Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie

Soňa Lukešová

Využití environmentálního sekvenování pro studium diverzity eukaryot
The use of environmental sequencing in the studies on eukaryotic diversity

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Praha, 2014

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval při tvorbě této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a motivaci, kterou mi po celou dobu psaní práce dodávala.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.5.2014

Podpis

Abstrakt

Bakalářská práce se zaměřuje na metodu environmentálního sekvenování a její využití při zkoumání diverzity eukaryotických mikrobů. Popisuje samotnou metodu, její mechanismus, možnosti použití i problémy s ní spojené. V práci je popsán současný pohled na fylogenetiku hlavních eukaryotických linií. Není opomenuta ani bližší charakteristika těchto linií. Pozornost je věnována zejména nově objeveným skupinám. Práce řeší příbuzenské vztahy uvnitř těchto skupin, shrnuje poznatky o jejich ekologii, potravních zdrojích a morfologii. Samostatná kapitola je věnována výskytu protistních skupin v extrémních podmínkách prostředí.

Klíčová slova: Diverzita eukaryot, environmentální DNA, sekvenace, rRNA, fylogenetika.

Abstract

The bachelor's thesis focuses on environmental sequencing method and its usage in examining the diversity of microbial eukaryotic organisms. It describes the method, its mechanism, application and the problems associated with it. The work describes the current view of the phylogeny of the major eukaryotic lineages with their closer characteristics. Particular attention is paid to newly discovered groups. The work addresses the relationships inside these groups, summarizes findings of their ecology, food resources, and morphology. A separate chapter is devoted to the occurrence of the protist groups in extreme environmental conditions.

Key words: Diversity of eukaryotes, environmental DNA, sequencing, rRNA, phylogenetics.

Obsah

Abstrakt ... 3

Abstract ... 3

Seznam použitých zkratek ... 6

1. Úvod ... 7

2. Environmentální sekvenování ... 8

2.1. Metodika ... 8

2.2. Nedostatky metody ... 9

2.3. Použití metody ... 10

3. Alveolata ... 11

3.1. Syndiniales a MALV ... 12

3.2. ARLs ... 13

3.3. Ostatní alveolátní skupiny ... 14

4. Stramenopiles ... 14

4.1. MAST ... 14

4.2. Pelagophyta ... 18

4.3. Ostatní Stramenopiles ... 18

5. Rhizaria ... 19

5.1. Foraminifera ... 19

5.2. Radiolaria ... 20

5.3. Cercozoa ... 20

6. Hacrobia / CCTH ... 21

7. Picobiliphyta ... 22

8. Chlorophyta ... 24

8.1. Prasinophyta ... 25

9. Exkavata ... 27

9.1. Diplonemea (Diplonemida) ... 27

10. Opisthokonta ... 28

11. Extrémní prostředí obývaná eukaryoty ... 28

11.1. Hypersalinní a kyselé podmínky 29
11.2. Anoxické prostředí 29
11.3. Hydrotermální vývěry....29
11.4. Plášťová dutina a tkáň hlubokomořských mlžů....30
12. Závěr....32
Seznam použité literatury....33

Seznam použitých zkratek

16S rRNA	Ribozomální RNA prokaryotní velikosti, součást malé podjednotky ribozomu
18S rRNA	Ribozomální RNA eukaryotní velikosti, součást malé podjednotky ribozomu
18S rDNA	Gen pro 18S rRNA
ARLs	Apicomplexům příbuzné linie
CCTH	Cryptophyta, Centroheliozoa, Telonemia, Haptophyta
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSPD	Hlubokomořská pelagická Diplonemida
ENFOR	Environmentální Foraminifera
FISH	Fluorescenční *in situ* hybridizace
FRESHIP	Sladkovodní Ichthyosporea
ITS	Interní přepisovaná oblast
MAIP	Mořská Ichthyosporea
MALV	Mořská Alveolata
MAOP	Mořská Opisthokonta
MAST	Mořské Stramenopiles
NA	Nová Alveolata
NC	Nová Cercozoa
PAS	Phaeodarian asociované sekvence
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RAD	Radiolární klad
RAS	Radiolaria asociované sekvence
rDNA	Ribozomální deoxyribonukleová kyselina
RHIZ	Rhizaria asociované sekvence
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SAR	Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria
UMA	Nekultivovatelná mořská Alveolata

1. Úvod

Život existuje na Zemi již několik miliard let. Za tuto dobu se vyvinulo obrovské množství organismů rozmanitých tvarů a velikostí, pestrých barev a nejrůznějších životních strategií. Celková diverzita je nicméně tak obrovská, že nebyla dosud kompletně prozkoumána. Mnohé je známo o makroskopických organismech. U mikroorganismů je situace o něco obtížnější. Problémy s posouzením jejich celkové rozmanitosti jsou způsobeny především jejich malou velikostí, absencí morfologických znaků, podle kterých by mohly být tříděny do skupin, a naší neschopností některé organismy kultivovat (Thornhill et al., 2007). Molekulární metody však tyto problémy obcházejí a umožňují nám studovat diverzitu organismů z jiného pohledu.

Environmentální sekvenování je metoda založená na získávání sekvencí DNA přímo z prostředí. Tím se vyhýbá nutnosti nejprve izolovat buňky samotné. Metoda se nejprve zaměřovala hlavně na prokaryota, ale dnes se využívá také při studiu diverzity eukaryotických organismů. Environmentální sekvenování přitom odhalilo velké množství nových informací. Řada z nich ovlivnila naše představy o fylogenezi organismů, změnila pohled na jednotlivé skupiny a malým krůčkem přiblížila člověka k poznání skutečné přírodní rozmanitosti.

Cíle této práce jsou: Popsat metodu environmentálního sekvenování a její využití při zkoumání diverzity eukaryotických organismů. Objasnit problémy, se kterými se metoda potýká. Shrnout současné poznatky o jednotlivých environmentálních skupinách, přiblížit pohled na jejich fylogenetické postavení a popsat jejich ekologii případně další charakteristické znaky.

2. Environmentální sekvenování

Environmentální sekvenování neboli sekvenování vzorků DNA izolovaných přímo z prostředí je důležitým nástrojem při hodnocení diverzity mikroorganismů. Dříve bylo možné pro sestavování fylogenetických stromů použít pouze sekvence získané z kultivovaných zástupců. To s sebou však neslo určitá omezení. Organismy, které nebyly schopny růst ve známých živných médiích, nemohly být pěstovány a zařazeny do fylogenetických analýz. Metoda environmentálního sekvenování nicméně umožňuje sekvenovat geny přímo ze vzorků z prostředí, a proto není potřeba hledat vhodné kultivační médium. Vznikají tak sice bohatší fylogenetické stromy, pod názvy sekvencí si však obvykle nedokážeme představit, jak daný organismus vypadá. Také není jisté, jestli jednotlivé sekvence pocházejí ze stejného organismu nebo mají různý původ. Pomocí environmentálního sekvenování tedy nemůžeme odhadnout přesný počet druhů, umožňuje nám nicméně jiný pohled na diverzitu organismů.

2.1. Metodika

Nejběžnější postup environmentálního sekvenování je následující. Ze vzorků získaných z prostředí se nejprve izoluje veškerá DNA. Během PCR je z této DNA pomocí specifických primerů amplifikován určitý gen, který je následně sekvenován. Jednotlivé sekvence jsou poté porovnávány se známými organismy. Podle Stoecka a Epsteina (2003a) můžeme získané sekvence rozdělit do tří hlavních kategorií. První jsou velmi podobné (z 95-100%) k dosud popsaným organismům a pochází zřejmě ze známých druhů. Druhou kategorii tvoří sekvence, které nejsou blízce příbuzné k žádným známým zástupcům, ale větví se v dobře zavedených kladech. Členové třetí skupiny nepodobné ani žádnému ustanovenému kladu tvoří úplně nové linie.

Nejvíce využívaným a sekvenovaným genem je malá podjednotka ribozomů, 18S rRNA. Výhodou je především přítomnost u všech eukaryot a pomalé evoluční tempo (převzato Vaulot et al., 2008). Až do nedávné doby byla za velkou výhodu také považována skutečnost, že nebyl znám žádný laterální přenos tohoto genu (převzato Vaulot et al., 2008). Yabuki et al. (2014) však ve své studii objevili případ laterálního přenosu 18S rRNA mezi třídou Perkisea a stramenopilním rodem *Ciliophrys* a u bakterií je známo dokonce více případů laterálního přenosu genů (Kitahara a Miyazaki, 2013). Ačkoliv laterální genový přenos mezi organismy může zmást naše porozumění skutečné eukaryotní rozmanitosti, podle Yabukiho et al. (2014) jsou 18S rRNA průzkumy v odhadování diverzity stále efektivní. Měli bychom si však být vědomi, že získané environmentální rRNA sekvence nemusí vždy nutně znamenat existenci organismu, který tuto sekvenci nese. Kromě 18S rRNA se v environmentálním sekvenování také často používají interní přepisované oblasti ITS1 a ITS2, úseky nefunkční RNA vmezeřené mezi ribozomální geny, nebo plastidové geny, například 16S rRNA či *psbA* nacházející se v cyanobakteriích a plastidovém genomu řas a vyšších rostlin.

Využití kultivačně nezávislých metod poskytuje nový pohled na celkovou diverzitu organismů bez potřeby kultivace a morfologické identifikace konkrétních zástupců. Odhaluje jejich biogeografickou

distribuci, fylogenetické postavení a příbuznost ke známým druhům. Díky těmto sekvencím můžeme sestavit rozsáhlejší fylogenetické stromy. Navíc ve spojení s dalšími metodami, jako je mikroskopické pozorování, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), průtoková cytometrie či analýza fotosyntetických pigmentů, jsme schopni odkrýt další informace o jednotlivých skupinách organismů, poznat jejich morfologii či zdroje potravy.

2.2. Nedostatky metody

Využití kultivačně nezávislých metod má několik nedostatků. Mezi ně patří zejména chyby při PCR, zacílení primerů, produkce chimérických sekvencí či přítomnost pseudogenů nebo mimobuněčné DNA. Problémem ztěžujícím použití environmentálního sekvenování je také odlišný počet kopií genů u různých organismů a kontaminace vzorků.

Během PCR může vniknout směs produktů neodpovídající svým zastoupením studovaným vzorkům. Některé organismy jsou totiž lépe amplifikovatelné a převládají nad ostatními (převzato Vaulot et al., 2008; Potvin a Lovejoy, 2009). Může tak docházet ke zkreslování výsledků. Nadějným řešením tohoto problému je metagenomika. Metoda je založena na klonování a sekvenování DNA přímo z prostředí bez potřeby PCR kroku. Porovnání těchto dvou přístupů, metagenomiky a metody založené na PCR, v jedné analýze překvapivě vedlo ke srovnatelným výsledkům (Not et al., 2009). K potvrzení podobného účinku obou metod by bylo nicméně zapotřebí jejich srovnání v další studii. Důležitý je také typ primerů používaných během PCR. Bylo dokázáno, že s různými primery se ve vzorcích objevují jiné skupiny (Shi et al., 2011). Řešením může být kombinace většího množství univerzálních a specificky zacílených primerů spolu s různými PCR podmínkami.

Mezi studovaným souborem se mohou objevit také chimérické sekvence či pseudogeny. Chimérické sekvence vznikají mimo jiné během PCR amplifikace. Při množení více podobných sekvencí se může stát, že polymeráza v průběhu polymerace změní templát na jiný. Vzniká tak molekula složená ze dvou nepříbuzných sekvencí. Pseudogeny jsou, na rozdíl od předchozího příkladu, sekvence, které se podobají některému genu, ale neprodukují funkční proteiny. Vznikly z původních funkčních genů v důsledku hromadění mutací. Pomocí analýzy sekundární struktury a testování PCR je možné tyto artefakty najít a sekvence vyřadit z analýzy (Thornhill et al., 2007).

Při analýze pikoeukaryot se pro hrubé oddělení organismů podle velikosti používají filtry s určitou velikostí pórů. Skrze tyto filtry však může mimo jiné projít i DNA pocházející z větších organismů. Jedná se zejména o části poškozených buněk či mimobuněčnou DNA (Not et al., 2009). Její odstranění není jednoduché a je nutné s ní počítat.

Dalším problémem, s kterým se metoda špatně vypořádává, je odlišný počet kopií genů u různých organismů. Příspěvek určitého taxonu k celkové diverzitě je závislý na počtu rDNA kopií v jeho buňkách (Countway et al., 2007; Not et al., 2009; Potvin a Lovejoy, 2009). Počet kopií obecně souhlasí s velikostí genomu a buňky. V případě malých organismů to však zřejmě může být také odrazem jejich životní strategie (Not et al., 2009). Takové sekvence jsou potom ve směsi produktů častější. Nemusí to ale

odpovídat jejich skutečnému výskytu ve studovaném vzorku. Méně kopií genů mají například drobné pikoplanktonní rody *Pelagomonas*, *Micromonas* a *Ostreoccocus* (Massana et al., 2008). Naopak více kopií genů se nachází hlavně u protist s většími buňkami, jako jsou Ciliophora a Dinoflagellata (Potvin a Lovejoy, 2009).

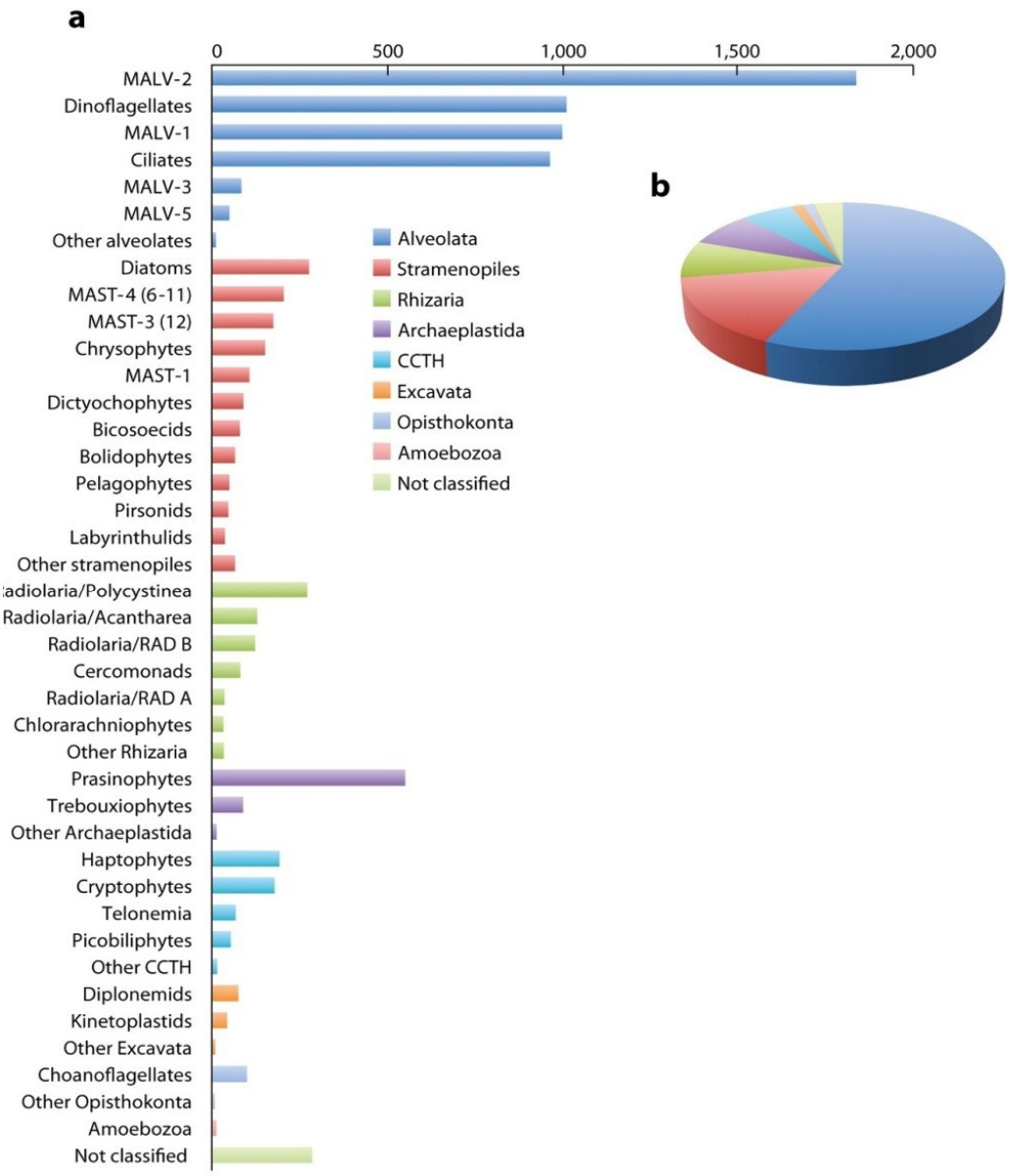
Velkým problémem je také kontaminace vzorků. Při studování environmentálních sekvencí ze sedimentů a velkých hloubek se ve směsi produktů často objevují sekvence pocházející z autotrofních či aerobních organismů. Ty jsou s největší pravděpodobností důsledkem klesání organismů či jejich odumřelých částí z vyšších vrstev (Alexander et al., 2009), samotní jedinci zde ale nepřežívají.

Ačkoliv je velké množství chyb během postupu odhaleno a účinně odstraněno, je nezbytné brát na všechny tyto okolnosti ohled při interpretování výsledků.

2.3. Použití metody

Metoda environmentální sekvenování byla nejdříve zaměřena především na bakteriální společenstva. V posledních letech se však využívá i při zkoumání eukaryot. Odhaduje se, že množství popsaných zástupců je méně než 1 % z celkového počtu protist (Stoeck a Epstein, 2003a). Skutečná diverzita eukaryot musí být tedy opravdu obrovská.

Kultivačně nezávislé metody jsou aplikovány na vzorky získané z rozmanitých prostředí ze všech koutů světa. Nejvíce studií se zaměřuje na moře a oceány v celé jejich šířce i hloubce. Menší mírou přispívají analýzy řek, jezer a půd. Zahrnutí rozsáhlé škály habitatů je nezbytné při zkoumání drobných organismů. Čím více lokalit bude prozkoumáno, tím ucelenější obraz celkové rozmanitosti druhů získáme. Sekvence převažující ve vzorcích pocházejí hlavně z členů skupin Alveolata a Stramenopiles, následované rhizarii a archaeplastidy (obr. 1). V následujících kapitolách si postupně probereme studie zaměřené na různé eukaryotické skupiny.



Obr. 1: Zastoupení eukaryotických skupin v environmentálních studiích, vyjádřeno sloupcovým (a) a koláčovým (b) grafem. Převzato a upraveno z Massana (2011).

3. Alveolata

Spolu se stramenopily a rhizarii vytváří Alveolata dobře podpořené uskupení SAR (Burki et al., 2012). Skupina Alveolata sdružuje organismy se specifickým morfologickým znakem, kterým je přítomnost podpovrchových vakuol, tzv. kortikálních alveol. Najdeme tu zástupce živící se výhradně autotrofně, aktivní predátory či obligátní parazity. Zahrnuje tři hlavní kmeny: Dinoflagellata, Ciliophora a Apicomplexa a několik menších linií: Colpodellida, Chromerida a Perkinsea. Environmentální sekvenování navíc umožnilo objevení dalších sekvencí příbuzných k alveolátům, z nichž některé tvoří úplně nové linie.

3.1. Syndiniales a MALV

Z různých mořských oblastí byly získány sekvence DNA příbuzné k alveolátům. Na základě analýzy 18S ribozomální RNA vytvořily nové mořské alveolátní skupiny I a II, tzv. MALV (López-García et al., 2001), někdy nazývaná nová Alveolata, NAI a II (Not et al., 2007a) nebo výjimečně nekultivovatelná mořská Alveolata, UMAI a II (Alexander et al., 2009). Poprvé byly nalezeny v chladných antarktických vodách (López-García et al., 2001). Vyskytují se nicméně hojně jak v povrchových, tak v hlubokomořských prostředích, v pobřežních oblastech i na volném oceánu. Byly dokonce izolovány z okolí hydrotermálních vývěrů a z mlžů obývajících tato území (Sauvadet et al., 2010; Noguchi et al., 2013). Spolu se stramenopilními sekvencemi jsou nejčastěji zastoupené v environmentálních studiích.

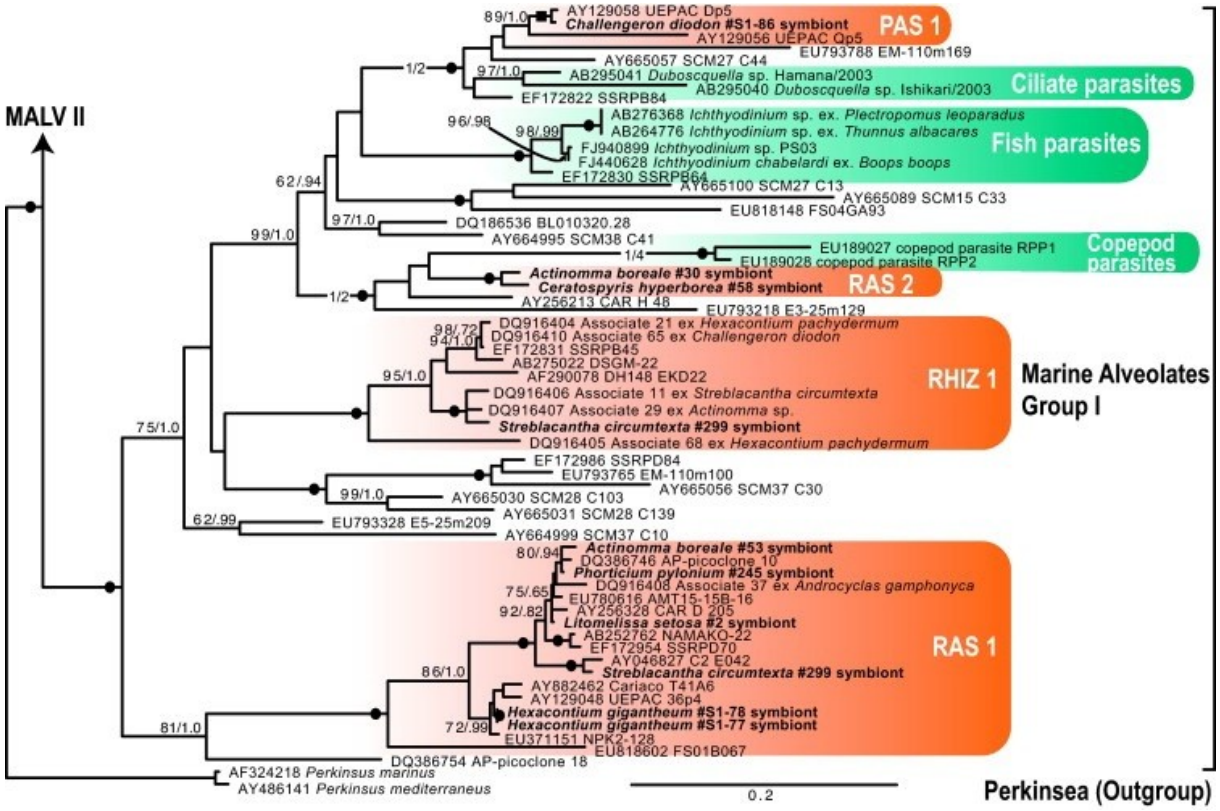
Mořské alveolátní skupiny I a II jsou obecně považovány za taxon Syndiniales. Syndiniales je skupina heterotrofních vnitrobuněčných parazitických organismů. Obývají výhradně mořské prostředí od hladiny až po dno. V minulosti bylo vytvořeno několik hypotéz o fylogenetickém zařazení Syndiniales (Guillou et al., 2008), ale dnes je řadíme mezi dinoflagelláta. Tuto teorii také podporují některé znaky, které mají s dinofllageláty společné, jako je morfologie bičíkatých dinospor. Další typická charakteristika dinoflagellát dinokaryon se stále kondenzovaným chromatinem však u Syndiniales schází (Groisillier et al., 2006).

Obě mořské alveolátní skupiny zahrnují velké množství environmentálních sekvencí. Mimoto obsahují několik známých syndiniálních rodů z pěti hlavních popsaných rodin: Sphaeriparidae, Coccidinidae, Amoebophryidae, Dubosquellidae a Syndinidae. Ačkoli se v zařazení skupin mořských alveolát I a II k Syndiniales většina fylogenetických analýz shoduje, v uspořádání jednotlivých skupin se názory trochu liší. Podle některých studií (López-García et al., 2007; Skovgaard et al., 2009; Bráte et al., 2012) MALV I zahrnuje rod *Duboscquella* a parazitoida rybích vajíček a plůdků *Ichthyodinium*, MALV II potom rody *Syndinium*, *Hematodinium* a *Amoebophrya*. Oproti tomu jiné analýzy (Guillou et al., 2008; Noguchi et al., 2013) ustanovily celkem pět syndiniálních skupin. První dvě odpovídají MALV I a II, skupiny III a V obsahují pouze environmentální sekvence. Zbylá skupina IV sdružuje rody *Hematodinium* a *Syndinium* a MALV II odpovídá pouze Amoebophryidae.

Nejznámější rod *Amoebophrya* spolu s dalšími sekvencemi z podskupin 1-5 MALV-II vytváří dobře podpořenou monofyletickou skupinu (Not et al., 2007a). Nachází se převážně v povrchových oblastech vodního sloupce. Několik exemplářů bylo ale detekováno i ve větších hloubkách. *Amoebophrya* je endoparazit infikující volně žijící Dinoflagelláta, Ciliofora nebo Radiolaria. Zahrnuje jak zástupce se striktní, tak i zástupce s širokou hostitelskou specifikou. Zdá se však, že jeho distribuce je vždy v souladu s výskytem hostitelů (Marie et al., 2006). Dělí se celkem do tří skupin podle druhů organismů, které napadá (Kim et al., 2008). Skupina II se na rozdíl od ostatních, které infikují hostitelské jádro, vyvíjí v cytoplazmě svého hostitele.

Bráte et al. (2012) navíc zařadili do fylogenetického stromu další linie (obr. 2). MALV byly dále členěny do podskupin na základě hostitelských organismů, z kterých pocházely nově získané sekvence. Objevují se zde linie RAS (Radiolaria asociované sekvence), RHIZ (Rhizaria asociované sekvence)

či PAS (Phaeodarian asociované sekvence). Vzhledem k tomu, že se známé syndiniální rody živí paraziticky, je pravděpodobné, že také sdružené sekvence MALV-I a II představují parazitické zástupce. Jelikož nebyl izolován žádný konkrétní druh ani nalezen přesnější důkaz, mohlo by se ale také jednat o vztah mutualistický. K utvoření jednotného obrazu bude nezbytné další prozkoumání těchto nových sekvencí.



Obr. 2: Fylogenetické uspořádání linií mořské alveolární skupiny I (MALV I).
Podle Bráte et al., 2012.

3.2. ARLs

Analýza environmentálních vzorků označených jako „nové bakterie“ ukázala, že řada těchto sekvencí náleží k úplně jiným skupinám (Janouškovec et al., 2012). Mezi sekvencemi původně považovanými za bakteriální bylo nesprávně zařazeno mnoho plastidových sekvencí eukaryot. Mezi nimi byla také malá skupina sekvencí, které se větví jako sesterské skupiny k apicomplexům. Apicomplexům příbuzné linie (ARLs) zahrnují 8 linií (Janouškovec et al., 2012). Šest těchto linií se skládá pouze z enviromentálních sekvencí. Zbylé dvě zahrnují známé symbionty korálů: *Chromera* (ARL-III) a *Vitrela* (ARL-I). Z nedávné studie však vyplynulo, že je *Chromera* a *Vitrela* vázaná spíše na korálové prostředí než na korály jako takové a nemusejí tedy být jejich obligátními symbionty (Janouškovec et al., 2013).

Nejhojnější skupina ARL-V, složená pouze z environmentálních sekvencí, leží mezi parazitickými a volně žijícími skupinami a může být významná pro objasnění vývoje parazitismu u řady apicomplex (Janouškovec et al., 2012). Tato skupina se hojně vyskytuje v prostředí korálových útesů. Zatím není jasný přesný vztah ARL-V a korálů. Vzhledem k jejich vazbě na zdravé populace korálů a určitou hloubku, která nepřesahuje 20 m, se však zdá, že je tento vztah spíše mutualistický než parazitický (Janouškovec et al., 2013).

3.3. Ostatní alveolátní skupiny

Mezi další významné členy alveolát patří kmeny Ciliophora a Dinoflagellata. Oba jsou velmi hojně reprezentované v environmentálních vzorcích, avšak jejich četnost může být odrazem obsahu více kopií genů v buňkách (Díez et al., 2001; Potvin a Lovejoy, 2009).

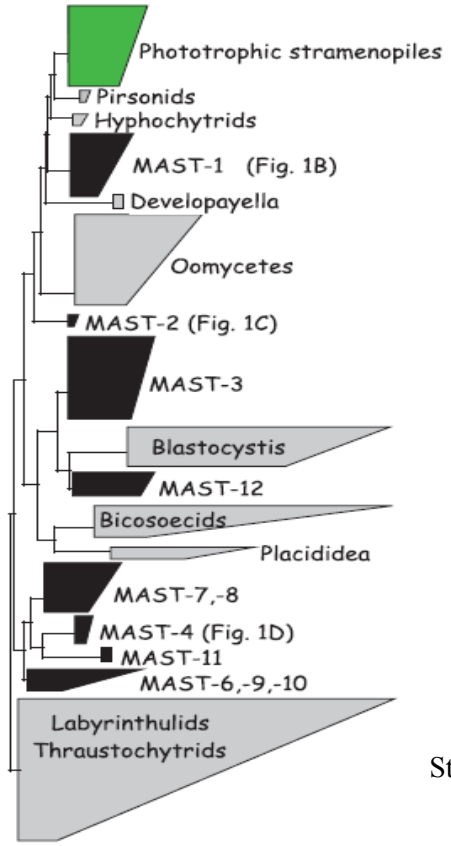
Ciliophora je vůbec jedna z nejlépe prostudovaných skupin z protist. Všechny linie však obsahují velké množství environmentálních sekvencí, které nejsou blízce příbuzné žádným jiným sekvencím (Šlapeta et al., 2005), takže celková diverzita nebyla zdaleka plně prozkoumána. Ciliophora jsou hlavními konzumenty bakteriálních společenstev jak v mořském, tak i sladkovodním prostředí. Řada z nich se rovněž dokáže přizpůsobit anoxickým podmínkám. Sekvence izolované z hlubokých anoxických moří patrně vytváří nový klad, prozatím označený CAR-H (Stoeck et al., 2003b). Předtím, než dojde k získání dalších podobných sekvencí, zůstanou pouze novou domnělou skupinou.

4. Stramenopiles

Přítomnost dvou bičíků, jednoho hladkého a druhého s tripartitními tuhými vlásky, mastigonematy, je hlavním znakem sjednocující Stramenopiles. Tato ekologicky významná skupina organismů obsahuje zástupce celé řady morfotypů s různorodým způsobem obživy. Patří sem jak řasy, tak houbám podobné organismy i heterotrofní bičíkovci. Mimoto zahrnuje úplně nové linie sekvencí.

4.1. MAST

V minulosti odhalila různá mořská prostředí velké množství nových environmentálních sekvencí, které byly více příbuzné mezi sebou než k jiným dosud známým liniím. To naznačovalo, že by se mohlo jednat o úplně nové vývojové linie. Na základě molekulární analýzy malé ribozomální podjednotky 18S rRNA byly následně přiřazeny ke stramenopilním skupinám a pojmenovány MAST neboli mořská stramenopila (Massana et al., 2004). MAST leží na bázi fylogenetického stromu, kde vytvářejí několik nezávislých větví blízkých oomycétům, bicosoecidům a labyrinthulidům (Massana et al., 2006; Logares et al., 2012; obr. 3).



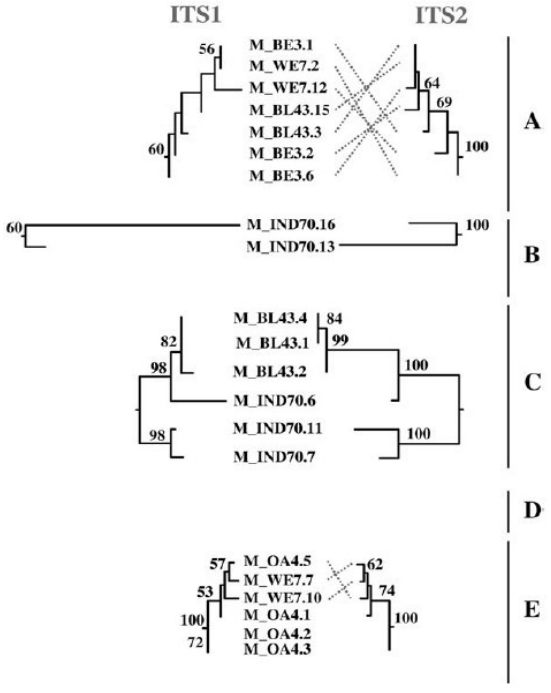
Obr. 3: Fylogenetický strom Stramenopiles. Upraveno podle Massana et al. (2006).

Mořská stramenopila (MAST) zahrnují celkem 13 skupin složených převážně z environmentálních sekvencí (Massana et al., 2004). MAST-1, 3, 4 a 7 jsou planktonní skupiny hojné v otevřených mořích a pobřežních oblastech. Méně často se vyskytující skupiny MAST-2, 5, 6, 10 a 11 se nacházejí v hlubokomořských oblastech a jsou zřejmě součástí pikoplanktonu. MAST-8 je na rozdíl od ostatních skupin vázána lokálně na určité oblasti. Nejzajímavější distribuci mají skupiny MAST-9 a MAST-12, které se nacházejí převážně v anoxickém prostředí sedimentů nebo v okolí hydrotermálních vývěrů. Tyto sekvence by mohly pocházet z anaerobních organismů.

Skupiny MAST-1, 2, 3 a 4 jsou kosmopolitně rozšířené a nejčastěji izolované z přírodních vzorků. Avšak jejich světová distribuce se trochu liší. MAST-1 se často vyskytuje v polárních oblastech, na rozdíl od skupiny MAST-4, která je závislá spíše na teplejší moře. Massana et al. (2006) navíc odhalili jejich vzhled. Použili metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se specifickými oligonukleotidovými sondami, které umožňují zacílení konkrétní MAST skupiny. Všechny pozorované buňky byly kulovité s dobře definovaným jádrem a jedním dlouhým bičíkem (kromě skupiny MAST-1 kladu A). Druhý bičík typický pro stramenopilní skupiny nebyl pozorován. To může být však zapříčiněno jeho malou velikostí či ztrátou během vzorkování (Massana et al., 2006). Skupiny se také značně lišily v buněčné velikosti. Některé vykazovaly konstantní velikost v různém prostředí, u jiných se velikost rovnoměrně snižovala se vzrůstající teplotou okolí (Massana et al., 2006). Existuje zřejmě několik ekotypů lišících se v nárocích na podmínky prostředí.

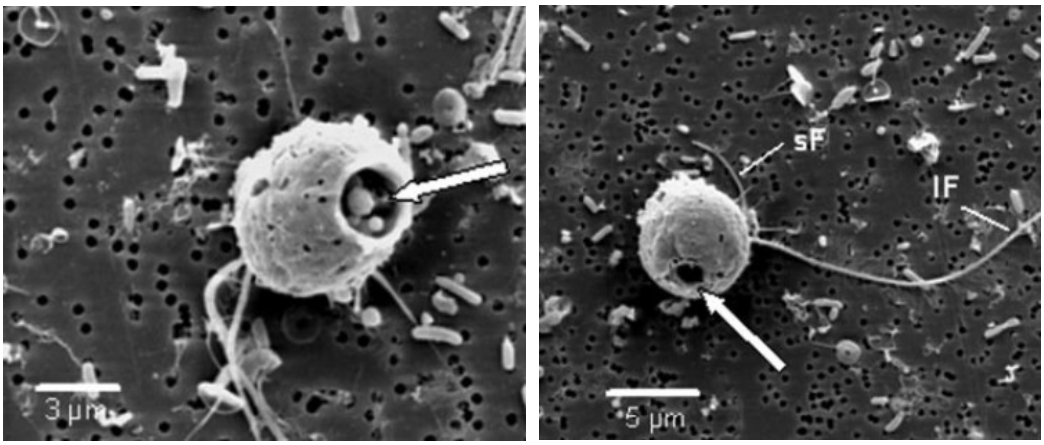
Klad MAST-3 původně složený pouze z environmentálních sekvencí má nyní své dva popsané zástupce. *Solenicola seltigera* je vůbec první druh popsaný mezi MAST. Přiřazení solenicoly do fylogenetického stromu bylo v minulosti vždy obtížné. Nakonec se stala součástí *Incertae sedis*, organismů s neznámým zařazením. Nedávná studie nicméně odhalila příbuznost solenicoly k MAST-3 s maximální větvící podporou (Gómez et al., 2011). *Solenicola seltigera* je mořský heterotrof se silnou vazbou na křemičitá vlákna rozsivek. Jde o vztah mutualistický (Gómez et al., 2011). Oproti charakteristickým stramenopilním znakům vlastní pouze jeden hladký bičík. Vyskytuje se hojně po celém světě. Druhým zástupcem je *Incisomonas marina* kultivovaný a popsaný Cavalier-Smithem a Scoblovou (2013). Tento druh má také pouze jeden hladký zadní bičík a živí se bakteriemi. *Incisomonas* a jemu příbuzné environmentální sekvence se v 18S rDNA analýze sestersky větví se skupinou zahrnující množství environmentálních sekvencí a také druh *Solenicola seltigera* (Cavalier-Smith a Scoble, 2013). Vzhledem k unikátnímu znaku kultivovatelných zástupců, pouze jednomu hladkému bičíku, označili Cavalier-Smith a Scoble (2013) tuto linii jako Uniciliatida a celou MAST-3 skupinu pojmenovali Nanomonadea.

Vůbec nejhojnější ze všech skupin MAST-4 zahrnuje velmi podobné sekvence získané z různých odlehlých mořských systémů. Má pět hlavních kladů A-E. Rodríguez-Martínez et al. (2012) navrhli metodu, podle které je možné odhadnout pravděpodobný počet druhů v jednotlivých kladech. Porovnávali jejich interní přepisované oblasti ITS1 a ITS2. Přitom klady obsahující více druhů vykazují shodné topologie v ITS1 a ITS2 stromech. Zatímco klady, které zahrnují pouze jeden druh nebo jsou v procesu speciace, vykazují neshodu v ITS. Ta je zřejmě způsobena nedávnou rekombinací. Hypotetizují, že klad A zahrnuje pravděpodobně pouze jeden druh, oproti tomu klady B, C a E mají druhů více (obr. 4). Klad D má pouze jednu ITS sekvenci a nemohl být tedy analyzován. Podobné srovnání by mohlo odhalit počet druhů u i ostatních skupin.



Obr. 4: Porovnání ITS oblastí u MAST-4. Upraveno podle Rodríguez-Martínez et al. (2012).

Kromě adaptace k anoxickému prostředí vykazuje klad MAST-12 ještě další zvláštnosti. První z nich je přítomnost sekvence izolované z ústí řeky (Kolodziej a Stoeck, 2007). Tento nález by mohl znamenat, že skupina MAST- 12 obsahuje také sladkovodní zástupce. Při ústí řek dochází k míchání sladké a slané vody, nenachází se zde proto čistě sladkovodní prostředí. Objevená sekvence by tedy mohla také pocházet z organismu, který pouze toleruje nižší obsah soli. Nebo je to jenom sekvence pocházející z DNA, která sem byla zanesena z moře. Druhou zajímavostí MAST-12 je podivný otvor na zadní straně buňky (obr. 5). Kolodziej a Stoeck (2007) objevili tuto zvláštní strukturu při zkoumání vzhledu MAST-12 pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se specifickými oligonukleotidovými sondami, které umožňují zacílení konkrétní MAST skupiny, v kombinaci se skenovací elektronovou mikroskopií. Nic podobného nebylo nikdy dříve pozorováno. Podle některých názorů by se mohlo jednat o zdeformování způsobené přípravou vzorku. Struktura se nicméně u zkoumaných buněk objevovala pravidelně (Kolodziej a Stoeck, 2007).



Obr. 5: Podivná struktura u zástupce MAST-12. Upraveno podle Kolodziej a Stoeck (2007).

Všechna mořská stramenopila (MAST) jsou s největší pravděpodobností volně žijící heterotrofní bičíkovci. Bakteriovorní způsob výživy potvrdily experimenty s potravní preferencí (Massana et al., 2009) a přítomnost bakterií uvnitř vakuol (Massana et al., 2006). V obou případech byly konkrétní MAST skupiny rozpoznány pomocí FISH se specifickými oligonukleotidovými sondami, pohlcené bakterie byly posléze detekovány epifluorescencí a FISH. Některé skupiny přitom upřednostňovaly spíše bakterie s dobrou kondicí, jiné zase preferovaly především mrtvé buňky. Odmítání určitých bakterií naznačuje přítomnost pomyslné hranice optimální velikosti kořisti. Některá MAST můžou ale navíc přecházet na jiný způsob výživy. MAST-6 v oblastech s vysokým výskytem cyanobakterií a zelených řas pohlcují mimo jiné také tyto autotrofní organismy (Piwosz a Pernthaler, 2010). Heterotrofii také podporuje postavení MAST skupin na fylogenetickém stromu, kde skupiny MAST leží mezi

heterotrofními větvemi. Navíc ve FISH analýzách nebyl pozorován žádný náznak přítomnosti chloroplastu (Massana et al., 2006).

Mořská stramenopila (MAST) obývají všechny mořské oblasti a jsou zřejmě významnou složkou mořských ekosystémů. Rozsáhlý výskyt v prostředí poukazuje na existenci několika ekotypů. Sekvence DNA získané z hlubokomořských sedimentů by mohly pocházet z jedinců, kteří jsou na toto prostředí dobře adaptováni. Na druhé straně by se ale mohlo jednat o DNA z mrtvých organismů vyšších vrstev. Oproti tomu sekvence pocházející z volného moře jsou pravděpodobně nezanedbatelnou složkou planktonních společenstev.

4.2. Pelagophyta

Třída Pelagophyceae je skupina mořských planktonních řas, která často způsobuje hnědé zbarvení vodní hladiny (Raven, 2012). Její zástupci se vyznačují stramenopilními bičíkatými buňkami. K této třídě byla přiřazena skupina sekvencí z plastidového genomu z 99% příbuzná ke známému druhu *Pelagomonas calceolata* (Worden et al., 2012). Je možné, že nově nalezené sekvence pocházejí přímo z *Pelagomonas calceolata*. Vzhledem k neschopnosti kultivovat organismus, z kterého sekvence pocházejí, byl ale z opatrnosti označen jako divoký *Pelagomonas* (Worden et al., 2012).

Divoký *Pelagomonas* vykazuje velmi širokou distribuci v prostředí. Jeho sekvence jsou hojné v povrchových vodách i v hlubokomořských sedimentech, v mezotrofních i oligotrofních oblastech. Jelikož se jedná o autotrofní druh, může hrát významnou roli v ukládání uhlíku do sedimentů (Worden et al., 2012). Částečně by tak mohl přispívat ke světovému koloběhu uhlíku, ačkoliv větší mírou se na tomto procesu podílejí spíše organismy větších velikostí s mineralizovanými schránkami.

4.3. Ostatní Stramenopiles

Mezi další stramenopilní skupiny, které se často vyskytují v environmentálních vzorcích, patří především heterotrofní Bicosoecida a autotrofní třídy Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Dictyochophyceae a menší mírou přispívají Pinguiophyceae či Eustigmatophyceae.

Chrysophyceae zahrnují velké množství popsaných fototrofních i heterotrofních druhů. Většina z nich žije ve sladké vodě, najdou se však i některé druhy vázané na mořské prostředí. Mezi nimi je také jedna větší popsaná mořská třída Parmales, pro jejíž zástupce je charakteristická přítomnost křemičité schránky (Shi et al., 2009). Chrysophyceae vytvářejí celkem 12 kladů A-J (klady B a F jsou ještě rozděleny na B1, B2 a F1, F2), z nichž G-J byly popsány teprve v nedávné studii del Campa a Massany (2011). Kromě kladu A (Synurophyceae), který obsahuje pouze kultivovatelné zástupce, a kladů G, H a I, které jsou naopak složeny pouze z environmentálních sekvencí, všechny ostatní seskupují několik známých organismů a množství environmentálních sekvencí. Přitom klady B1, B2 a E mají pouze sladkovodní sekvence, klady C, D, F1, F2, G, H a J obsahují sekvence z mořského i sladkovodního prostředí a klad I zahrnuje pouze mořské sekvence (del Campo a Massana, 2011). Chrysophyceae jsou poměrné hojná a mohou být významnými činiteli v přírodě.

Bicosoecida jsou aplastidičtí bičíkovci, kteří zahrnují 11 rodů. Typické dvoubičíkaté buňky se vyskytují ve sladkovodním i mořském prostředí. Spadá sem mimo jiné nesprávně pojmenovaný mořský klad MAST-13 (del Campo a Massana, 2011), dříve řazený k mořským stramenopilům (MAST). Environmentální sekvence vytvářejí jeden sladkovodní monofyletický klad vměstnaný mezi několika mořskými větvemi. Mohlo by se jednat o pozůstatek přechodu této skupiny ze sladké vody do mořského prostředí či naopak linii, která opustila původní mořský habitat.

Rozsivky (Bacillariophyceae či Diatomeae) jsou známé především pro svoje dvoudílné křemičité schránky. Kromě tvorby kyslíku se také podílejí na ukládání křemíků do sedimentů. V prostředí se jim příbuzné environmentální sekvence vyskytují hlavně v oblastech s vyšší koncentrací živin. Jsou také zřejmě druhově vázané na určité světové oblasti, jelikož se nálezy jednotlivých sekvencí z různých oblastí značně liší (Díez et al., 2001). Oproti tomu environmentální sekvence Dictyochophyceae se objevují globálně jako součást planktonu.

5. Rhizaria

Tři hlavní skupiny améboflagelátů Foraminifera, Radiolaria a Cercozoa představují největší druhovou diverzitu oddělení Rhizaria. Většina zástupců je heterotrofních a tvoří různě tvarované panožky a schránky. Přestože všechny obývají vodní prostředí, jejich distribuce se trochu liší. Zatímco Radiolaria jsou součástí planktonu, Foraminifera žijí především na dně v bentosu.

5.1. Foraminifera

Charakteristickými znaky skupiny jsou granulózní retikulopodia a jednokomůrkové (Monothalamida) nebo vícekomůrkové (Rotalida a Textularida) schránky. Jedná se především o generalisty, kteří využívají velkou škálu různých zdrojů a přežívají v širokém množství habitatů. To může být důvodem častého výskytu jejich environmentálních sekvencí ve studovaných vzorcích. Nejdříve se předpokládalo, že obývají hlavně mořské prostředí, protože jsou zde velmi hojní. Kromě toho se ale vyskytují i ve sladkých vodách a v půdě.

Velké množství environmentálních sekvencí spadá mezi mořská foraminifera. Některé z nich jasně patří k vícekomůrkovým řádům Rotalida a Textularida. Většina se však větví na bázi fylogenetického stromu mezi monothalamidními klady A-M (Pawlowski et al., 2011). Některé spadají do existujících kladů, ale většina z nich vytváří nové environmentální foraminiferní klady nazvané ENFOR1-8 (Pawlowski et al., 2011). Téměř všechny ENFOR pocházejí z hlubokomořských vzorků. S největší pravděpodobností to jsou sekvence organismů přizpůsobených k tomuto prostředí. Některé také zahrnují skupiny sekvencí DNA pocházející z organismů, které žijí zvláštním způsobem vně nebo uvnitř prázdných schránek jiných foraminifer (Lecroq et al., 2011).

Foraminifera nejsou omezená pouze na mořské prostředí. Velké množství jejich zástupců obývá sladké vody. Sladkovodní sekvence spadají do dvou linií blízce příbuzným některým mořským

foraminiferům (Holzmann et al., 2003). Jedna skupina sekvencí vytváří úplně nový klad N, druhá se větví uvnitř kladu L (Holzmann et al., 2003). Nejpravděpodobnější vysvětlení této skutečnosti je, že změnily habitat nezávisle na sobě.

Lejzerowicz et al. (2010) rovněž izolovali několik sekvencí z půdního prostředí. Podle této studie vytváří půdní environmentální sekvence celkem čtyři skupiny, z nichž skupina 1 je složena pouze z půdních členů. Zbylé tři skupiny obsahují také sladkovodní, ale nikdy mořské sekvence (Lejzerowicz et al., 2010). Kromě změny habitatu z mořského na sladkovodní přešla tedy Foraminifera i na pevnou zem. Zde jako jiné půdní organismy zřejmě přežívají v pórech. Výskyt foraminifer v tak velké škále rozmanitých prostředí poukazuje na jejich ekologickou rozmanitost. Řada sekvencí má ale nejasné zařazení a jejich příbuzenské vztahy nejsou zatím vyřešeny.

5.2. Radiolaria

Radiolaria jsou výhradně mořské organismy. Mnoho z nich vytváří podpůrné mineralizované mřížky až schránky. Živí se velmi různorodou potravou od jednobuněčných rozsivek a nálevníků až po larvy bezobratlých živočichů. Tvorba symbiotických vztahů s ostatními organismy je pro tuto skupinu typická. Skrývají velké množství protozoálních a řasových symbiontů zahrnující Dinoflagellata, Haptophyta a Prasinophyta (Bråte et al., 2012). Mimoto jsou hostiteli parazitických Syndiniales. I když by mohly syndiniální sekvence izolované z radiolárií pocházet z jejich endosymbiontů (Dolven et al., 2007). Vzhledem k jejich způsobu života jsou bezpochyby významnou součástí potravních řetězců.

Radiolaria se dělí na tři statisticky dobře podpořené taxony: Acantharea, Polycistinea a Taxopodida. Nalezené environmentální sekvence tvoří pět kladů: RAD-I a RAD-II se nacházejí mezi Acantharea, RAD-III spadá k Polycistinea a RAD-IV a V k Taxopodida (Not et al., 2007a). RAD-I, RAD-IV a jedna z podskupin RAD-III jsou složeny pouze ze sekvencí pocházejících ze Sargasového moře (Not et al., 2007a), zatímco ostatní skupiny vykazují mnohem rozsáhlejší rozšíření zahrnující další oblasti světa. Například skupina RAD-III obsahuje navíc sekvence ze Středozemního moře, karibských vod a Jihočínského moře. RAD-V zase seskupuje mimo jiné sekvence pocházející z antarktické oblasti.

5.3. Cercozoa

Skupina Cercozoa zahrnuje velmi hojné a ekologicky významné druhy. Vyskytují se v půdě, sladkovodním i mořském prostředí a živí se převážně bakteriemi. Analýza 18S rRNA odkryla celkem devět nových cerkozoálních kladů NC (Bass a Cavalier-Smith, 2004). Všechny jsou složené pouze z environmentálních sekvencí. Zajímavé jsou klady NC8 a 9, které jsou zřejmě sesterskou skupinou Phytomyxea, parazitů rostlin (Bass a Cavalier-Smith, 2004). Zatím ale není jisté, jestli jsou nové klady spíše parazitické nebo endosymbiotické.

6. Hacrobia / CCTH

Hacrobia je uskupení sdružující Cryptophyta, Centroheliozoa, Telonemia a Haptophyta (CCTH). Kromě toho sem spadají ještě Katablepharida a další menší skupiny. Jedná se zřejmě o polyfyletickou skupinu. Katablepharida jsou sice příbuzná cryptophytům s maximální bootstrapovou podporou, Haptophyta jsou však blízce příbuzná SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria) a fylogenetická pozice ostatních skupin je zatím nejasná (Burki et al., 2012).

Sekvence dvou fotosyntetizujících skupin Cryptophyta a Haptophyta (Prymnesiophyta) byly pozorovány v řadě prostředí. Některé jsou identické se známými druhy, jiné jsou naopak úplně odlišné, což naznačuje značnou diverzitu, která však ještě nebyla plně prozkoumána.

Haptophytní sekvence jsou hojné převážně v povrchových částech vodního sloupce. Několik sekvencí získaných na základě analýzy malé ribozomální podjednotky 18S rRNA je příbuzných k *Phaeocystis antarctica* (Díez et al., 2001). Tento druh je hojný v studených oblastech jižní polokoule, kde často způsobuje rozsáhlé vodní květy. Další objevené sekvence spadají k *Emiliania huxleyi* (Man-Aharonovich et al., 2010), druhu, který významně ovlivňuje koloběh uhlíku na Zemi. Lepère et al. (2009) provedli také analýzu plastidových genů, z které vyplynuly klady Prym 16S-I, II a III. Každý klad zahrnuje velké množství environmentálních sekvencí a některý známý druh. Klad Prym 16S-I obsahuje druh *Chrysochromulina acantha*, Prym 16S-II dva druhy rodu *Phaecystis* a Prym 16S-III *Emiliania huxleyi* (Lepère et al., 2009). Je zřejmé, že některé sekvence ribozomálních a plastidových genů mohou pocházet ze stejných organismů.

K haptophytům se na základě plastidové rRNA analýzy větví jako sesterská skupina rappemonády (Moreira a López-García, 2014). Tato skupina byla charakterizována kombinací analýzy plastidových 16S rRNA genů a fluorescence *in situ* hybridizace neboli FISH (Moreira a López-García, 2014). Environmentální sekvence pocházejí ze sladkých vod i moří. Není ale zatím jisté, jestli rappemonády reprezentují novou řasovou skupinu nebo jsou jenom další haptophytní linií.

Centroheliozoa se vyznačují paprsčitě uspořádanými axopodii, které slouží k chytání potravy. Některé skupiny mají křemičité šupiny na povrchu buňky, jiné je v evoluci druhotně ztratily. Centroheliozoa a k nim spadající environmentální sekvence jsou rozdělena do dvou kladů A, B a šesti subkladů CL1 - 6, po třech v každé skupině (Cavalier-Smith a Heyden, 2007). Jednotlivé subklady byly zkonstruovány na základě příbuznosti 18S rRNA genů. Environmentální sekvence pochází převážně ze sladkovodního prostředí, jen několik málo jich bylo získáno z moří. Některé subklady jsou přitom výhradně sladkovodní (CL1 a CL6) či mořské (CL4), zatímco u ostatních se nacházejí zástupci a sekvence z obou prostředí (Cavalier-Smith a Heyden, 2007). To naznačuje přechod některých linií do jiného prostředí.

Telonemia je poměrně nedávno ustanovený kmen (Shalchian-Tabrizi et al., 2006). Tvoří dobře podpořenou monofyletickou skupinu, která sdružuje rod *Telonema* a jemu příbuzné environmentální sekvence. Členové rodu *Telonema* jsou dvoubičíkovci s mitochondriemi s tubulárními kristami a vysoce komplexním cytoskeletem. Mimoto se u nich nacházejí podpovrchové vakuoly podobně jako u alveolát. Se stramenopily zase sdílejí mastigonemata. Vzhledem k těmto charakteristikám by měla být Telonemia

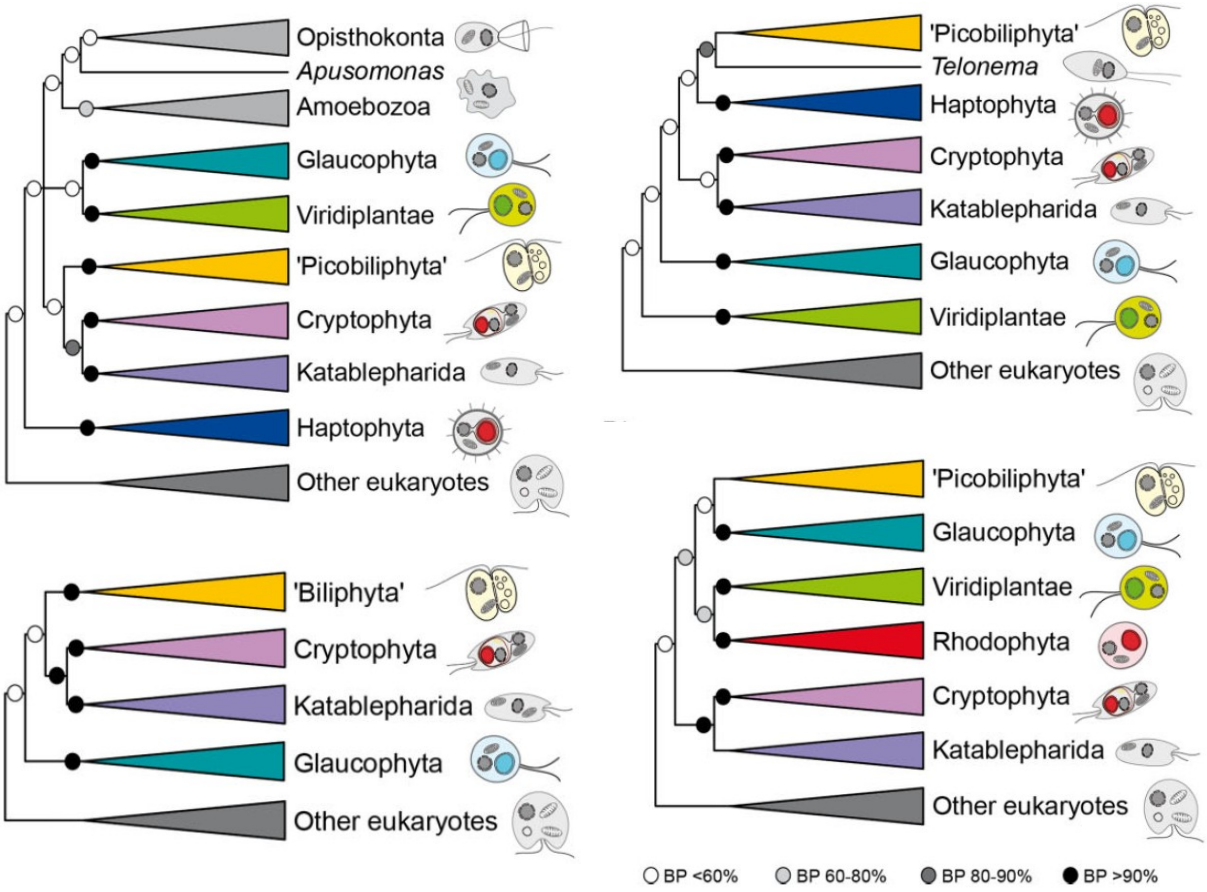
blízká spíše alveolátům či stramenopilům. Podle fylogenetické analýzy založené na18S rRNA jsou však jejich nejbližšími příbuznými Cryptophyta a Haptophyta (Shalchian-Tabrizi et al., 2006).

7. Picobiliphyta

V mořském pikoplanktonu byla odhalena velmi zajímavá skupinu sekvencí. Tyto sekvence byly původně získány filtrací vody skrze 2-3µl póry, používané k izolaci pikoplanktoních organismů. Podle původu dostala tedy název Picobiliphyta (Not et al., 2007b). Některými autory byla nicméně přejmenovaná na Biliphyta vzhledem k odhadované velikosti odpovídající spíše nanoplanktonu. Ačkoli byla Picobiliphyta poprvé získána z chladných polárních vod zdá se, že obývají celou řadu nejrůznějších prostředí a jsou globálně rozšířena. Původně se také myslelo, že jsou vázaná spíše na horní část vodního sloupce. Několik sekvencí bylo nicméně nedávno nalezeno i v hlubokomořských oblastech (Moreira a López-García, 2014). Vytvářejí alespoň tři klady, z nichž jasně monofyletický klad BP2 se vyskytuje pouze u hladiny.

První environmentální sekvence picobiliphyt byly identifikovány 18S ribozomální RNA analýzou. Následně byla determinována jejich hrubá morfologie mikroskopickým pozorováním s použitím fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickými sondami (Not et al., 2007b). Pozorované buňky obsahovaly oranžově světélkující organely a malé struktury barvící se barvivem specificky označujícím jádra. Podle Nota et al. (2007b) mohlo jít o plastidy s nukleomorfem, pozůstatkem jádra pohlceného organismu. Předpokládali totiž, že se jedná o fototrofní organismy příbuzné cryptophytům. Tuto teorii také podpořila skutečnost, že Pikobiliphyta stejně jako Cryptophyta zřejmě obsahovala fykobiliproteiny, které zachycují světelnou energii pro metabolismus. Žádná z následných studií však neodhalila důkazy po přítomnosti plastidové DNA a hypotézu nepotvrdila (Yoon et al., 2011; Seenivasan et al., 2013; Moreira a López-García, 2014). Naopak se zdá, že Pikobiliphyta jsou s největší pravděpodobností heterotrofní organismy. Oranžově světélkující signály mohly proto spíše pocházet z pohlcených cryptophytích řas (Yoon et al., 2011).

Picobiliphyta vytvářejí nezávislou linii mezi hlavními eukaryotními skupinami. Jejich přesná pozice ve fylogenetickém stromě je zatím nevyřešena. V minulosti byly na základě různých studií považovány za sesterskou skupinu ke cryptophytům, katablepharidům, telonemidům či glaukophytům (Moreira a Lopéz-García, 2014; obr. 6). Žádné z těchto větvení nebylo dostatečně podpořeno, a proto dnes zaujímají pozici eukaryotních *Incertae sedis*, skupiny s neznámým postavením. Vzhledem k jejich hlubokému větvení uvnitř stromu je však jasné, že se jedná o velkou samostatnou skupinu.

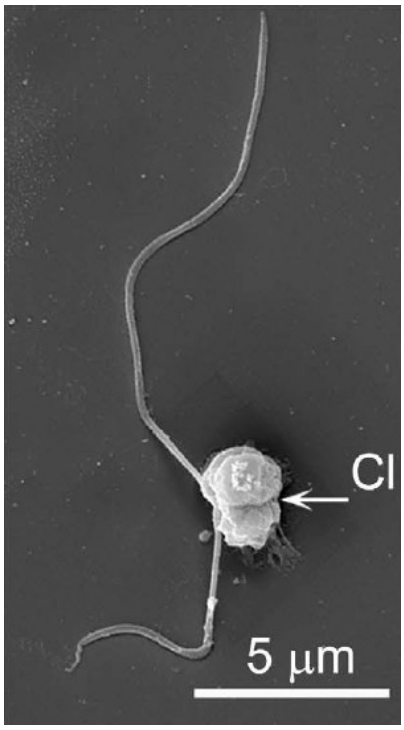


Obr. 6: Různé pohledy na fylogenetickou pozici Picobiliphyt. BP značí pravděpodobnost větvení. Upraveno podle Moreira a Lopéz-García (2014).

Skupina Picobiliphyta se až do nedávné doby skládala čistě z environmentálních sekvencí. K popsání vůbec prvního kultivovatelného zástupce, na základě kterého byl popsán kmen Picozoa, přispěli Seenivasan et al. (2013). *Picomonas judraskeda* (obr. 7) je jednobuněčný organismus se dvěma hladkými heterokontními bičíky umístěnými na ventrální straně podlouhlého těla. Buňka je rozdělena rýhou na dvě poloviny (obr. 7). Přední část obsahuje všechny typické eukaryotické struktury, jako je jádro, jedna mitochondrie s tubulárními kristami a Golgiho aparát. Zadní část buňky je zase důležitá v přijímání a zpracovávání potravy. Nacházejí se zde především vakuoly a cytostom. Takto rozdělené tělo spolu se zvláštním typem pohybu jsou unikátními znaky, které nebyly nikdy pozorované u žádných jiných eukaryot (Seenivasan et al., 2013). Mohlo by se tedy skutečně jednat o úplně novou eukaryotickou linii se specifickými charakteristikami.

Další velmi diskutovanou problematikou ohledně picobiliphyt je jejich způsob výživy. Autotrofie byla po podrobnějším zkoumání zcela zavržena. Alternativou je pohlcování virů, bakterií, sinic či drobných řas. Nálezy nejrůznějších virových a bakteriálních DNA úseků mezi sekvencemi by tomu odpovídaly (Yoon et al., 2011). Není ale vyloučeno, že se jedná o mikroorganismy asociované s povrchem buněk.

Prozkoumání ultrastruktury *Picomonas judraskeda* pomohlo při objasnění způsobu obživy. Buněčná ústa picomonase se dokážou roztáhnout pouze do omezené šířky (Seenivasan et al., 2013). Projdou jím tak pouze částice menší než 150 nm, což je mnohem méně než velikost typické prokaryotní buňky. *Picomonas* se zřejmě krmí na koloidních částicích, rozpadlých zbytcích buněk hojně obsažených v prostředí a malých virech.



Obr. 7: Mikroskopický snímek *Picomonas judraskeda*. Cl označuje rýhu, rozdělující buňku na přední a zadní část. Upraveno podle Seenivasan a spol. (2013).

Všechna objevená fakta vrhají úplně nový pohled na původně málo známou skupinu picobiliphyt. Ačkoli objev kultivovaného druhu *Picomonas judraskeda* výrazně přispěl k vyřešení mnoha nejasností ohledně obživy a morfologie těchto organismů, u jiných zástupců může být situace zcela jiná. Pro potvrzení současných představ je proto nezbytné prozkoumání a izolace dalších zástupců.

8. Chlorophyta

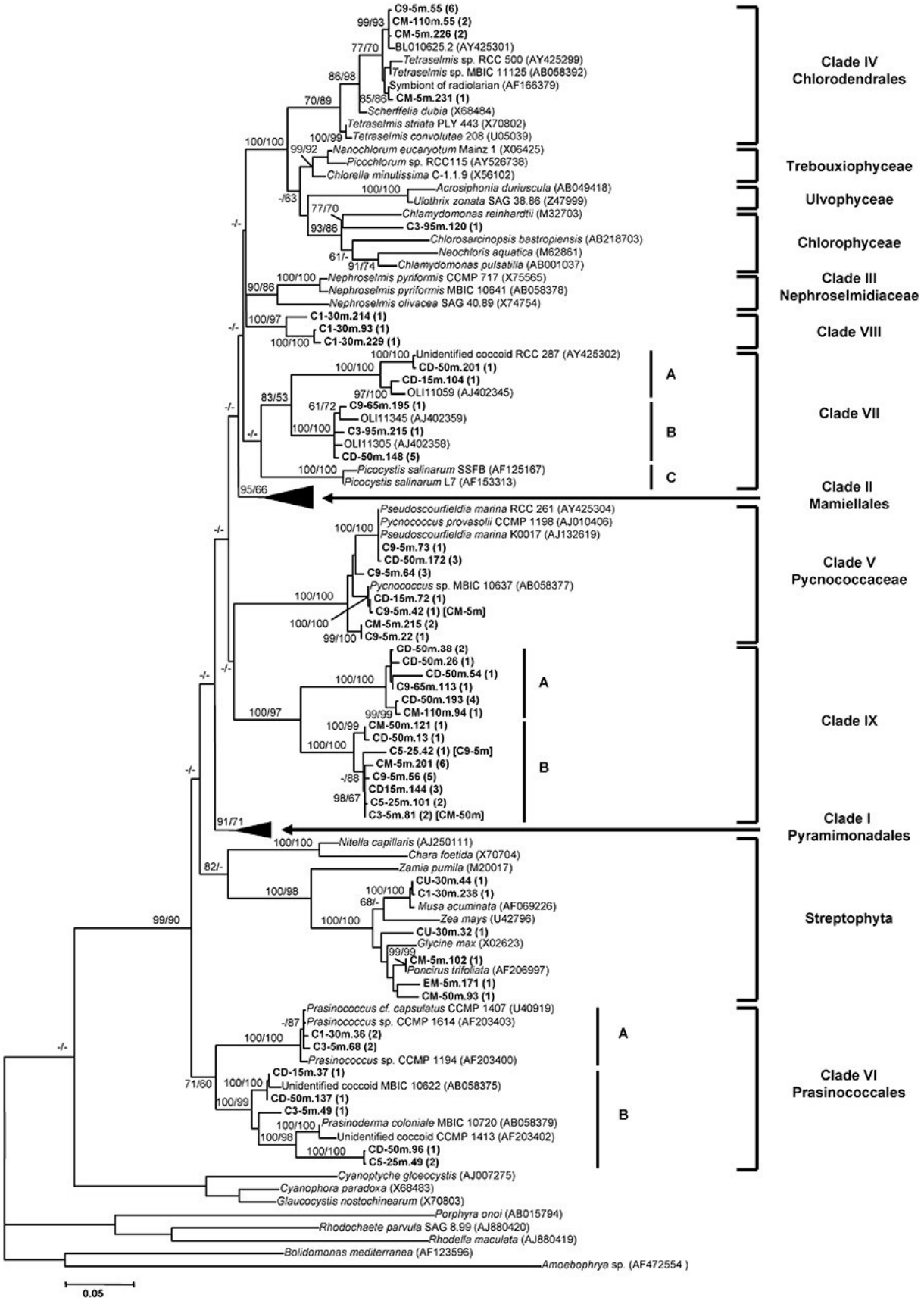
Chlorophyta, skupinu jednobuněčných i mnohobuněčných zelených řas, definuje především přítomnost primárních chloroplastů a typy barviv v nich obsažené. Obsahují především chlorofyl *a* a *b*, čímž se odlišují od glaucophyt a rhodophyt. Primární chloroplasty vznikly pohlcením cyanobakterie společným předkem všech archaeplastid. V environmentálních vzorcích se vyskytují především sekvence spadající do skupiny Prasinophyta, malou mírou přispívají také třídy Trebouxiophyceae, Pedinophyceae, Ulvophyceae či Chlorophyceae, které ale nejsou tolik diskutovanými skupinami.

8.1. Prasinophyta

V molekulárních průzkumech nejhojnější a nejrozšířenější chlorophytí třída Prasinophyceae se vyskytuje v mořských ekosystémech při pobřeží, oligotrofních i polárních vodách. Několik analýz 18S ribozomální RNA ukázalo, že se jedná o parafyletickou skupinu (Fawley et al., 2001; Viprey et al., 2008).

Tato skupina zelených řas obsahuje celkem 9 popsaných kladů (Guillou et al., 2004; Viprey et al., 2008; obr. 8). Klad I zahrnuje především druhy patřící do řádu Pyramimonadales a několik environmentálních sekvencí, z nichž jedna je velmi blízká rodu *Pyramimonas*. Klad II odpovídá řádu Mamiellales, obsahuje tři hlavní mořské picoplanktonní zástupce a sekvence jim příbuzné: *Micromonas*, *Ostreococcus* a *Bathycoccus*. Klad III seskupuje rod *Nephroselmis* a sekvence jemu příbuzné. Klad IV je složen ze dvou rodů *Tetraselmis* a *Scherffelia* patřících do řádu Chlorodendrales. Klad V sdružuje dva hlavní soubory sekvencí patřící k *Pycnococcus provasolii* a *Pseudoscourfieldia marina*. Ačkoliv se tyto dva rody morfologicky liší, jejich sekvence si jsou velmi blízce příbuzné, což může naznačovat, že se jedná o dvě různá vývojová stádia těch samých organismů (Guillou et al., 2004). Klad VI obsahuje dvě linie převážně kokoidních organismů. Jedna zahrnuje mimo jiné rod *Prasinococcus*, druhá rod *Prasinoderma* (Viprey et al., 2008). Klad VII je rozdělen do tří podskupin A, B a C. Zatímco podskupiny A a B obsahují environmentální sekvence, podskupina C odpovídá *Picocystis saliarum* (Guillou et al., 2004), druhu pocházejícímu z hypersalinních jezer. Klady VIII a IX jsou tvořeny především úplně novými sekvencemi objevenými v oblasti Středozemního moře (Viprey et al., 2008). Z analýzy založené na plastidových 16S rRNA genech vyplynuly dva další klady bez kultivovatelných zástupců: 16S-VIII (Lepère et al., 2009) a 16S-IX (Shi et al., 2011). Skupina 16S-VIII přitom zřejmě odpovídá prasinophytímu kladu IX.

Předmětem studií bývají hlavně významné pikoplanktonní rody *Micromonas*, *Bathyococcus* a *Ostreococcus*. Rod *Micromonas* se vyskytuje v prostředí poměrně často. Je adaptován zejména na vody bohaté na živiny, jelikož se nachází mnohem více v příbřežních oblastech než na otevřených mořích (Marie et al., 2006, Viprey et al., 2008). Obývá především oblasti marockého pobřeží, pobřeží Středozemního moře, kanál La Manche a vyšší zeměpisné šířky Atlantského oceánu. Byl nicméně izolován i z oblastí chudších na živiny, například z Gibraltarského průplavu, což naznačuje vliv dalších faktorů prostředí na jeho distribuci (Viprey et al., 2008). Na základě environmentálních průzkumů bylo popsáno celkem pět dalších kladů (A-E) uvnitř rodu *Micromonas*. Všechny vykazovaly podobnou distribuci v prostředí. Lovejoy et al. (2007) kromě toho ve své studii popisují zajímavý ekotyp micromonase adaptovaný na studené oblasti arktických moří. Zmíněné sekvence spadají mezi klad E, kde tvoří podskupinu *a*. Tento ekotyp je schopen přežít podmínky během arktické noci a v pozdní zimě opět obnovit rozsáhlou populaci. Svou schopností poměrně rychlého růstu v tak teplotně a světelně chudých podmínkách se stává dominující skupinou arktického fytoplanktonu. Nahrazuje zde dokonce i všudypřítomné cyanobakterie.



Obr 8.: Fylogenetický strom chlorophyt s důrazem na umístění prasinophytích kladů. Číselné hodnoty ukazují bootstrapovou podporu větvení. Podle Viprey et al. 2008.

Nejmenší známý volně žijící eukaryotický organismus *Ostreoccocus tauri* vlastní po jedné semiautonomní organele a malý genom (Rodríguez et al., 2005). Rod *Ostreococcus* vytváří celkem čtyři klady (Guillou et al., 2004), které ačkoli se v prostředí objevují v nízkých koncentracích, jsou široce distribuovány. Objevené sekvence se značně svou distribucí v prostředí liší, což ukazuje na odlišné ekologické niky u jednotlivých skupin. Klad A preferuje spíše povrchové vody, zatímco klad B hlubší eufotické zóny (Viprey et al., 2008). *Bathycoccus*, drobný koloidní organismus pokrytý schránkou pavučinového vzhledu, je pravděpodobně spíše mezotrofním druhem s dobrou adaptací na slabé světelné podmínky (Marie et al., 2006).

9. Exkavata

Charakteristickým znakem exkavát je zpravidla jednobuněčné tělo s ventrální rýhou, kterou prochází zpětný bičík. Bičík svým kmitáním přináší potravu. Patří sem mimo jiné významný kmen Euglenozoa. Jeho členové využívají velmi různorodé zdroje potravy, někteří jsou heterotrofní, jiní autotrofní. Najde se mezi nimi ale také celá řada parazitických zástupců, například rod *Trypanosoma*. V následujícím textu se budeme zabývat tímto kmenem z důvodu odhalení nových zajímavých environmentálních dat spadajících do třídy Diplonemea.

9.1. Diplonemea (Diplonemida)

Diplonemea jsou heterotrofní bičíkovci. Molekulární fylogeneze je umisťuje do sesterského vztahu k třídě Kinetoplastida. Jediní dosud známí kultivovatelní zástupci patří do mořských volně žijících rodů *Diplonema* a *Rhynchopus*. Ani v environmentálních studiích nebyla tato skupina po dlouhou dobu nalezena. Ačkoli bylo objeveno několik sekvencí v antarktické polární oblasti (López-García et al., 2001) a v okolí hydrotermálních vývěrů v oblasti Ztraceného města v Atlantském oceánu (López-García et al., 2007), nepředpokládalo se, že by se zde skrývala rozsáhlejší diverzita. Až studie Lary et al. (2009) odhalila dříve nepozorovanou rozmanitost Diplonemea.

Sekvence získané převážně z hlubokomořských oblastí, ale také několik sekvencí z povrchových vod vytvářejí tři dobře podpořené klady. Jeden sdružuje sekvence z kultivovatelných zástupců *Diplonema* a *Rhynchopus* spolu s příbuznými environmentálními sekvencemi. Další dva klady se skládají pouze z environmentálních sekvencí a nazývají se hlubokomořská pelagická Diplonemida neboli DSPD I a II (Lara et al., 2009). Podle Lary et al. (2009) existují dvě možné fylogenetické uspořádání těchto kladů, obě s podobnou podporou. První umisťuje DSPD II na bázi větve tvořené DSPS I a skupinou sekvencí kolem *Diplonema* a *Rhynchopus*. Druhou možností je sdružení obou DSPD do jedné větve.

Přítomnost kladů v různě vzdálených a oddělených míst mořského systému naznačuje, že jsou Diplonemea široce rozšířená. Jelikož environmentální sekvence pocházejí převážně z větších hloubek zdá se, že Diplonemea obývají spíše hlubokomořská prostředí (Lara et al., 2009). I když by se rovněž mohlo jednat o kontaminaci z vyšších vrstev. Přesto je rozmístění jednotlivých kladů trochu odlišné.

Sekvence sdružené s *Diplonema* a *Rhynchopus* obývají především mořské dno (Lara et al., 2009). To by mohlo být zapříčiněné bentickým způsobem života. DSPD I a II jsou na rozdíl od předchozího kladu planktonní a pohybují se mezi různými hloubkami vodního sloupce. Obývání větších hloubek může být důsledkem nefototrofního životního stylu Diplonemea. Nepotřebují takovou intenzitu světla a v boji o prostor mohla tedy bez problémů ustoupit do nižších míst. Může to také odrážet výskyt jejich kořisti či hostitelů.

10. Opisthokonta

Říše Opisthokonta zahrnuje dvě hlavní skupiny: Metazoa a Fungi. Navíc však obsahuje několik dalších jednobuněčných linií. Spadají sem také dobře známá Choanoflagellata, linie fylogeneticky nejbližší živočichům, a parazitická Ichthyosporea.

Typickými znaky choanoflagellát jsou buňky vejcovitého tvaru a límec obklopující bičík. Některé druhy navíc tvoří složité schránky. Zástupci nemají chloroplasty a žijí jak v sladkovodním, tak v mořském prostředí. Choanoflagellata celkem zahrnují asi 50 rodů a skládají se ze dvou sesterských větví Acanthoecida a Craspedida, které dohromady vytvářejí 13 kladů A-M (del Campo a Massana, 2011; Weber et al., 2012). Klady C a L přitom obsahují sekvence pocházející pouze ze sladkovodního prostředí, zatímco ostatní jsou čistě mořské. Některé klady zahrnují známé druhy, jiné seskupují pouze environmentální sekvence. K celému choanoflagelátímu uskupení se sestersky větví linie složena z mořských opisthokont MAOP 1, MAOP 2 a rodu *Corallochytrium* (del Campo a Ruiz-Trillo, 2013). MAOP 1 a 2 by mohly reprezentovat úplně nové linie opisthokont.

Jednobuněční parazité Ichthyosporea napadají vodní obratlovce i bezobratlé. Studie del Campa a Ruiz-Trilla (2013) založená na analýze 18S ribozomálních genů však ukázala, že řada linií zahrnuje mimo jiné značné množství sekvencí získaných z prostředí. Zkoumání také odhalilo dvě čistě environmentální skupiny (del Campo a Ruiz-Trillo, 2013). Jedna je sladkovodního původu a byla pojmenována FRESHIP 1 neboli sladkovodní Ichthyosporea. Druhá, jak plyne z názvu mořská Ichthyosporea (MAIP 1), obsahuje výhradně mořské sekvence.

11. Extrémní prostředí obývaná eukaryoty

Eukaryotické organismy žijí snad ve všech typech prostředí, která se na Zemi vyskytují. Není tedy překvapením, že řada buněk či pouze sekvencí byla získaná i z poměrně extrémních oblastí. Eukaryota obývají nejen hlubokomořské habitaty, ale rovněž vody s vyšší mírou salinity, nízkým pH či obsahem těžkých kovů. K životu v těchto podmínkách je nezbytná celá řada adaptací. Někteří využívají okolních bakterií se specifickým metabolismem. Jiní sázejí spíše sami na sebe a tvoří nejrůznější odolná stádia a ochranné struktury.

11.1. Hypersalinní a kyselé podmínky

Za hypersalinní prostředí jsou obecně považovány vody s vyšší koncentrací solí než je tomu u oceánu a moří. V extrémních případech může obsah solí vzrůst až na 30%. Na tyto podmínky je schopno se přizpůsobit pouze malé množství eukaryot. To potvrzuje skutečnost, že z hypersalinních oblastí bylo získáno jen malé množství eukaryotických environmentálních sekvencí. Několik organismů zde nicméně přežívá. Mořské habitaty, především hypersalinní kotliny, skrývají řadu nálevníků, mořských Stramenopiles (MAST), mořských alveolát (MALV) a v malé míře také sekvence dalších skupin (Alexander et al., 2009). Zde získaná DNA by ale mohla pocházet z organismů z menších hloubek, které po odumření klesají ke dnu. Ve slaných jezerech byly nalezeny hlavně sekvence příbuzné k Viridiplantae a alveolátům, objevují se zde však i sekvence spadající ke stramenopilům, rhizáriím a opisthokontům (Triadó-Margarit a Casamayor, 2013).

Dalším extrémem jsou vody s velmi nízkým pH. Některé řeky, jezera či malé tůňky mají kyselou vodu často se zvýšeným obsahem těžkých kovů. Mohlo by se zdát, že v takovém prostředí život nepřetrvává, opak je však pravdou. Vyskytuje se zde řada autotrofních řas, které vytvářejí rozsáhlé květní plochy na hladině. Nechybí tu ale ani zástupci nálevníků či hub. Vůbec nejrozšířenější formou jsou nicméně améby. Zdá se, že přizpůsobení kyselým podmínkám je mnohem snadnější, než se původně myslelo (Zettler et al., 2002).

11.2. Anoxické prostředí

Ve velkých mořských hloubkách se kvůli nedostatku světla nevyskytují žádné fotosyntetické formy, tudíž je zde nouze o kyslík. I toto zdánlivě nevlídné prostředí může být však domovem řady druhů. Mezi sekvencemi získanými z tohoto prostředí se nachází někteří typičtí hlubokomořští zástupci skupin Stramenopiles, Radiolaria, Diplonemea, z alveolát potom především Ciliophora, Dinoflagellata a MALV, dále amoebozoální rod *Vannella* a spoustu dalších (Sauvadet et al., 2010; Zuendorf et al., 2006). Do hlubokomořských sedimentů se přitom ukládá velké množství odumřelých organismů a jejich částí z vyšších vrstev. Sekvence organismů, které v tomto prostředí žijí, se z tak velkého počtu sekvencí obtížně extrahují. Některé sekvence považované za anaerobní tedy s největší pravděpodobností pocházejí z DNA organismů, které žijí v menších hloubkách a po odumření klesly na dno. To je velký problém některých studií interpretujících data pocházející z hlubokomořských prostředí. Možnost kontaminace by měla být vždy zohledněna.

11.3. Hydrotermální vývěry

Okolí hydrotermálních vývěrů je velmi specifické prostředí. Z podmořských komínů vyvěrá proud horké vody s obsahem sulfanu, methanu a dalších látek. Voda v okolí vývěrů je o tyto látky obohacena. Organismy, které zde žijí, tak musí čelit vysokým teplotám, toxickým látkám a nízkému obsahu kyslíku. Ačkoli se může zdát toto prostředí nehostinné, žije zde velké množství živočichů i řada protist. Úspěšné

jsou především bakterie využívající methan a sulfan jako zdroj pro metabolismus. Z větších živočichů tu přežívají mlži a riftie.

Většina zde se vyskytujících eukaryot se nachází i jinde v hlubokomořských ekosystémech. Patří mezi ně stramenopilní rody *Cafeteria* a *Caecitellus*, které jsou schopny tolerovat vyšší koncentrace methanu a sulfanu (Sauvadet et al., 2010). Dále se zde nachází množství zástupců z řad Ciliophora, Radiolaria, Cerkozoa, exkavátní Heterolobozea, Euglenozoa, Apikomplexa, MALV I a II i MAST (López-García et al., 2007; Takishita et al., 2007). Z mořských stramenopilních skupin je zde hojný především MAST-9 a 12. Tyto dvě skupiny byly detekovány především v okolí hlubokomořských průsaků. Bylo zde taky objeveno několik sekvencí patřící k houbám (Sauvadet et al., 2010) a k zástupcům kmene Perkinsozoa, kteří parazitují na mlžích a jiných protistech (Moreira a López-García, 2003).

Skutečnost, že z tohoto prostředí byly izolovány sekvence zelených řas a dalších fotosyntetických organismů mohou vyvolat otázku, jak se tyto organismy bez světla uživí. S největší pravděpodobností pocházejí ze zbytků odumřelých tkání či vytrvalých cyst, které klesají ke dnu. Samotní jedinci se však v oblastech nevyskytují. Naproti tomu se zde nachází také sekvence, které nejsou příbuzné k žádné dosud známé skupině a neobjevují se nikde jinde. V tomto případě se jedná pravděpodobně o sekvence pocházející z anaerobních obyvatel okolí vývěrů (Takishita et al., 2007).

11.4. Plášťová dutina a tkáň hlubokomořských mlžů

Zvláštním typem hlubokomořského mikrohabitatu jsou mlži obývající okolí hydrotermálních vývěrů. Mezi nejčastěji zde se vyskytující zástupce patří rody *Bathymodiolus* a *Calyptogena*. Adaptace mlžů na extrémní podmínky spočívá v přítomnosti symbiotických bakterií, které jsou schopné oxidovat sulfan či methan na snadněji zpracovatelné sloučeniny. Tyto bakterie se nacházejí v plášťové dutině lastur a uvnitř specializovaných buněk, tzv. bakteriocytů. Rezervoáry bakterií poskytují ideální prostředí dalším organismům především z řad protist. Ty využívají nejenom produkty bakterií, ale živí se i bakteriemi samotnými. Eukaryotické organismy žijící v těchto zvláštních prostorách mohou být však nejenom bakteriofágy, ale mohou žít rovněž symbiotickým nebo dokonce parazitickým způsobem života (Sauvadet et al., 2010).

Celkem byly zatím objeveny tři protistní komunity izolované z plášťových dutin mlžů z určitých oblastí. První je asociována s atlantickými hydrotermálními mlži, druhá s pacifickými a poslední je vázaná na mlže z oblastí studených průsaků (Sauvadet et al., 2010). Sekvence izolované z plášťových dutin spadají především k rozsivkám, nálevníkům a Syndiniales skupině II. Byly zde ale nalezeny i sekvence příbuzné k suchozemským rostlinám a houbám, což ukazuje na vysokou schopnost šíření semen a spor (Sauvadet et al., 2010). Syndiniální sekvence můžou pocházet buď z ostatních protist, nebo se může jednat o parazity mlžů samotných. To by poukazovalo na úplně novou skupinu parazitických Syndiniales.

V plášťové tekutině mlžů bylo mikroskopicky pozorováno také několik neznámých bičíkovců celé řady morfotypů (Sauvadet et al., 2010). Někteří měli velké množství dlouhých tenkých bičíků

shlukujících se v jedné části buňky, jiní vykazovali spíše heterokontní uspořádání bičíků. Buňky byly také nejrůznějších tvarů od kulovitých po oválné či hruškovité. Mohlo by se jednat o endokomenzály mlžů. Žádné další informace však o těchto organismech nejsou známy.

Bakteriocyty, zvláštní komůrky pro symbiotické bakterie, jsou umístěny různě po těle svých nositelů. Noguchi et al. (2013) vyšetřovali žaberní tkáň mlžů ze zálivu Sagami na východním pobřeží Japonska. Z tkáně získali sekvence nazvané CABP-1 větvící se mezi Syndiniales. Opět by se mohlo jednat o parazitické zástupce, jak je pro Syndiniales typické. Nicméně nemůže být vyloučena ani možnost, že jsou to endokomenzálové mlžů živící se symbiotickými bakteriemi nebo jejich produkty. CABP-1 nebyly dosud detekovány v žádném jiném prostředí. To by mohlo znamenat, že nemají volně žijící formy nebo že se v prostředí vyskytují jen ve velmi malém množství. Další analýzy podobného zaměření jsou nezbytné pro podrobnější charakterizaci této nové skupiny.

12. Závěr

Metoda environmentálního sekvenování v minulosti odhalila novou cestu zkoumání přírodní rozmanitosti. Umožnila získání potřebných dat přímo z prostředí a přinesla nový pohled na eukaryotickou diverzitu. Původní skupiny protistních organismů byly obohaceny o úplně nové linie a fylogenetické stromy se následně rychle rozrostly.

Dnes je použití kultivačně nezávislých metod běžnou záležitostí. Neustále se generují velké sady dat, které jsou průběžně analyzovány. Kromě toho dochází ke zdokonalování používaných přístupů. Rozšiřují se postupy, jak účinně ze studií odstranit nechtěné chimérické sekvence a pseudogeny a optimalizují se podmínky PCR reakce. Rozrůstá se využití metagenomiky, molekulární metody s výhodou vynechání PCR kroků. Ačkoli dnes přístupy environmentálního sekvenování přinášejí velké množství nových poznatků a informací, mnoho zůstává zatím neodkryto a skutečná diverzita organismů není zdaleka kompletně prozkoumána.

V budoucnosti se mohou objevit další fakta, která dnešní obraz příbuzenských vztahů mezi organismy pozmění. Studie by se přitom měly zaměřit především na prostředí, která nejsou tolik prozkoumána. Málo sekvencí pochází z hypersalinních vod či z půdních vzorků. Také by mohly být kultivačně nezávislé analýzy použity k bližšímu prostudování suchozemských míst a mikrohabitatů, jako jsou vlhké zdi, střechy domů, dočasné kaluže, sněhový pokryv, jeskyně nebo okolí sopek. I tyto plochy mohou ukrývat značnou diverzitu.

Seznam použité literatury

Alexander E., Stock A., Breiner H.-W., Behnke A., Bunge J., Yakimov M.M., & Stoeck T. (2009) Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin. *Environmental microbiology*, 11, 360–81.

Bass D. & Cavalier-Smith T. (2004) Phylum-specific environmental DNA analysis reveals remarkably high global biodiversity of Cercozoa (Protozoa). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54, 2393–404.

Bråte J., Krabberød A.K., Dolven J.K., Ose R.F., Kristensen T., Bjørklund K.R., & Shalchian-Tabrizi K. (2012) Radiolaria associated with large diversity of marine alveolates. *Protist*, 163, 767–77.

Burki F., Okamoto N., Pombert J.-F., & Keeling P.J. (2012) The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 279, 2246–54.

Del Campo J. & Massana R. (2011) Emerging diversity within chrysophytes, choanoflagellates and bicosoecids based on molecular surveys. *Protist*, 162, 435–48.

Del Campo J. & Ruiz-Trillo I. (2013) Environmental survey meta-analysis reveals hidden diversity among unicellular opisthokonts. *Molecular biology and evolution*, 30, 802–5.

Cavalier-Smith T. & von der Heyden S. (2007) Molecular phylogeny, scale evolution and taxonomy of centrohelid heliozoa. *Molecular phylogenetics and evolution*, 44, 1186–203.

Cavalier-Smith T. & Scoble J.M. (2013) Phylogeny of Heterokonta: Incisomonas marina, a uniciliate gliding opalozoan related to Solenicola (Nanomonadea), and evidence that Actinophryida evolved from raphidophytes. *European journal of protistology*, 49, 328–53.

Countway P.D., Gast R.J., Dennett M.R., Savai P., Rose J.M., & Caron D.A. (2007) Distinct protistan assemblages characterize the euphotic zone and deep sea (2500 m) of the western North Atlantic (Sargasso Sea and Gulf Stream). *Environmental microbiology*, 9, 1219–32.

Díez B., Pedrós-Alió C., & Massana R. (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and environmental microbiology*, 67, 2932–41.

Dolven J.K., Lindqvist C., Albert V.A., Bjørklund K.R., Yuasa T., Takahashi O., & Mayama S. (2007) Molecular diversity of alveolates associated with neritic north atlantic radiolarians. *Protist*, 158, 65–76.

Fawley M.W., Yun Y., & Qin M. (2001) Phylogenetic analyses of 18s rdna sequences reveal a new coccoid lineage of the prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36, 387–393.

Gómez F., Moreira D., Benzerara K., & López-García P. (2011) Solenicola setigera is the first characterized member of the abundant and cosmopolitan uncultured marine stramenopile group MAST-3. *Environmental microbiology*, 13, 193–202.

Groisillier A., Massana R., Valentin K., Vaulot D., & Guillou L. (2006) Genetic diversity and habitats of two enigmatic marine alveolate lineages. *Aquatic Microbial Ecology*, 42, 277–291.

Guillou L., Eikrem W., Chrétiennot-Dinet M.-J., Le Gall F., Massana R., Romari K., Pedrós-Alió C., & Vaulot D. (2004) Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist*, 155, 193–214.

Guillou L., Viprey M., Chambouvet A., Welsh R.M., Kirkham A.R., Massana R., Scanlan D.J., & Worden A.Z. (2008) Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Environmental microbiology*, 10, 3349–65.

Holzmann M., Habura A., Giles H., Bowser S.S., & Pawlowski J. (2003) Freshwater Foraminiferans Revealed by Analysis of Environmental DNA Samples. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, 135–139.

Janouškovec J., Horák A., Barott K.L., Rohwer F.L., & Keeling P.J. (2012) Global analysis of plastid diversity reveals apicomplexan-related lineages in coral reefs. *Current biology : CB*, 22, R518–9.

Janouškovec J., Horák A., Barott K.L., Rohwer F.L., & Keeling P.J. (2013) Environmental distribution of coral-associated relatives of apicomplexan parasites. *The ISME journal*, 7, 444–7.

Kim S., Park M.G., Kim K.-Y., Kim C.-H., Yih W., Park J.S., & Coats D.W. (2008) Genetic diversity of parasitic dinoflagellates in the genus amoebophrya and its relationship to parasite biology and biogeography. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 55, 1–8.

Kitahara K. & Miyazaki K. (2013) Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. *Mobile genetic elements*, 3, e24210.

Kolodziej K. & Stoeck T. (2007) Cellular identification of a novel uncultured marine stramenopile (MAST-12 Clade) small-subunit rRNA gene sequence from a norwegian estuary by use of fluorescence in situ hybridization-scanning electron microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 73, 2718–26.

Lara E., Moreira D., Vereshchaka A., & López-García P. (2009) Pan-oceanic distribution of new highly diverse clades of deep-sea diplonemids. *Environmental microbiology*, 11, 47–55.

Lecroq B., Lejzerowicz F., Bachar D., Christen R., Esling P., Baerlocher L., Østerås M., Farinelli L., & Pawlowski J. (2011) Ultra-deep sequencing of foraminiferal microbarcodes unveils hidden richness of early monothalamous lineages in deep-sea sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13177–82.

Lejzerowicz F., Pawlowski J., Fraissinet-Tachet L., & Marmeisse R. (2010) Molecular evidence for widespread occurrence of Foraminifera in soils. *Environmental microbiology*, 12, 2518–26.

Lepère C., Vaulot D., & Scanlan D.J. (2009) Photosynthetic picoeukaryote community structure in the South East Pacific Ocean encompassing the most oligotrophic waters on Earth. *Environmental microbiology*, 11, 3105–17.

Logares R., Audic S., Santini S., Pernice M.C., de Vargas C., & Massana R. (2012) Diversity patterns and activity of uncultured marine heterotrophic flagellates unveiled with pyrosequencing. *The ISME journal*, 6, 1823–33.

López-García P., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C., & Moreira D. (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 409, 603–7.

López-García P., Vereshchaka A., & Moreira D. (2007) Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environmental microbiology*, 9, 546–54.

Lovejoy C., Vincent W.F., Bonilla S., Roy S., Martineau M.-J., Terrado R., Potvin M., Massana R., & Pedrós-Alió C. (2007) Distribution, Phylogeny, and Growth of Cold-Adapted Picoprasinophytes in Arctic Seas. *Journal of Phycology*, 43, 78–89.

Man-Aharonovich D., Philosof A., Kirkup B.C., Le Gall F., Yogev T., Berman-Frank I., Polz M.F., Vaulot D., & Béjà O. (2010) Diversity of active marine picoeukaryotes in the Eastern Mediterranean Sea unveiled using photosystem-II psbA transcripts. *The ISME journal*, 4, 1044–52.

Marie D., Zhu F., Balagué V., Ras J., & Vaulot D. (2006) Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). *FEMS microbiology ecology*, 55, 403–15.

Massana R., Castresana J., Balagué V., Guillou L., Romari K., Groisillier A., Valentin K., & Pedrós-Alió C. (2004) Phylogenetic and ecological analysis of novel marine stramenopiles. *Applied and environmental microbiology*, 70, 3528–34.

Massana R., Terrado R., Forn I., Lovejoy C., & Pedrós-Alió C. (2006) Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. *Environmental microbiology*, 8, 1515–22.

Massana R., Karniol B., Pommier T., Bodaker I., & Béjà O. (2008) Metagenomic retrieval of a ribosomal DNA repeat array from an uncultured marine alveolate. *Environmental microbiology*, 10, 1335–43.

Massana R., Unrein F., Rodríguez-Martínez R., Forn I., Lefort T., Pinhassi J., & Not F. (2009) Grazing rates and functional diversity of uncultured heterotrophic flagellates. *The ISME journal*, 3, 588–96.

*Massana R. (2011) Eukaryotic picoplankton in surface oceans. *Annual review of microbiology*, 65, 91–110.

Moreira D. & López-García P. (2003) Are hydrothermal vents oases for parasitic protists? *Trends in parasitology*, 19, 556–8.

Moreira D. & López-García P. (2014) The rise and fall of Picobiliphytes: How assumed autotrophs turned out to be heterotrophs. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*.

Noguchi F., Kawato M., Yoshida T., Fujiwara Y., Fujikura K., & Takishita K. (2013) A novel alveolate in bivalves with chemosynthetic bacteria inhabiting deep-sea methane seeps. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 60, 158–65.

Not F., Gausling R., Azam F., Heidelberg J.F., & Worden A.Z. (2007a) Vertical distribution of picoeukaryotic diversity in the Sargasso Sea. *Environmental microbiology*, 9, 1233–52.

Not F., Valentin K., Romari K., Lovejoy C., Massana R., Töbe K., Vaulot D., & Medlin L.K. (2007b) Picobiliphytes: a marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315, 253–5.

Not F., del Campo J., Balagué V., de Vargas C., & Massana R. (2009) New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. *PloS one*, 4, e7143.

Pawlowski J., Fontaine D., da Silva A.A., & Guiard J. (2011) Novel lineages of Southern Ocean deep-sea foraminifera revealed by environmental DNA sequencing. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58, 1996–2003.

Piwosz K. & Pernthaler J. (2010) Seasonal population dynamics and trophic role of planktonic nanoflagellates in coastal surface waters of the Southern Baltic Sea. *Environmental microbiology*, 12, 364–77.

Potvin M. & Lovejoy C. PCR-based diversity estimates of artificial and environmental 18S rRNA gene libraries. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 56, 174–81.

Raven J. A. (2012) Algal biogeography: metagenomics shows distribution of a picoplanktonic pelagophyte. *Current biology : CB*, 22, R682–3.

Rodríguez F., Derelle E., Guillou L., Le Gall F., Vaulot D., & Moreau H. (2005) Ecotype diversity in the marine picoeukaryote Ostreococcus (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environmental microbiology*, 7, 853–9.

Rodríguez-Martínez R., Rocap G., Logares R., Romac S., & Massana R. (2012) Low evolutionary diversification in a widespread and abundant uncultured protist (MAST-4). *Molecular biology and evolution*, 29, 1393–406.

Sauvadet A.-L., Gobet A., & Guillou L. (2010) Comparative analysis between protist communities from the deep-sea pelagic ecosystem and specific deep hydrothermal habitats. *Environmental microbiology*, 12, 2946–64.

Seenivasan R., Sausen N., Medlin L.K., & Melkonian M. (2013) Picomonas judraskeda gen. et sp. nov.: the first identified member of the Picozoa phylum nov., a widespread group of picoeukaryotes, formerly known as "picobiliphytes". *PloS one*, 8, e59565.

Shalchian-Tabrizi K., Eikrem W., Klaveness D., Vaulot D., Minge M.A., Le Gall F., Romari K., Throndsen J., Botnen A., Massana R., Thomsen H.A., & Jakobsen K.S. (2006) Telonemia, a new protist phylum with affinity to chromist lineages. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273, 1833–42.

Shi X.L., Marie D., Jardillier L., Scanlan D.J., & Vaulot D. (2009) Groups without cultured representatives dominate eukaryotic picophytoplankton in the oligotrophic South East Pacific Ocean. *PloS one*, 4, e7657.

Shi X.L., Lepère C., Scanlan D.J., & Vaulot D. (2011) Plastid 16S rRNA gene diversity among eukaryotic picophytoplankton sorted by flow cytometry from the South Pacific Ocean. *PloS one*, 6, e18979.

Skovgaard A., Meneses I., & Angélico M.M. (2009) Identifying the lethal fish egg parasite Ichthyodinium chabelardi as a member of Marine Alveolate Group I. *Environmental microbiology*, 11, 2030–41.

Stoeck T. & Epstein S. (2003a) Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Applied and environmental microbiology*, 69, 2657–63.

Stoeck T., Taylor G.T., & Epstein S.S. (2003b) Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Applied and environmental microbiology*, 69, 5656–63.

Stoeck T., Zuendorf A., Breiner H.-W., & Behnke A. (2007) A molecular approach to identify active microbes in environmental eukaryote clone libraries. *Microbial ecology*, 53, 328–39.

Šlapeta J., Moreira D., & López-García P. (2005) The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 272, 2073–81.

Takishita K., Yubuki N., Kakizoe N., Inagaki Y., & Maruyama T. (2007) Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 11, 563–76.

Thornhill D.J., Lajeunesse T.C., & Santos S.R. (2007) Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Molecular ecology*, 16, 5326–40.

Triadó-Margarit X. & Casamayor E.O. (2013) High genetic diversity and novelty in planktonic protists inhabiting inland and coastal high salinity water bodies. *FEMS microbiology ecology*, 85, 27–36.

*Vaulot D., Eikrem W., Viprey M., & Moreau H. (2008) The diversity of small eukaryotic phytoplankton (< or =3 microm) in marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 32, 795–820.

Viprey M., Guillou L., Ferréol M., & Vaulot D. (2008) Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environmental microbiology*, 10, 1804–22.

Weber F., del Campo J., Wylezich C., Massana R., & Jürgens K. (2012) Unveiling trophic functions of uncultured protist taxa by incubation experiments in the brackish Baltic Sea. *PloS one*, 7, e41970.

Worden A.Z., Janouskovec J., McRose D., Engman A., Welsh R.M., Malfatti S., Tringe S.G., & Keeling P.J. (2012) Global distribution of a wild alga revealed by targeted metagenomics. *Current biology : CB*, 22, R675–7.

Yabuki A., Toyofuku T., & Takishita K. (2014) Lateral transfer of eukaryotic ribosomal RNA genes: an emerging concern for molecular ecology of microbial eukaryotes. *The ISME journal* .

Yoon H.S., Price D.C., Stepanauskas R., Rajah V.D., Sieracki M.E., Wilson W.H., Yang E.C., Duffy S., & Bhattacharya D. (2011) Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science (New York, N.Y.)*, 332, 714–7.

Zettler L.A.A., Gómez F., Zettler E., & Keenan B.G. (2002) Eukaryotic diversity in Spain' s River of Fire.

Zuendorf A., Bunge J., Behnke A., Barger K.J.-A., & Stoeck T. (2006) Diversity estimates of microeukaryotes below the chemocline of the anoxic Mariager Fjord, Denmark. *FEMS microbiology ecology*, 58, 476–91.

Pozn.: * označuje review