1109–1118
- Azevedo M. T. P. & Sant' Anna C. L. 2003. *Sphaerocavum*, a new genus of planktic Cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algological Studies* 109(1): 79–92
- Bachmann H. 1920. *Merismopedia Trolleri* nov. spec. *Zeitschrift für Hydrologie* 1: 350
- Beardall J., Allen D., Bragg J., et al 2009. Allometry and stoichiometry of unicellular, colonial and multicellular phytoplankton. *New Phytologist* 181(2): 295–309
- Bell J. R. 2008. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *Biotechniques* 44(6): 834
- Bell R. T. & Tranvik L. 1993. Impact of Acidification and Liming on the Microbial Ecology of Lakes. *Ambio* 22(5): 325–330
- Bennett A. W. 1886. Fresh-water Algæ (including Chlorophyllaceous Protophyta) of the English Lake District; with descriptions of twelve new species. *Journal of the Royal Microscopical Society, series 2* 6(1): 1–15
- Beraldi-Campesi H., Cevallos-Ferriz S. R. S. & Chacón-Baca E. 2004. Microfossil algae associated with Cretaceous stromatolites in the Tarahumara Formation, Sonora, Mexico. *Cretaceous Research* 25(2): 249–265

- Berthold D. E., Lefler F. W., Werner V. R. & Dail Laughinghouse H. 2020. *Johannesbaptistia floridana* sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria), a novel marine cyanobacterium from coastal south florida (USA). *Fottea* 20(2): 152–159
- Boratyn G. M., Thierry-Mieg J., Thierry-Mieg D., et al 2018. Magic-BLAST, an accurate DNA and RNA-seq aligner for long and short reads. *bioRxiv* 20: 1–19
- Boyer S. L., Flechtner V. R. & Johansen J. R. 2001. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 18(6): 1057–1069
- Brannon M. A. 1952. Some Myxophyceae in Florida. *Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences* 15(2): 70–78
- Brito Â., Ramos V., Mota R., et al 2017. Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 111: 18–34
- Brown A. O., Romanis C. S., Dvořák P., et al 2021. A new species of cryptic cyanobacteria isolated from the epidermis of a bottlenose dolphin and as a bioaerosol. *Phycologia* 60(6): 603–618
- Castiglioni B., Rizzi E., Frosini A., et al 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12): 7161–7172
- Clements F. E. & Shantz H. L. 1909. A new genus of bluegreen algae. *Minnesota Botanical Studies* 4(20): 133–135
- Cordeiro R., Luz R., Vasconcelos V., et al 2020. Cyanobacteria phylogenetic studies reveal evidence for polyphyletic genera from thermal and freshwater habitats. *Diversity (Basel)* 12(8): 1–13
- Cumbers J. & Rothschild L. J. 2014. Salt tolerance and polyphyly in the cyanobacterium *Chroococciopsis* (Pleurocapsales). *Journal of Phycology* 50(3): 472–482
- da Silva Malone C. F., Alvarenga D. O., Fiore M. F. & Sant'Anna C. L. 2014. Towards a phylogenetic position for the morphologically-defined genus *Pannus* (Cyanobacteria). *Nova Hedwigia* 99(3–4): 511–524

- de Beck G. & Zahlbruckner A. 1897. Schedae ad “Kryptogamas exsiccatas” editae a Museo Palatino Vindobonensi. Centuria III. *Annalen des KK Naturhistorischen Hofmuseums* 12: 75–98
- de Brébisson L. A. 1839. De quelques nouveaux genres d’algues. *Mémoires de la Société Académique, Agricole, Industrielle et d’Instruction de l’Arrondissement de Falaise* 34–37
- de Toni J. B. 1907. *Sylloge algarum omnium hucusque cognitarum. Vol. V [of De Toni, J.B. “Sylloge Algarum Omnium”]. Sylloge Myxophycearum*. Sumptibus auctoris, Padova
- Duval C., Hamlaoui S., Piquet B., et al 2021. Diversity of cyanobacteria from thermal muds (Balaruc-Les-Bains, France) with the description of *Pseudochroococcus coutei* gen. nov., sp. nov. *FEMS Microbes* 2: xtab006
- Dvořák P., Casamatta D. A., Hašler P., et al 2017. Diversity of the Cyanobacteria. In: *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Springer International Publishing, Cham, pp 3–46
- Dvořák P., Casamatta D. A., Pouličková A., et al 2014a. *Synechococcus*: 3 billion years of global dominance. *Molecular Ecology* 23(22): 5538–5551
- Dvořák P., Hindák F., Hašler P., et al 2014b. Morphological and molecular studies of *Neosynechococcus sphagnicola*, gen. et sp. nov. (Cyanobacteria, Synechococcales). *Phytotaxa* 170(1): 24–34
- Dvořák P., Jahodářová E., Casamatta D. A., et al 2018. Difference without distinction? Gaps in cyanobacterial systematics; when more is just too much. *Fottea* 18(1): 130–136
- Dvořák P., Pouličková A., Hašler P., et al 2015. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodiversity and Conservation* 24(4): 739–757
- Ehrenberg C. G. 1834. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abhandlungen der Königlischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 145–336
- Ehrenberg C. G. 1832. *Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusionsthier; nebst fernerer Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme*, 1st edn. Königlischen Akademie der Wissenschaften, Berlin

- Eichler B. & Pfennig N. 1991. Isolation and characteristics of *Thiopedia rosea* (neotype). *Archives of Microbiology* 155(3): 210–216
- Elenkin A. A. 1923. O sistematicheskom podrazdenii poryadka Chroococcales Geitler (1925). *Trudy Botanicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR, Ser 2, Sporovye Rasteniya* 1: 17–21
- Engene N., Cameron Coates R. & Gerwick W. H. 2010. 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. *Journal of Phycology* 46(3): 591–601
- Fott B. 1967. *Sinice a řasy*, 2nd edn. Academia, Praha
- Fott B. 1972. On the Occurrence and the Taxonomy of the Genus *Microcrocis* P. Richter (Cyanophyceae). *Preslia* 44(1): 97–99
- Furtado A. L. F. F., Calijuri M. D. C., Lorenzi A. S., et al 2009. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* 627(1): 195–209
- Gama W. A., Rigonato J., Fiore M. F. & Sant'Anna C. L. 2019. New insights into *Chroococcus* (Cyanobacteria) and two related genera: *Cryptococcum* gen. nov. and *Inacoccus* gen. nov. *European Journal of Phycology* 54(3): 315–325
- Gardner N. L. 1906. Cytological studies in Cyanophyceae. *University of California Publications in Botany* 2(12): 237–296
- Geng R., Wang Y., Cai F., et al 2021. *Neochroococcus gongqingensis* gen. Et sp. nov., a new member of coccoid cyanobacteria from a watercourse, eastern China. *Fottea* 21(1): 44–52
- Genuário D. B., De Souza W. R., Monteiro R. T. R., et al 2018. *Amazoninema* gen. Nov., (Synechococcales, Pseudanabaenaceae) a novel cyanobacteria genus from brazilian amazonian rivers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68(7): 2249–2257
- Graham L. E., Graham J. M. & Wilcox L. W. 2009. *Algae*, 2nd edn. Benjamin Cummings, San Francisco
- Guerrera S. A. & Ferrario M. E. 1978. Algunos taxones novedosos para la ficoflora Argentina. *Physis* 38(94): 9–19



- Guindon S., Dufayard J., Lefort V., et al 2010. Guindon et al. - 2010 - New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307–321
- Guiry M.D. & Guiry G.M. 2022. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>. (čteno 31. 3. 2022)
- Gupta P. 2012. *Algae of India Volume 1. A checklist of Cyanoprokaryota (Cyanophyceae)*, 1st edn. Botanical Survey of India, Ministry of Environment & Forests, Salt Lake, Kolkata
- Hauerová R., Hauer T., Kaštovský J., et al 2021. *Tenebriella* gen. nov. – The dark twin of *Oscillatoria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 165(January): 107293
- Henckel A. G. 1909. Novye vidy i raznovidnosti vkhodiashchie v sostav fitoplanktona Kaspiyskogo moria (Predvaritelnoe soobshchenie). *Scripta Botanica Horti Universitatis Imperialis Petropolitanae* 26: 53–56
- Hindák F. 1992. On the taxonomy of the genus *Merismopedia* and related genera (Cyanophyta). *Algological Studies* 67: 3–19
- Hindák F. 1982. On some planctonic coccoid blue-green algae characteristic by Fe-precipitates. *Algological Studies* 32: 6–8
- Hindák F. 1988. Contribution to the taxonomy of some cyanophyte genera. *Preslia* 60(4): 289–308
- Hindák F. 2002. *Mantellum commune*, a new sessile and/or neustonic species of the merismopedioid Cyanophyta/Cyanobacteria. *Biologia (Bratisl)* 57(1): 51–57
- Hortobágy T. 1974. Egy új Kékalga a Dunából: *Merismopedia danubiana* Hortob. n. sp. *Botanikai Közlemények* 61(1): 7–23
- Howe C. J., Barbrook A. C., Nisbet R. E. R., et al 2008. The origin of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1504): 2675–2685
- Jahodářová E., Dvořák P., Hašler P., et al 2018. *Elainella* gen. nov.: a new tropical cyanobacterium characterized using a complex genomic approach. *European Journal of Phycology* 53(1): 39–51

- Jahodářová E., Dvořovák P., Hašler P. & Pouličková A. 2017. Revealing hidden diversity among tropical cyanobacteria: The new genus *Onodrimia* (Synechococcales, Cyanobacteria) described using the polyphasic approach. *Phytotaxa* 326(1): 28–40
- Janda J. M. & Abbott S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9): 2761–2764
- Janse I., Kardinaal W. E. A., Meima M., et al 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 3979–3987
- Jezberová J. & Komárková J. 2007. Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. *Environmental Microbiology* 9(7): 1858–1862
- Johansen J. R., González-Resendiz L., Escobar-Sánchez V., et al 2021. When will taxonomic saturation be achieved? A case study in *Nunduva* and *Kyrtuthrix* (Rivulariaceae, Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 57(6): 1699–1720
- Johansen J. R., Kovacik L., Casamatta D. A., et al 2011. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). *Nova Hedwigia* 92(3–4): 283–302
- Joosten A. M. T. 2006. *Flora of the blue-green algae of the Netherlands I The non-filamentous species of inland waters*, 1st edn. KNNV Publishing, Utrecht
- Kaneko T., Sato S., Kotani H., et al 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Research* 3(3): 185–209
- Kaneko T. & Tabata S. 1997. Complete Genome Structure of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant and Cell Physiology* 38(11): 1171–1176
- Kaneko T., Tanaka A., Sato S., et al 1995. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Research* 2(4): 153–166

- Kaštovský J., Hauer T., Geriš R., et al 2018. *Atlas sinic a řas ČR 1*, 1st edn. powerprint, Praha
- Keliri E., Paraskeva C., Sofokleous A., et al 2021. Occurrence of a single-species cyanobacterial bloom in a lake in Cyprus: monitoring and treatment with hydrogen peroxide-releasing granules. *Environmental Sciences Europe* 33(1): 31
- Kim D. H., Choi H. J., Ki J. S. & Lee O. M. 2021. *Pinocchia daecheonga* sp. nov. (Synechococcales, Cyanobacteria) isolated from a Daecheong Lake in Geum River, Republic of Korea. *Phytotaxa* 510(2): 135–147
- Kim M., Oh H. S., Park S. C. & Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(PART 2): 346–351
- Komárek J. 2016. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology* 51(3): 346–353
- Komárek J. 2018. Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system. *Hydrobiologia* 811(1): 7–17
- Komárek J. 2020. Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019). *Fottea* 20(1): 104–110
- Komárek J. 2010. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639(1): 245–259
- Komárek J. 2015. Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: State as of 2014. *Hydrobiologia* 764(1): 259–270
- Komárek J. 1995. Studies on the cyanophytes (Cyanoprokaryotes) of Cuba 10. New and little known chroococcalean species. *Folia Geobotanica* 30(1): 81–90
- Komárek J. 1983. *Rhabdogloea*, the correct name of cyanophycean *Dactylococcopsis* sensu auctt., non Hansgrig (1888). *Taxon* 32(3): 464–466
- Komárek J. & Anagnostidis K. 1995. Nomenclatural novelties in chroococcalean cyanoprokaryotes. *Preslia* 67: 15–23

- Komárek J. & Anagnostidis K. 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 - Chroococcales. *Archiv für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beiträge* 73(2): 157–226
- Komárek J. & Anagnostidis K. 1999. *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/1: Cyanoprokaryota*, 1st edn. Springer Spektrum, Jena
- Komárek J. & Cronberg G. 2001. Some chroococcalean and oscillatorial cyanoprokaryotes from southern African lakes, ponds and pools. *Nova Hedwigia* 73(1–2): 129–160
- Komárek J., Hindák F. & Jezberová J. 2016. Review of the cyanobacterial genus *Eucapsis*. *Nova Hedwigia* 103(3–4): 441–456
- Komárek J., Johansen J. R., Šmarda J. & Strunecký O. 2020. Phylogeny and taxonomy of *Synechococcus*-like cyanobacteria. *Fottea* 20(2): 171–191
- Komárek J. & Kaštovský J. 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 109(August 2003): 305–325
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J. R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335
- Komárek J. & Komárková-Legnerová J. 2002. Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia* 74(3): 207–233
- Komárek J. & Komárková-Legnerová J. 1992. Variability of some planktic gomphosphaerioid cyanoprokaryotes in northern lakes. *Nordic Journal of Botany* 12(5): 513–524
- Komárek J., Kopecký J. & Cepák V. 1999. Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. *Cryptogamie, Algologie* 20(3): 209–222
- Komárek J. & Watanabe M. 1998. Contribution to the attached Cyanoprokaryotes from submerged biotopes in Sagarmatha National Park (Eastern Nepal). *Bulletin of the National Science Museum Series B* 24(4): 117–135

- Komárková J., Jezberová J., Komárek O. & Zapomělová E. 2010. Variability of *Chroococcus* (cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationships. *Hydrobiologia* 639(1): 69–83
- Konstantinou D., Voultziadou E., Panteris E. & Gkelis S. 2021. Revealing new sponge-associated cyanobacterial diversity: Novel genera and species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 155(October 2020): 106991
- Korelusová J., Kaštovský J. & Komárek J. 2009. Heterogeneity of the cyanobacterial genus *Synechocystis* and description of a new genus, *Geminocystis*. *Journal of Phycology* 45(4): 928–937
- Krings M. 2021. *Rhyniotaxillus minutulus* n. sp., a pico-sized colonial cyanobacterium from the 410-million-yr-old Windyfield chert of Scotland. *Nova Hedwigia* 113(1–2): 17–31
- Krings M. & Harper C. J. 2019. A microfossil resembling *Merismopedia* (Cyanobacteria) from the 410-million-yr-old Rhynie and Windyfield cherts – *Rhyniococcus uniformis* revisited. *Nova Hedwigia* 108(1–2): 17–35
- Krings M. & Sergeev V. N. 2019. A coccoid, colony-forming cyanobacterium from the Lower Devonian Rhynie chert that resembles *Eucapsis* (Synechococcales) and *Entophysalis* (Chroococcales). *Review of Palaeobotany and Palynology* 268: 65–71
- Kurmayer R., Christiansen G., Holzinger A. & Rott E. 2018. Single colony genetic analysis of epilithic stream algae of the genus *Chamaesiphon* spp. *Hydrobiologia* 811(1): 61–75
- Kützing F. T. 1845. *Phycologia germanica, d. i. Deutschlands Algen in bündigen Beschreibungen. Nebst einer Anleitung zum Untersuchen und Bestimmen dieser Gewächse für Anfänger*, 1st edn. Wilhelm Köhler, Nordhausen
- Kützing F. T. 1849. *Species Algarum*. F.A. Brockhaus, Lipsko
- Kützing F. T. 1843. *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange. Mit 80 farbig gedruckten Tafeln, gezeichnet und gravirt vom Verfasser*, 1st edn. F.A. Brockhaus, Lipsko
- Kützing F. T. 1836. *Algarum aquae dulcis germanicarum Decas XVI. Halis Saxonum* 1–25
- Lagerheim G. 1883. Bidrag till Sveriges algflora. *Öfversigt af Kongl Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar* 40(2): 37–78

- Lara Y., Lambion A., Menzel D., et al 2013. A cultivation-independent approach for the genetic and cyanotoxin characterization of colonial cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 69(2): 135–143
- Lederer F. & Lukavský J. 2003. Řasy Šumavy. In: Šumava, příroda, historie, život. Nakladatelství Baset, Praha, pp 185–190
- Lefort V., Longueville J.-E. & Gascuel O. 2017. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution* 34(9): 2422–2424
- Lemmermann E. J. 1900. Beiträge zur Kenntnis der Planktonalgen. III. Neue Schwebalgen aus der Umgegend von Berlin. *Berichte der deutsche botanischen Gesellschaft* 18: 24–32
- Lemmermann E. J. 1898. Beiträge zur Kenntniss der Planktonalgen. *Botanisches Zentralblatt; referierendes Organ für das Gesamtgebiet der Botanik* 76: 150–156
- Lepère C., Wilmotte A. & Meyer B. 2000. Molecular Diversity of *Microcystis* Strains (Cyanophyceae, Chroococcales) Based on 16S rDNA Sequences. *Systematics and Geography of Plants* 70(2): 275–283
- Ley S.-H. 1947. New Myxophyceae from Northern Kwangtung. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 1: 270–282
- Li X. C., Huo S., Zhang J., et al 2019. Metabarcoding reveals a more complex cyanobacterial community than morphological identification. *Ecological Indicators* 107(February): 105653
- Li X., Huo S. & Xi B. 2020. Updating the resolution for 16S rRNA OTUs clustering reveals the cryptic cyanobacterial genus and species. *Ecological Indicators* 117(April): 106695
- Licari G. R., Cloud P. E. & Smith W. D. 1969. A New Chroococcacean Alga From the Proterozoic of Queensland. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 62(1): 56–62
- Loza V., Berrendero E., Perona E. & Mateo P. 2013. Polyphasic characterization of benthic cyanobacterial diversity from biofilms of the Guadarrama river (Spain): morphological, molecular, and ecological approaches. *Journal of Phycology* 49(2): 282–297
- Mai T., Johansen J. R., Pietrasiak N., et al 2018. Revision of the Synechococcales (Cyanobacteria) through recognition of four families including Oculatellaceae fam.

- nov. and Trichocoleaceae fam. nov. and six new genera containing 14 species. *Phytotaxa* 365(1): 1–59
- Mareš J., Hrouzek P., Kaňa R., et al 2013. The Primitive Thylakoid-Less Cyanobacterium *Gloeobacter* Is a Common Rock-Dwelling Organism. *PLoS ONE* 8(6): e66323
- Mareš J., Johansen J. R., Hauer T., et al 2019a. Taxonomic resolution of the genus *Cyanothece* (Chroococcales, Cyanobacteria), with a treatment on *Gloeothece* and three new genera, *Crocospaera*, *Rippkaea*, and *Zehria*. *Journal of Phycology* 55(3): 578–610
- Mareš J., Lara Y., Dadáková I., et al 2015. Phylogenetic analysis of cultivation-resistant terrestrial cyanobacteria with massive sheaths (*Stigonema* spp. and *Petalonema alatum*, Nostocales, Cyanobacteria) using single-cell and filament sequencing of environmental samples. *Journal of Phycology* 51(2): 288–297
- Mareš J., Strunecký O., Bučinská L. & Wiedermannová J. 2019b. Evolutionary Patterns of Thylakoid Architecture in Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 10(FEB): 1–22
- Martin W. F., Garg S. & Zimorski V. 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1678): 20140330
- McGregor G. B. 2013. Freshwater Cyanobacteria of North-Eastern Australia: 2. Chroococcales. *Phytotaxa* 133(1): 1–130
- McGregor G. B., Fabbro L. D. & Lobegeiger J. S. 2007. Freshwater planktic Chroococcales (Cyanoprokaryota) from North-Eastern Australia: A morphological evaluation. *Nova Hedwigia* 84(3–4): 299–331
- Meyen F. J. F. 1839. *Neues System der Pflanzen-Physiologie*. Haude und Spenersche Buchhandlung, Berlin
- Meyen F. J. F. 1829. Beobachtungen über einige niedere algenformen. *Nova acta physico-medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosum* 2: 770–778
- Muciño-Márquez R. E., Echenique R. O., Gárate-Lizárraga I., et al 2021. Caracterización de la variación morfológica de *Cyanotetras* (Cyanobacteria) en el Lago de Catemaco Veracruz, México. *Polibotánica* 51: 43–53

- Mugnai M. A., Turicchia S., Margheri M. C., et al 2003. Characterization of the cyanobacterial biocoenosis of a freshwater reservoir in Italy. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 109(August 2003): 403–419
- Nägeli C. 1849. *Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet*, 1st edn. Friedrich Schulthess, Zürich
- Nowruzi B. & Soares F. 2021. *Alborzia kermanshahica* gen. nov., sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria), isolated from paddy fields in Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(6): 1–13
- Nübel 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
- Nübel U., Garcia-Pichel F. & Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 3327–3332
- Oren A. & Ventura S. 2017. The current status of cyanobacterial nomenclature under the “prokaryotic” and the “botanical” code. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 110(10): 1257–1269
- Ørstedt A. S. 1842. Beretning om en Excursion til Trindelen, en alluvialdannelse i Odensefjord. *Naturhistorisk Tidsskrift* 1(3): 552–569
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., et al 2014. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology* 49(4): 450–470
- Palińska K. A. & Krumbein W. E. 1995. Ecotype - Phenotype - Genotype An approach to the *Synechococcus* - *Synechocystis* - *Merismopedia* - *Eucapsis* complex. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 75: 213–227
- Palińska K. A. & Krumbein W. E. 1998. Patterns of growth in coccoid, aggregate forming cyanobacteria. *Annales Botanici Fennici* 35(3): 219–227
- Palińska K. A., Liesack W., Rhiel E. & Krumbein W. E. 1996. Phenotype variability of identical genotypes: The need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. *Archives of Microbiology* 166(4): 224–233



- Palińska K. A. & Surosz W. 2014. Taxonomy of cyanobacteria: A contribution to consensus approach. *Hydrobiologia* 740(1): 1–11
- Pecundo M. H., Cai F., Chang A. C. G., et al 2021. Polyphasic approach identifies two new species of *Desmonostoc* (Nostocales, Cyanobacteria) in the coralloid roots of *Cycas fairylakea* (Cycadales). *Phycologia* 60(6): 653–668
- Pentecost A. 2014. Distribution and ecology of cyanobacteria in the rocky littoral of an English Lake District Water Body, Devoke water. *Life* 4(4): 1026–1037
- Perkerson III R. B., Perkerson E. A. & Casamatta D. A. 2010. Phylogenetic examination of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Limnothrix* (Pseudanabaenaceae) using 16S rDNA gene sequence data. *Algological Studies* 134(July 2010): 1–16
- Pietrasiak N., Osorio-Santos K., Shalygin S., et al 2019. When Is A Lineage A Species? A Case Study In *Myxacorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) With The Description of Two New Species From The Americas. *Journal of Phycology* 55(5): 976–996
- Playfair G. I. 1918. New and rare freshwater algae. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 43: 497–543
- Pliński M. & Komárek J. 2017. *Cyanobacteria of the Gulf of Gdańsk and the Southern Baltic*, 1st edn. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk
- Pokorný J., Kaštovský J. & Štenclová L. 2022. *Microcrocis geminata* (Cyanobacteria) – new knowledge about the old friend. *Journal of Phycology*
- Rabenhorst L. 1865. *Flora Europea Algarum Aquae Dulcis et Submarinae.*, 1st edn. Apud Eduardum Kummerum, Lipsko
- Radwan A.-A. M., Tayel F. T., Morsy A. M. H., et al 2018. Monitoring of Water Pollution and Eutrophication using Phytoplankton as Bioindicator in Burullus Lake, Egypt. *Journal of Environmental Sciences Mansoura University* 47(1): 63–74
- Rahmatpour N., Hauser D. A., Nelson J. M., et al 2021. A novel thylakoid-less isolate fills a billion-year gap in the evolution of Cyanobacteria. *Current Biology* 31(13): 2857–2867

- Rajaniemi-Wacklin P., Rantala A., Mugnai M. A., et al 2006. Correspondence between phylogeny and morphology of *Snowella* spp. and *Woronichinia naegeliana*, cyanobacteria commonly occurring in lakes. *Journal of Phycology* 42(1): 226–232
- Ratray J. 1888. A revision of the genus *Aulacodiscus* Ehrb. *Journal of the Royal Microscopical Society* 8(3): 337–382
- Richter P. 1895. Neue Algen der Phykotheka universalis, Fasc. XIII. *Hedwigia* 34: 22–26
- Rippka R. & Cohen-Bazire G. 1983. The Cyanobacteriales: A legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* 134(1): 21–36
- Rippka R., Deruelles J. & Waterbury J. B. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111(1): 1–61
- Robertson Bronwyn. R., Tezuka Naoaki. & Watanabe Makoto. M. 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(3): 861–871
- Rodrigue S., Malmstrom R. R., Berlin A. M., et al 2009. Whole genome amplification and de novo assembly of single bacterial cells. *PLoS ONE* 4(9): 1–10
- Rojó C. & Alvarez Cobales M. 1992. Taxonomy and Ecology of Phytoplankton in a Hypertrophic Gravel-Pit Lake. I. Blue-Green Algae. *Archiv für Protistenkunde* 142(1–2): 77–90
- Roldán M., Ramírez M., del Campo J., et al 2013. *Chalicogloea cavernicola* gen. nov., sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria), from low-light aerophytic environments: combined molecular, phenotypic and ecological criteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2326–2333
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., et al 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539–542
- Ruse M. 1969. Definitions of Species in Biology. *The British Journal for the Philosophy of Science* 20(2): 97–119

- Salazar V. W., Tschoeke D. A., Swings J., et al 2020. A new genomic taxonomy system for the *Synechococcus* collective. *Environmental Microbiology* 22(11): 4557–4570
- Sato S., Shimoda Y., Muraki A., et al 2007. A Large-scale Protein–protein Interaction Analysis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Research* 14(5): 207–216
- Schiller J. 1956. Die Mikroflora der Roten Tümpel auf den koralleninseln Los Aves in karibischen Meer. *Ergebnisse der Deutschen Limnologische Venezuela-Expeditionen* 1: 197–216
- Sciuto K., Andreoli C., Rascio N., et al 2012. Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics* 28(4): 357–374
- Shen L., Ma S., Cai F., et al 2018. Polyphasic examination on *Merismopedia tenuissima* CHAB 7021 from Ganjiang River, China revealed the polyphyly of the genus *Merismopedia* (Cyanobacteria). *Journal of Oceanology and Limnology* 36(4): 1157–1165
- Silva P. 2022. Index Nominum Algarum, University Herbarium, University of California. In: University Herbarium. <http://ucjeps.berkeley.edu/INA.html> (čteno 31. 3. 2022)
- Silva S. M. F. & Pienaar R. N. 1999. Marine cyanophytes from the Western Cape, South Africa: Chroococcales. *South African Journal of Botany* 65(1): 32–49
- Skácelová O. & Zapomělová E. 2010. Remarks on the occurrence and ecology of several interesting cyanobacterial morphospecies found in South Moravian wetlands. *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* 95(1): 201–221
- Skuja H. 1956. Taxonomische und biologische Studien über das Phytoplankton schwedischer Binnengewässer. *Nova Acta Reg Soc Sci Upsalensis (Ser 4)* 16: 1–404
- Skuja H. 1926. Vorarbeiten zu einer Algenflora von Lettland. II. *Acta Horti Botanici Universitatis Latviensis* 1: 23–52
- Smith G. M. 1920. Phytoplankton of the Inland Lakes of Wisconsin. Part I: Myxophyceae, Phaeophyceae, Heterokontaeae, and Chlorophyceae exclusive of the Desmidiaceae. *Bulletin of the Wisconsin Geological and Natural History Survey* 57: 1–243
- Soares F., Tiago I., Trovao J., et al 2019. Description of *Myxacorys almedinensis* sp. nov. (Synechococcales, Cyanobacteria) isolated from the limestone walls of the Old

- Cathedral of Coimbra, Portugal (UNESCO World Heritage Site). *Phytotaxa* 419(1): 77–90
- Somashekar R. K. ; R. S. N. 1983. On the factors influencing the *Merismopedia punctata* bloom. *Comparative physiology and ecology* 8(4): 343–345
- Spits C., Caignec C. le, Rycke M. de, et al 2006. Optimization and Evaluation of Single-Cell Whole-Genome Multiple Displacement Amplification. *Human Mutation* 27(5): 496–503
- Spurr A. R. 1969. A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 29: 31–43
- Stackebrandt E. & Goebel B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(4): 846–849
- Stanier R. Y. 1977. The Position of Cyanobacteria in the World of Phototrophs. *Carlsberg Research Communications* 42: 77–98
- Štenclová L., Fučíková K., Kaštovský J. & Pažoutová M. 2017. Molecular and morphological delimitation and generic classification of the family Oocystaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 53(6): 1263–1282
- Tamura K., Stecher G. & Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022–3027
- Taton A., Grubisic S., Brambilla E., et al 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): A morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5157–5169
- Tavera R. & Komárek J. 1996. Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica Puebla State, Mexico. *Alphological studies* 83: 511–538
- Thomazeau S., Houdan-Fourmont A., Couté A., et al 2010. The contribution of sub-saharan african strains to the phylogeny of Cyanobacteria: Focusing on the Nostocaceae (Nostocales, Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 46(3): 564–579
- Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673–4680
- Thompson R. H. 1939. A preliminary survey of the fresh-water algae of eastern Kansas. *Kansas University Science Bulletin* 25(1): 5–83
- Tian Y.-Q., Yu C.-C., Wang L. & Huang B.-Q. 2012. Dynamic changes of phytoplankton's community structure in Beixi of Jiulongjiang River, Fujian Province of East China and related affecting factors. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 23(9): 2559–2565
- Tiffany L. H. 1934. The plankton algae of the west end of Lake Erie. *Contribution The Ohio State University The Franz Theodore Stone Laboratory* 6: 1–112
- Trevisan V. B. A. 1845. *Nomenclator algarum, ou collection des noms imposées aux plantes de la famille des algues*, 1st edn. Imprimerie du Seminaire, Padova
- Troitzkaja O. V. 1922. De novi genere Chroococcacearum. *Botaniceskie Materialy Instituta Sporovyh Rastenij Glavnogo Botaniceskogo Sada RSFSR Notulae Systematicae ex Instituto Cryptogamico Horti Botanici Petropolitani Reipublicae Rossicae* 1: 129–131
- Tuji A., Yamaguchi H., Kataoka T., et al 2021. *Annamia dubia* sp. nov. with a description of a new family, Geminocystaceae fam. nov. (Cyanobacteria). *Fottea* 21(1): 100–109
- Van De Meene A. M. L., Hohmann-Marriott M. F., Vermaas W. F. J. & Roberson R. W. 2006. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of Microbiology* 184(5): 259–270
- Vázquez-Martínez J., Gutierrez-Villagomez J. M., Fonseca-García C., et al 2018. *Nodosilinea chupicuarensis* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Synechococcales) a subaerial cyanobacterium isolated from a stone monument in central Mexico. *Phytotaxa* 334(2): 167
- Wang Y., Jia N., Geng R., et al 2021. Phylogenetic insights into *Chroococcus*-like taxa (Chroococcales, Cyanobacteria), describing *Cryptochroococcus tibeticus* gen. nov. sp. nov. and *Limnococcus fonticola* sp. nov. from Qinghai-Tibet plateau. *Journal of Phycology* 57(6): 1739–1748
- Werner V. R. & Sant'Anna C. L. 2006. Occurrence of the rare genus *Microcrocis* P. Richter (Chroococcales, Cyanobacteria) in a coastal lagoon from southern Brazil. *Revista Brasileira de Botanica* 29(1): 183–186

- Whitton B. A. & Potts M. 2002. *The Ecology of Cyanobacteria*, 1st edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Wilmotte A., Démonceau C., Goffart A., et al 2002. Molecular and pigment studies of the picophytoplankton in a region of the Southern Ocean (42-54°S, 141-144°E) in March 1998. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 49(16): 3351–3363
- Wilmotte A., van der Auwera G. & de Wachter R. 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters* 317(1–2): 96–100
- Wittrock V. B. & Nordstedt O. 1878. Algae aquae dulcis exsiccatae praecipue Scandinavicae quas adjectis algis marinis chlorophyllaceis et phycochromaceis distribuerunt. *Botaniska Notiser* 1878: 67–73
- Wu L., Sun Q., Desmeth P., et al 2017. World data centre for microorganisms: An information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. *Nucleic Acids Research* 45: 611–618
- Xie C.-H. & Yokota A. 2003. Phylogenetic analyses of *Lamproedia* hyalina based on the 16S rRNA gene sequence. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49: 345–379
- Yarovyi S. O., Arabadhi L. I., Solonenko A. M., et al 2017. Diversity of Cyanoprokaryota in sandy habitats in Pryazov National Natural Park (Ukraine). *Ukrainian Journal of Ecology* 7(2): 91–95
- Yu G., Zhu M., Chen Y., et al 2015. Polyphasic characterization of four species of *Pseudanabaena* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from China and insights into polyphyletic divergence within the *Pseudanabaena* genus. *Phytotaxa* 192(1): 1–12
- Zang X., Liu B., Liu S., et al 2007. Optimum Conditions for Transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Microbiology* 45(3): 241–245
- Zapomělová E., Hisem D., Řeháková K., et al 2008. Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis/A. crassa* complex (cyanobacteria). *Journal of Plankton Research* 30(11): 1257–1269

Zapomělová E., Řeháková K., Znachor P. & Komárková J. 2007. Morphological diversity of coiled planktonic types of the genus *Anabaena* (cyanobacteria) in natural populations – taxonomic consequences. *Cryptogamie Algologie* 8(4): 353–371

Zhang M., Kong F., Tan X., et al 2007. Biochemical, morphological, and genetic variations in *Microcystis aeruginosa* due to colony disaggregation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(5): 663–670

## 8 Přílohy

Seznam příloh k dokumentu:

### **Barevné tabule s fotodokumentací taxonů použitých v analýze**

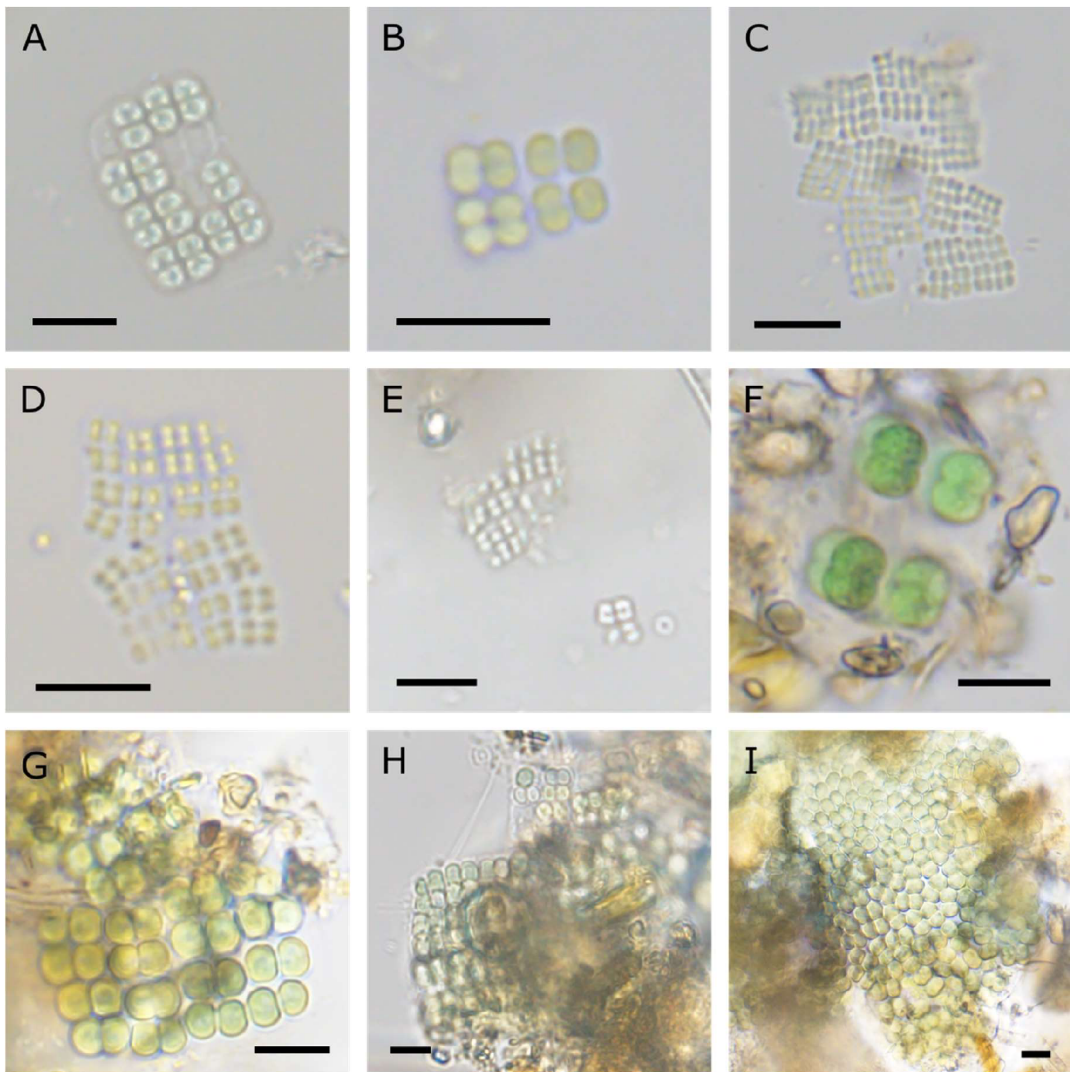
- Obr. 8** Taxony izolované a použité ve fylogenetické analýze
- Obr. 9** *Microcrocis geminata*
- Obr. 10** Kmeny v kultuře použité v analýze – optická mikroskopie
- Obr. 11** Kmeny v kultuře použité v analýze – TEM
- Obr. 12** Variabilita druhu *Merismopedia tenuissima*
- Obr. 13** Porovnání morfologie izolátů v linii 4

Seznam přiložených souborů:

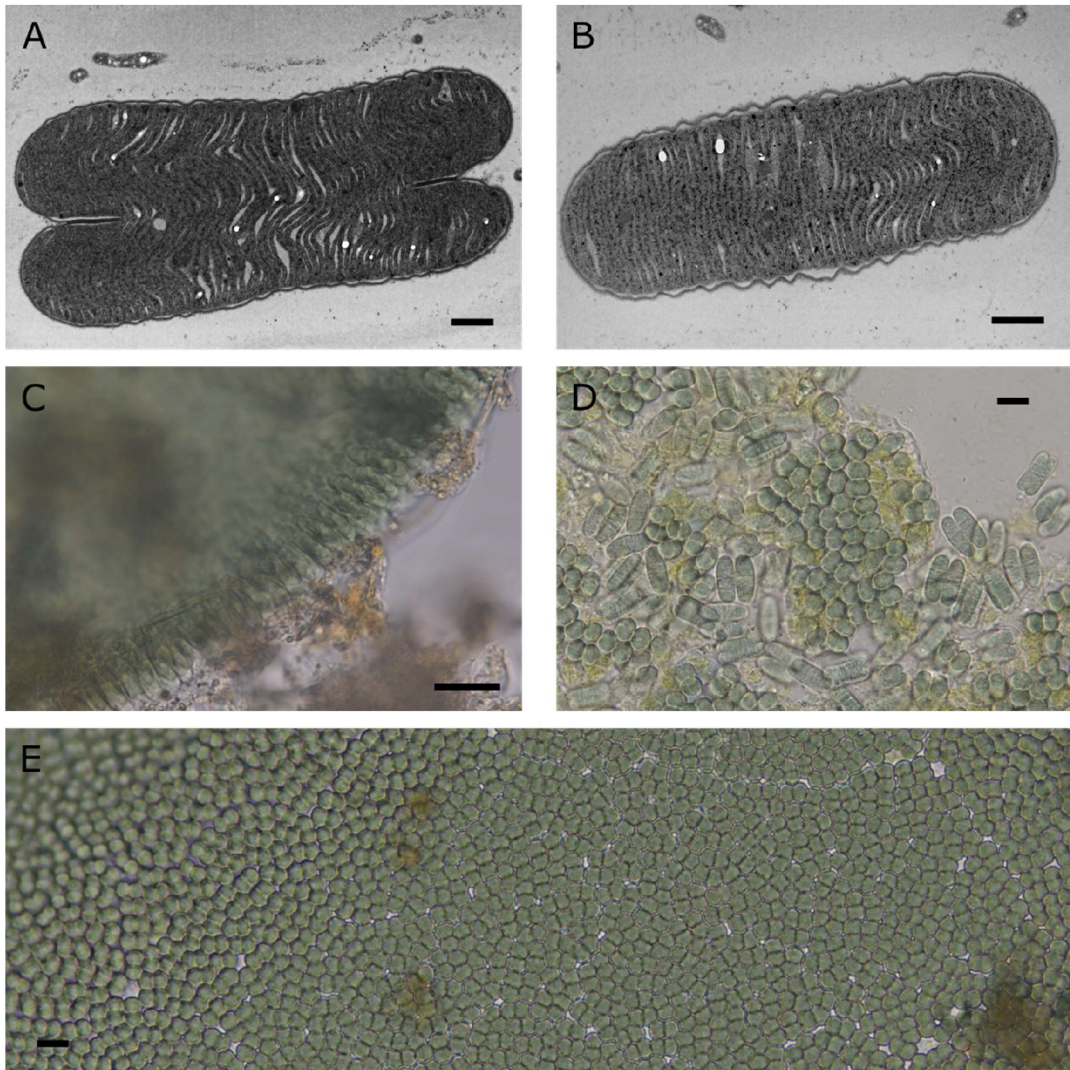
**Alignment použitý pro fylogenetickou analýzu ve formátu fasta**

**Fylogenetický strom ve formátu pdf**

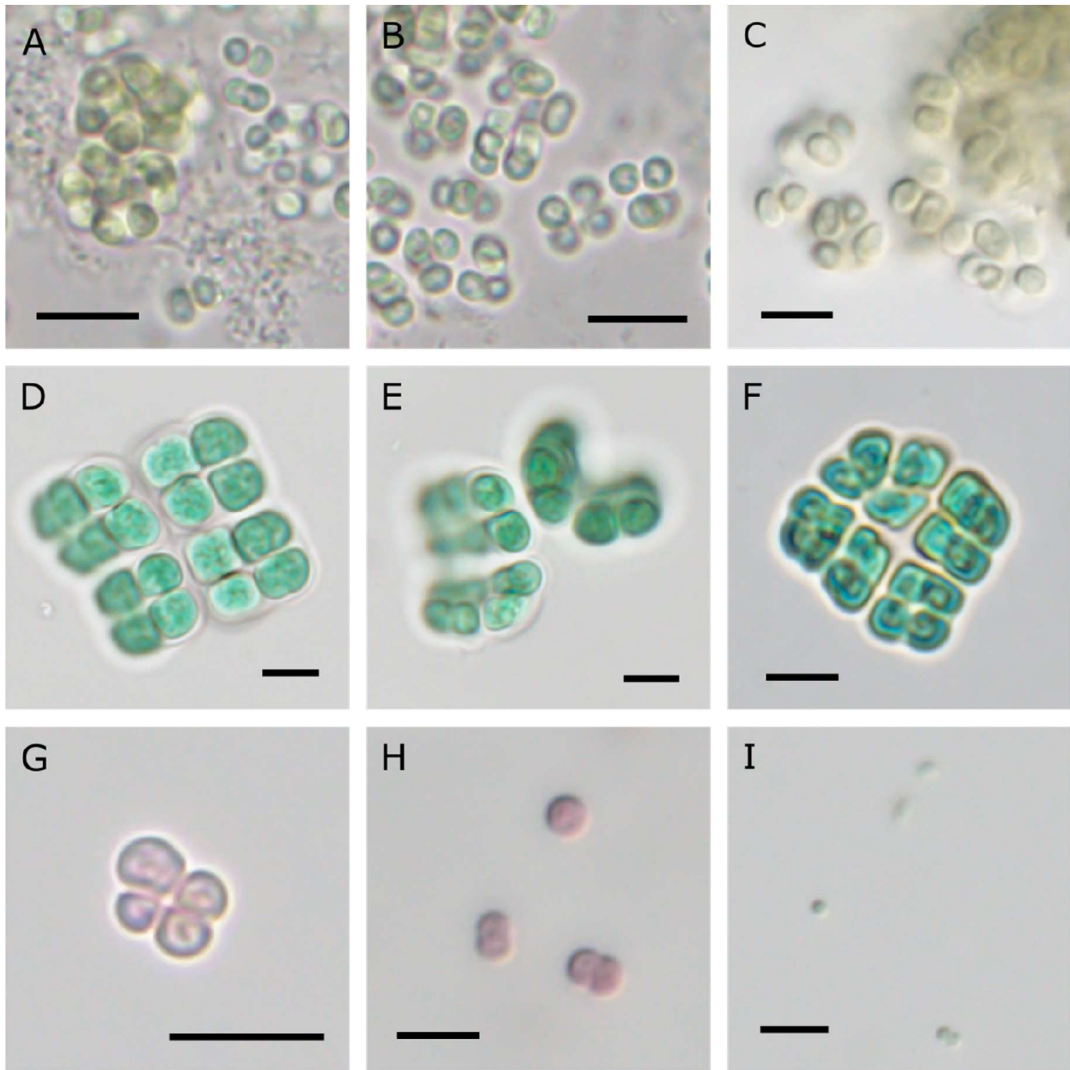




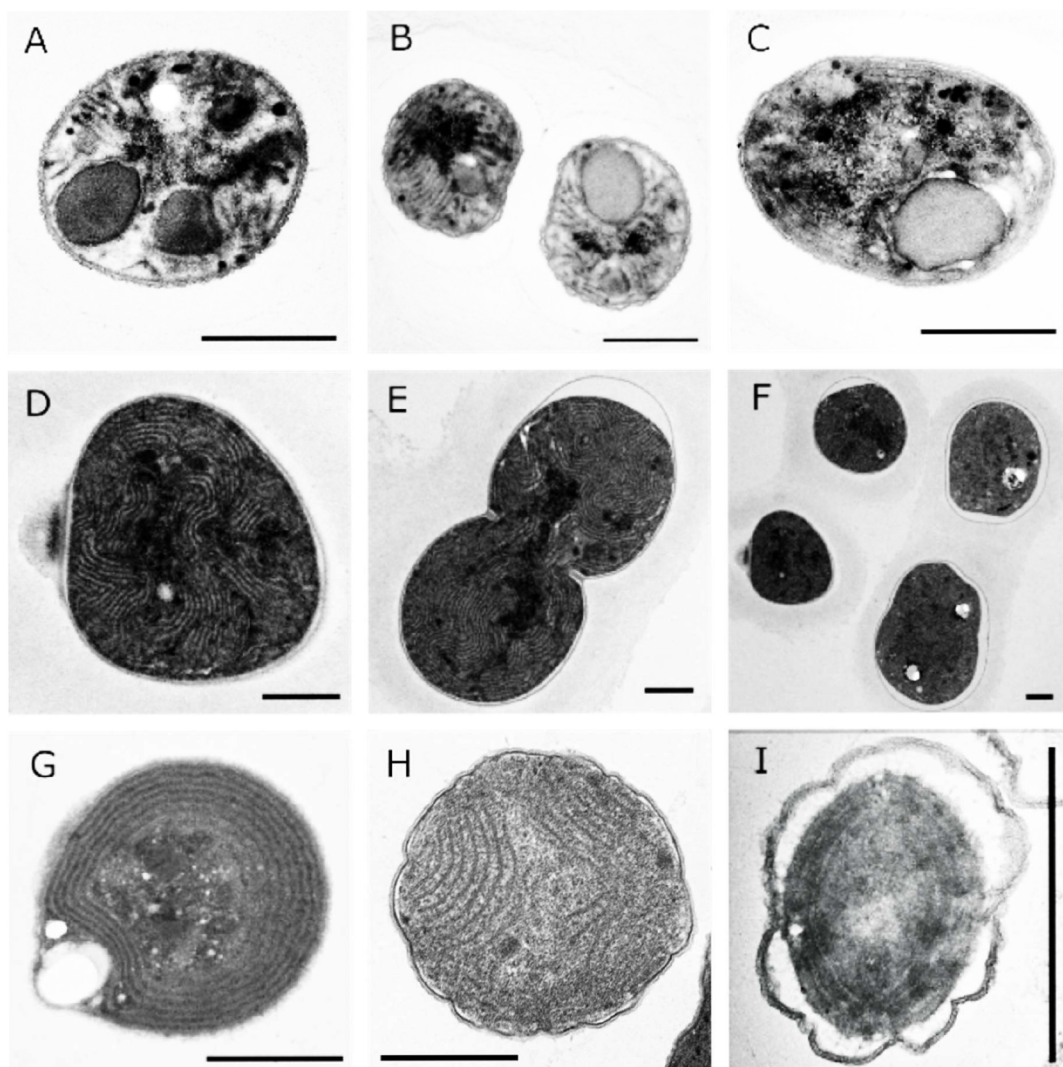
**Obr. 8.** Taxony izolované a použité ve fylogenetické analýze. A – *Merismopedia* cf. *punctata/hyalina*, Bažantula; B – *Merismopedia hyalina*, Zběhov; C – *Merismopedia tenuissima*, rybník Velký pode Vší; D – *Merismopedia tenuissima*, rybník Potěšil; E – *Merismopedia tenuissima*, Zběhov; F – *Eucapsis pseudalpina*, Uhlišťský rybník; G – *Merismopedia glauca*, Velký Klikov; H – *Merismopedia glauca*, Malý Klikov; I – *Microcrocis geminata*, rybník u Stropnice; Měřítka 10  $\mu$ m.



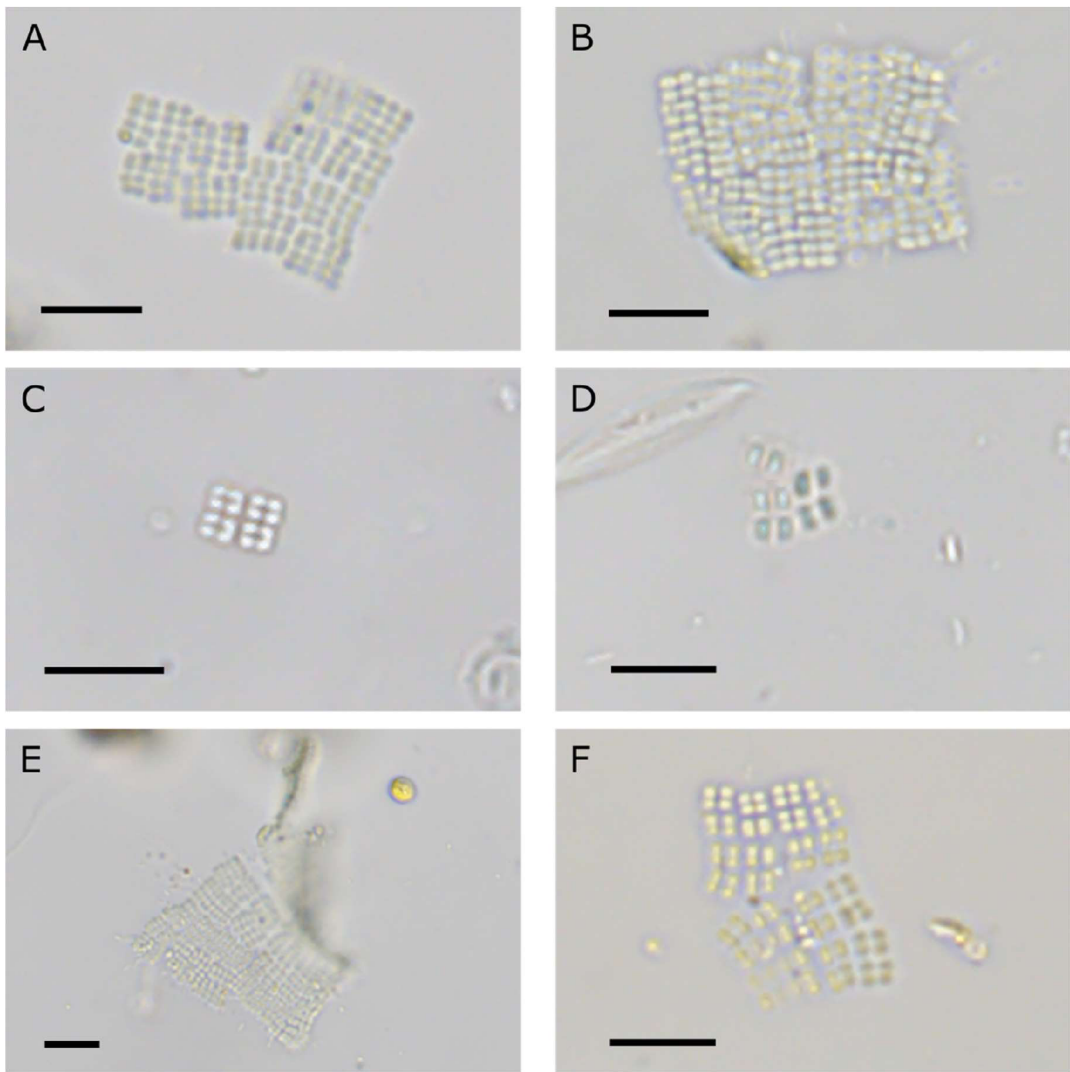
**Obr. 9.** *Microcrocis geminata*. A, B – jednotlivé buňky s paralelními tylakoidy v TEM; C – kolonie v kolmém průřezu; D – mechanicky rozvolněná kolonie; E – kolonie v podélném průřezu; Měřítka A-B 1  $\mu\text{m}$ , C-E 10  $\mu\text{m}$ . (Autor: Jan Kaštovský)



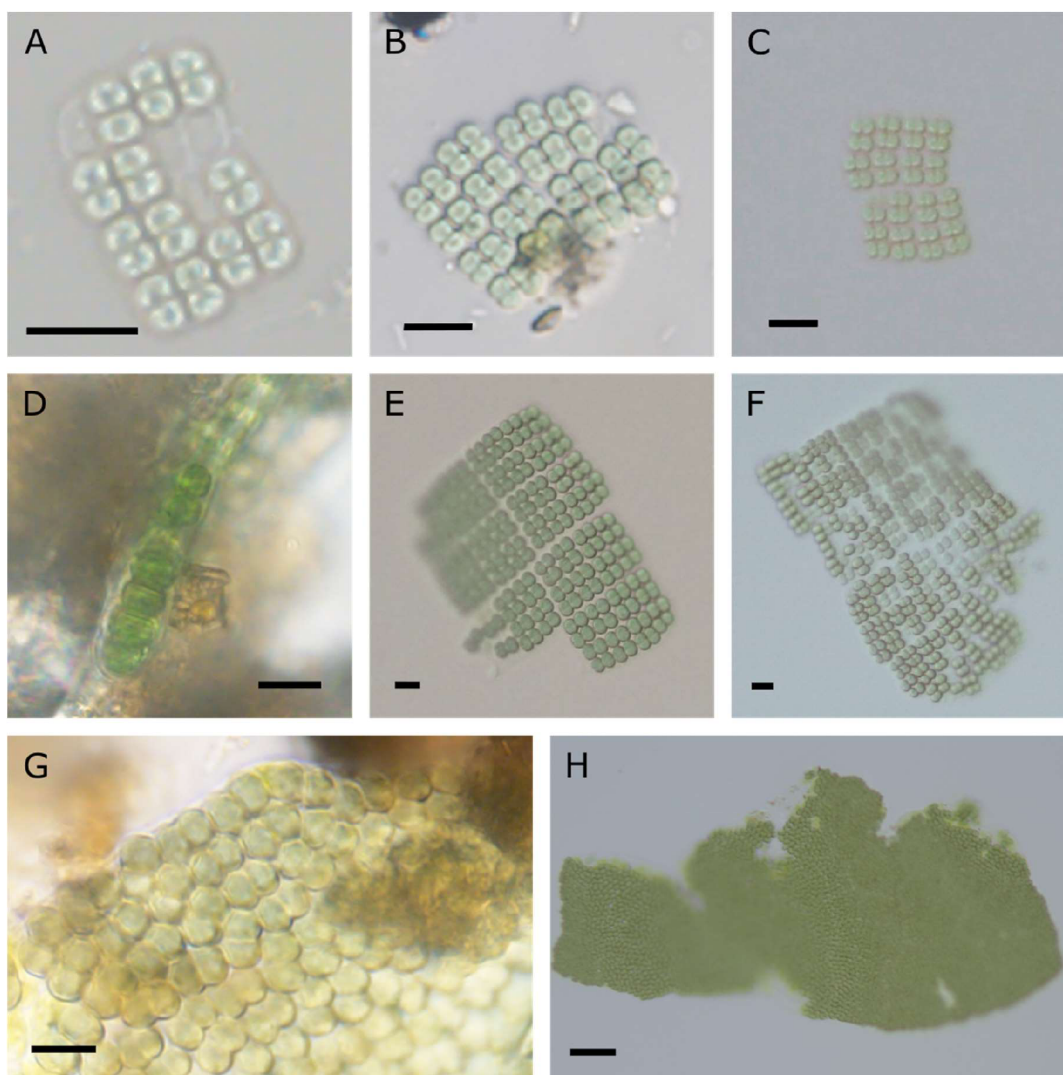
**Obr. 10.** Kmeny v kultuře použité v analýze – optická mikroskopie. A, B, C – *Eucapsis* sp. CCALA 889; D, E, F – *Merismopedia angularis* NIVA-CYA 199; G, H – *Merismopedia punctata* NIVA-CYA 16; I – *Merismopedia tenuissima* NIES-230; Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 11.** Kmeny v kultuře použité v analýze – TEM. A, B, C – *Eucapsis* sp. CCALA 889; D, E, F – *Merismopedia angularis* NIVA-CYA 199; G, H – *Merismopedia punctata* NIVA-CYA 16; I – *Merismopedia tenuissima* NIES-230; Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 12.** Variabilita druhu *Merismopedia tenuissima*; A, B – rybník Velký pode Vší; C, D – Zběhov; E, F – rybník Potěšil; Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 13.** Porovnání morfologie izolátů v linii 4; A, B – *Merismopedia* cf. *punctata hyalina* v environmentálním vzorku; C – *Merismopedia* cf. *punctata hyalina* izolát 18, D – kolonie *Merismopedia glauca* z bočního pohledu; E – *Merismopedia glauca* izolát 8, Velký Klikov; F – *Merismopedia glauca* izolát 8, Malý klikov; G – detail nepravidelně uspořádaných buněk v kolonii *Microcrocis geminata*; *Microcrocis geminata* izolát 16; Měřítko A-G 10  $\mu\text{m}$ , H 50  $\mu\text{m}$ .