Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie

Jiří Lukeš

Studium velikosti genomu u protist
Genom Size Estimation in Protists

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Dora Čertnerová

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 8. 6. 2020

Podpis:

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval především své vedoucí bakalářské práce Mgr. Dorce Čertnerové za všestrannou pomoc, množství cenných rad, podnětů, doporučení, připomínek a zároveň za velkou trpělivost a ochotu při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce. Dále bych rád poděkoval svým rodičům a přítelkyni Karolíně, kteří mě vytrvale podporovali a motivovali při studiu.

Abstrakt:

Tato bakalářská práce představuje současné poznání velikosti genomu u protist se zaměřením na popis a srovnání jednotlivých metod, které byly k řešení dané problematiky použité. Velikost genomu je znak charakteristický pro všechny živé organismy a zmíněny jsou i další fyziologické znaky, které s velikostí genomu souvisí. Z metod je největší důraz kladen na průtokovou cytometrii, která je považována za spolehlivou a v současnosti poskytuje nejvíce dat o velikosti protistních genomů. Krom průtokové cytometrie je zmíněn přínos celogenomového sekvenování k poznání velikosti protistních genomů. Problémy se stanovením velikosti protistních genomů pak vyplývají z heterogenity protist jako studované skupiny a z nesjednocených postupů v rámci jednotlivých metod, které ztěžují případné porovnávání. Protista jsou v rámci práce hodnocené jako nedostatečně prostudovaná skupina, v rámci, které variuje velikost genomu přibližně 200 000×. V závěru práce je věnován prostor pro popis současných poznatků o velikosti genomu relativně prostudovaných skupin portist.

Klíčová slova: velikost genomu, C-hodnota, protista, průtoková cytometrie, celogenomové sekvenování, pulzní gelová elektroforéza, Feulgenova denzitometrie, mikrospektrofotometrie

Abstract:

This bachelor's thesis presents the current knowledge of the size of the genome in protists with a focus on the description and comparison of individual methods that were used to solve this issue. Genome size is a characteristic trait of all living organisms and other physiological features related to genome size are also mentioned. Of the selected methods, the greatest emphasis is placed on the flow cytometry, which is considered reliable and currently provides the most data on the size of protist genomes. In addition to flow cytometry, the contribution of whole genome sequencing to understanding the size of protist genomes is mentioned. Problems with estimating the size of protist genomes results from the heterogeneity of protists as a study group and from the non-uniform procedures within individual methods, which make possible comparisons difficult. Protists are evaluated in the work as an insufficiently studied group, within which the size of the genome varies by approximately 200,000×. The conclusion of the thesis summarizes the current knowledge about the genome size of relatively studied groups of protists.

Key Words: Genome size, C-value, Protists, Flow cytometry, whole-genome sequencing, pulsed field gel electrophoresis, Feulgen densitometry, microspectrophotometry

Seznam použitých zkratek

DNA = deoxyribonukleová kyselina

RNA = ribonukleová kyselina

PI = propidium jodid

EB = ethidium bromid

DAPI = 4′,6-Diamidin-2-fenylindol

EDTA = ethylendiamintetraoctová kyselina

HEPES = 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

Tris = Trisaminomethan

MOPS = 3-(N-morfolino)propansukfonová kyselina

PFGE = pulzní gelová elektroforéza

OLC = overlap/layout/consensus

Obsah

1 Úvod 1
2 Velikost genomu 2
3 Protista jako modelová skupin 3
4 Metody výzkumu velikosti genomu 5
4.1 Průtoková cytometrie 5
4.1.1 Výběr a příprava materiálu 5
4.1.2 Fixace vzorků 6
4.1.3 Izolace jader 7
4.1.4 Izolační pufry 7
4.1.5 Sekundární metabolity 8
4.1.6 Barvení DNA 8
4.1.7 Výběr standardu 9
4.1.8 Analýza vzorku 10
4.1.9 Stanovení velikosti genomu 11
4.2 Mikrospektrofotometrie 12
4.3 Feulgenova denzitometrie 13
4.4 Celogenomové sekvenování 14
4.4.1 Izolace DNA a příprava knihovny 14
4.4.2 Sekvenování 15
4.4.3 Sestavení genomu 16
4.4.4 Sekvenační projekty protist 17
4.5 Pulzní gelová elektroforéza 18
4.5.1 Příprava vzorků pro PFGE 18
4.5.2 Podmínky běhu elektroforézy 19
4.5.3 Velikostní markery 20
4.5.4 Shrnutí užití PFGE v rámci protist 20
4.6 Ostatní metody 21
4.6.1 Kvantitativní real-time -PCR 22
4.6.2 Reasociační kinetika 22
4.6.3 Difenylaminová reakce 23
4.6.4 Diaminobenzoová reakce 23
5 Velikost genomu u protist 24
5.1 Studované taxony 25
5.1.1 Rozsivky 25

5.1.2 Krásivky 25
5.1.3 Obrněnky 25
5.1.4 Haptofyta 26
5.1.5 Ostatní 26
5.2 Souvislosti s fyziologickými vlastnostmi protisty 26
6 Závěr 27
7 Seznam použité literatury 29

1 Úvod

Vědecká společnost se velikostí genomu, charakteristickému znaku pro všechny živé organismy, zabývá již 70 let (Swift, 1950). Za tu dobu byla popsána řada fyziologických parametrů, které s velikostí genomu nějak souvisí jako například velikost buněk či rychlost buněčného dělení. Tyto parametry mohou mít velký dopad na ekologii organismu (Beaton and Cavalier-Smith, 1999; Gregory, 2001). Za dobu studia tohoto fenoménu bylo dosaženo relativně širokého poznání o velikosti genomu u rostlin a živočichů (Gregory, 2005). Ve srovnání s tím, popisují studie o velikosti genomu v rámci protist jen zlomek diverzity, která teprve čeká na odhalení. Právě protistní diverzita však dle dosavadních poznatků zahrnuje největší popsané rozmezí ve velikosti genomu 2 Mbp -680 000 Mbp (Corradi et al., 2010; Friz, 1968).

Protista představují uměle vytvořenou skupinu, zahrnující jednobuněčná eukaryota. Jedná se tak o velice různorodou skupinu organismů, kde jednotlivé linie vyžadují rozdílné přístupy. Jednobuněčnost protist vyplývající z jejich definice, je tedy jedním z mála problémů, který lze zobecnit (Simpson and Eglit, 2016; Cavalier-Smith, 1980). Cílem této práce je tedy popsat úskalí spojená se studiem jednobuněčných eukaryot a zároveň představit současné poznatky o velikosti genomu ve skupinách, v rámci, kterých byl obsah DNA v buňkách studován.

Pro stanovení velikosti genomu bylo od 50. let minulého století použito mnoho metod, užívajících rozdílných přístupů (Doležel and Greilhuber, 2010). V počátcích se jednalo především o cytochemické metody jako například metody reasociační kinetiky (Rawson, 1975), či stanovení obsahu DNA na základě reakcí s diaminobenzoovou kyselinou (Thomas and Farquhar 1978) nebo s dyfenilaminem(Burton, 1968). Následně započal rozvoj cytometrických metod jako Feulgenova denzitometrie nebo různé variace mikrospektrofotometrických metod (Hardie et al., 2002). Užití těchto metod však bylo utlumeno s vzestupem průtokové cytometrie, která je jako zřejmě nejvhodnější technika pro studium velikosti genomu hojně užívaná dodnes (Doležel et al., 1998). Krom těchto metod byla ke studiu velikosti genomů zapojena i modifikovaná metoda elektroforézy (Herschleb et al., 2007). Zároveň pak v současnosti veliké množství dat o velikosti genomu přinesla technika celogenomového sekvenování (Ekblom & Wolf, 2014; Sibbald & Archibald, 2017). Dalším cílem této práce je sumarizace poznatků o užití různých metod k stanovení velikosti genomu u protist a srovnání jednotlivých přístupů.

2 Velikost genomu

Velikost genomu je charakteristickým znakem pro všechny živé organismy. Přestože se vědecká pozornost několika posledních desetiletí soustředí na kvalitativní popis genomu (tj. přítomnost konkrétních alel daných genů, počet kopií jednotlivých lokusů apod.), neméně významná je i její kvantitativní stránka (Cavalier-Smith, 2005). Množství jaderné DNA je uváděna pomocí C hodnoty (Swift, 1950) a vyjadřuje velikost haploidního genomu organismu, s obvykle *n* počtem chromozomů (Greilhuber, 2005). Velikost genomu je udávána v počtu bází párů (bp, Mbp, Gbp) nebo v jednotkách hmotnosti (pg). Pro převod mezi těmito jednotkami platí, že 1 pg je přibližně roven 978 Mbp (Doležel, 2003).

Obsah DNA napříč eukaryotickou diverzitou variuje zhruba 200 000× (Gregory, 2001). Velikost genomu přitom však neodpovídá komplexitě organismu a nesouvisí s počtem protein kódujících genů (tzv. *C-value* paradox; Mirsky & Ris, 1951; Thomas, 1971). Přestože od doby popsání tohoto problému uplynulo již 50 let, stále nepanuje shoda v teorii, která by tento fenomén vysvětlovala. Gregory (2001) navrhované teorie rozdělil na teorie mutačního tlaku, které se zaměřují především na způsob akumulace nadbytečné DNA a na teorie optimální DNA, studující především korelace s fenotypovými znaky na buněčné úrovni.

Mezi teorie mutační tlaku patří teorie sobecké DNA (Doolittle & Sapienza, 1980) a teorie junk DNA (Ohno, 1972). Ty nám říkají, že velké a pomalu se dělící buňky mohou tolerovat nárůst obsahu nekódující DNA (1980; Orgel & Crick, 1980). Tento nárůst hodnoty je přitom dle zastánců teorie junk DNA (Pagel & Johnstone, 1992) způsoben kontinuálně působícím mutačním tlakem pro akumulaci DNA. Nezohledňují přitom žádný vliv selekce na velikost genomu (Beaton & Cavalier-Smith, 1999).

Teorie optimální DNA lze dle Gregory (2001) rozdělit dále na základě odůvodnění buněčných korelací na koevoluční a příčinné. Nukleoskeletální teorie zdůrazňuje koevoluci velkých genomů ve velkých buňkách, které je zapotřebí pro udržení efektivního transportu mezi jádrem a cytoplasmou (Beaton & Cavalier-Smith, 1999). Nukleotypová teorie (Gregory, 2001; Bennnett, 1971) naproti tomu přisuzuje genetické informaci tzv. nukletypovou funkci, pomocí které přímo limituje minimální velikost buňky.

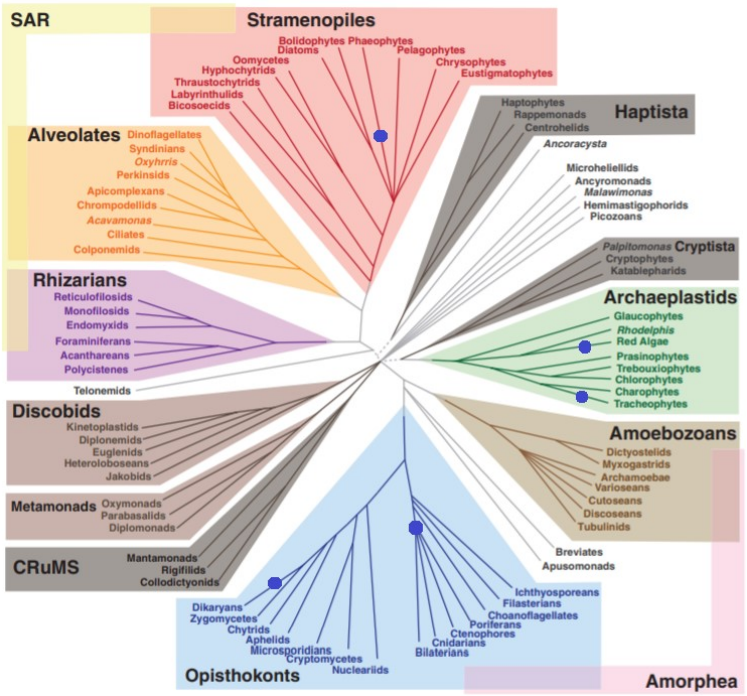
.K samotným změnám ve velikosti genomu přispívá nejčastěji polyploidizace, transponovatelné elementy a amplifikace nebo delece repetitivní DNA (Bennetzen, 2005; Kidwell, 2002). Polyploidizace je popisována jako mechanismus vedoucí ke skokovým změnám velikosti genomu. Dochází pomocí ní k zmnožení celé sady chromozomů, a proto výsledná velikost polyploidního genomu odpovídá násobku původního genomu. Důsledkem

polyploidizace se tak může i v rámci blízce příbuzných druhů velikost genomu dramaticky lišit (Wendel, 2000). Transponovatelné elementy jsou části genomu, které jsou schopné autonomně v rámci genomu měnit svou pozici a replikovat se. Dle způsobu transpozice je lze dělit na tzv. kopírovat-vložit transpozomy I. třídy (retrotranspozomy) a vystřihnout-vložit transpozomy II. třídy, které nejsou tak časté (Finnegan, 1989). Především hromadící se transpozomy I.třídy mohou být příčinou velkých genomů (Kidwell, 2002).

Kromě kódující funkce DNA je nutné zmínit i zásadní vliv množství DNA v buňce. Jako nejčastější pozitivní souvislost s velikostí genomu je uváděna velikost buněk. Právě ta pak v některých skupinách mnohobuněčných organismů ovlivňuje i velikost celého těla (Gregory, 2005). Velikost genomu byla rovněž dána do souvislosti s pravidly pro vztah mezi velikostí organismů a teplotou prostředí (Hessen et al., 2013).V rámci této práce byla však právě teplota jmenována jako faktor, který ovlivňuje možnost akumulace DNA a v důsledku čehož dochází k zvětšení objemu buňky. Dále pak byla popsána negativní korelace množství DNA s rychlostí metabolismu (Knight et al., 2005). Stejně tak byla detekována negativní korelace velikosti genomu a meitockého i mitotického dělení (Gregory, 2001; Bennett, 1972) V návaznosti na rychlost buněčného dělení byla popsána i negativní korelace velikosti genomu a rychlosti vývoje organismu (Gregory, 2005).

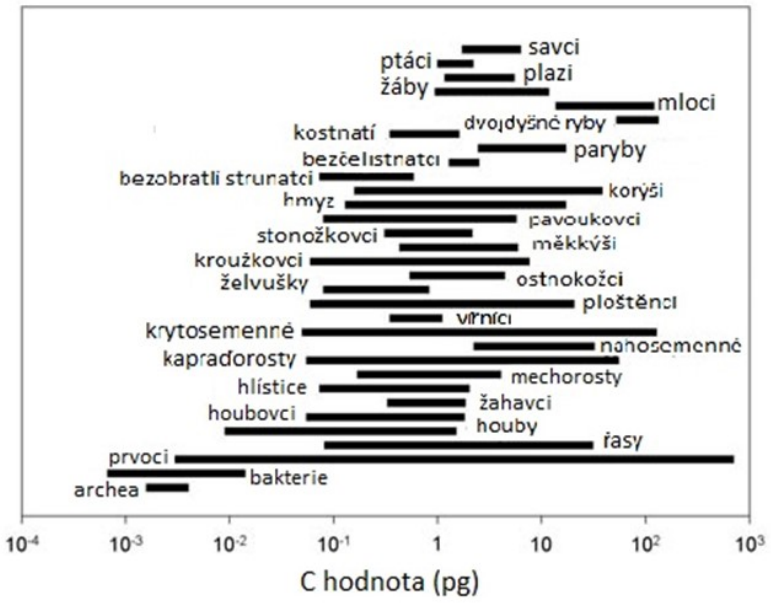
3 Protista jako modelová skupin

Protista jsou jednou z největších a nejdiverzifikovanějších skupin organismů vůbec (Obr. 1). Různorodost protist je však do velké míry daná tím, že se jedná o uměle vytvořenou skupinu, zahrnující všechna jednobuněčná eukaryota, bez ohledu na jejich fylogenetickou příslušnost. Jak již z definice vyplývá, jejich nejvýraznějším znakem oproti mnohobuněčným organismům je přítomnost zpravidla jedné buňky. Díky své jednobuněčnosti mohou protista dosahovat krátké generační doby či velkých populačních hustot (Lynch and Conery, 2003; Ribeiro et al., 2013; Simpson and Eglit, 2016),což z nich činí zajímavou modelovou skupinu pro studium nejrůznějších evolučních otázek (Cavalier-Smith, 1980). Jediná výchozí buňka protist s sebou ale nese i řadu komplikací při jejich studiu. Protista přitom vykazují obrovskou variabilitu ve velikosti genomu, od miniaturních genomů parazitických mikrosporidií s velikostí 2,3 Mbp (Corradi et al., 2010) až po améby s genomy velkými údajně až 680 000 Mbp (Friz, 1968). Tento rozsah ve velikosti genomu je dokonce největší zaznamenaný napříč všemi skupinami organismů (Obr. 2), přestože je velikost genomu u protist jen velmi málo prostudována.



Obr. 1: Fylogenetický strom eukaryot. Vše kromě modře vyznačených linií spadá do skupiny jednobuněčných eukartyot (Převzato a upraveno z Keeling & Burki, 2019)

Nedostatek dat o velikosti genomu u protist je zapříčiněn několika důvody. Vzhledem k již zmiňované jednobuněčnosti bývá jedním z nejzásadnějších problémů získání potřebného množství materiálu pro dané analýzy. Studovaný vzorek je proto nejčastěji namnožen pomocí kultivace v kultivačním médiu (Mazalová et al., 2011). Z kultur je biomasa následně odebrána nejčastěji v exponenciální fázi růstu. Ideální hustota buněk je udávána 1×10^5-10^7 buněk/ml, liší se však dle užité metody. Veliké množství materiálu je třeba zejména při průtokové cytometrii. V kontrastu s tím užití Feulgenovy denzitometrie nebo mikrospektrofotometrie vyžaduje řádu desítek až stovek buněk (Hardie et al., 2002). Výjimečně lze tento kultivační krok obejít analýzou vzorku z geneticky uniformního vodního květu (Figueroa, 2010). Další komplikace při studiu velikosti genomu protist souvisí s jejich heterogenitou. Zejména pak při izolaci DNA z buněk nebo během barvení přímo v buňkách, je třeba brát zřetel na různorodé složení buněčné stěny, či jiných povrchových struktur buněk. Konkrétně polysacharidové slizové obaly některých zelených řas, křemičité frustuly rozsivek, proteiny obsahující periplasty monád nebo silné algananové buněčné stěny eustigmatofyt mohou působit potíže při jejich studiu (Mazalová et al., 2011; Veldhuis et al., 1997; Graham et al., 2008). Dále pak sekundární metabolity přítomné v některých protistech mohou ovlivňovat přístupnost DNA pro barvení či její užití pro jiné analýzy (Voglmayr, 2007).



Obr. 2: Rozsah velikostí genomu napříč organismy s největší diverzitou v obsahu DNA patrnou u protist. (Převzato a upraveno z: Gregory, 2004).

4 Metody výzkumu velikosti genomu

4.1 Průtoková cytometrie

Nejčastěji využívanou metodou při analýze velikosti genomu u protist je průtoková cytometrie. Touto metodou lze totiž v krátkém čase analyzovat tisíce částic zkoumaného vzorku, které pak představují robustní soubor dat. Velikost genomu je tak měřena pomocí detekované intenzity fluorescenčně značené DNA vzorku (Bennett and Leitch, 1995; Galbraith et al., 1997).

4.1.1 Výběr a příprava materiálu

Pro analýzu protistních organismů průtokovou cytometrií jsou využívány buď supsenze izolovaných jader (Roxström-Lindquist et al., 2010; Mazalová et al., 2011; Read et al. 2013; Houdan et al., 2004; Standeren, 2018; Loureiro et al., 2006a), nebo přímo celé buňky (Connolly et al. 2008; Hong et al. 2016; Veldhuis et al. 1997). Druhý ze jmenovaných přístupů však vede k častým nepřesnostem měření z několika následujících důvodů. Při analýze celého protoplastu buněk je přítomna mitochondriální, v případě fotoautotrofních protist i plastidová DNA, navyšující výslednou hodnotu měření (Galbraith, 1990; Simon, 1994). Obdobně zkreslující může být i umístění jádra v buňce, případně jeho nepravidelný tvar či prostorová orientace (Galbraith, 1990). Ukázalo se například, že buňky delší jak 40 μm nebo nepravidelného tvaru nemusí projít přímo skrz zdroj excitačního světla (LaJeunesse et al., 2005). Při analýze

neporušených buněk může být výsledná velikost genomu nadhodnocena cytoplasmatickou autofluorescencí, stejně jako autofluorescencí chloroplastu (Doležel & Bartoš, 2005; Veldhuis et al., 1997). Právě však autofluorescence, chlorofylu a dalších fotosyntetických barviv, může interferovat s detekovanou fluorescencí barveného jádra. (LaJeunesse et al.,, 2005; Vaulot, 1986). Tento problém nejvíce ovlivňuje měření v případě užití propidium jodidu, jehož emisní spektrum se překrývá s emisním spektrem chlorofylu, přičemž stejný problém je u buněk barvených chromomycinem A3, které obsahují fykoerytrin (Cryptophyceae; Boucher, 1991). Dále může být výsledek ovlivněn přítomností některých sekundárních metabolitů, které mohou bránit vazbě fluorochromů k DNA (Greilhuber, 1998). Navzdory všem výše zmíněným problémům je analýza celých buněk stále hojně využívána. Jedním z hlavních důvodů jsou totiž časté komplikace při izolaci jader protist. V mnohých případech vede snaha o lýzi buněk k poškození jader, či uvolnění množství sekundárních metabolitů (Qingwei et al., 2016; Veldhuis et al., 1997; Marie et al., 2000). U rostlinného materiálu je suspenze buněk nejčastěji připravována nasekáním pletiv v lytickém pufru pomocí žiletky (Galbraith, 1983). Z živočišných buněk se k stanovení obsahu DNA používají nejčastěji červené krvinky krom savců, u nichž se používají thymocyty. Zmíněné krevní buňky lyzují při přidání hypotonického roztoku a uvolňují tak jádra (Vinogradov, 1994). V případě hub jsou používány celé buňky, nebo mechanicky či enzymaticky izolovaná jádra buněk (Kullman, 2000).

4.1.2 Fixace vzorků

Přestože je pro analýzu velikosti genomu vždy lepší použít čerstvý materiál (Doležel, et al. 1992; Greilhuber et al., 2007), ne vždy je tento postup možný. Zvlášť v případě, kdy jsou k stanovení velikosti genomu protist použity celé buňky, vzorek je obvykle fixován, aby se snížil negativní vliv protoplastů buněk (Beaton & Cavalier-Smith, 1999; LaJeunesse et al., 2005; Parrow & Burkholder, 2002; Peacock, 2014). Fixace buněk navíc dává možnost dlouhodobého skladování vzorků či jejich testování s časovým odstupem od doby získání materiálu. Při fixaci buněk někdy dochází k narušení membrány, což umožňuje následné snazší barvení vzorku (Darzynkiewicz, 2010; Galbraith, 1990). K fixaci jsou napříč studiemi užívány nejčastěji alkoholové fixativy (např. ethanol, methanol nebo aceton) méně pak nealkoholové fixativy (aldehydy; Darzynkiewicz, 2010; Voglmayr, 2007). Ve studii Parrow & Burkholder (2002) zjistili, že fixace obrněnek pomocí glutaraldehydu vede k výrazné cytoplasmatické fluorescenci a zároveň menší intenzitě fluorescence jader. Naopak paraformaldehyd vykazoval uspokojivější výsledky (Parrow & Burkholder, 2002). Při použití alkoholových fixativ dochází k vymytí autofluorescenčních pigmentů, výrazně snižující interferenci pigmentů (zejména

chlorofylu) s fluorescencí jaderného genomu s navázaným fluorochromem (LaJeunesse et al.,, 2005; Vaulot et al., 1986).

4.1.3 Izolace jader

Jak vyplývá z komplikací při stanovování obsahu DNA z celých buněk průtokovou cytometrií, vhodnějším materiálem je suspenze jader (Loureiro et al., 2006a). K tomu je však nutné nejprve lyzovat membránu buněk a v případě její přítomnosti i buněčnou stěnu (Kapraun, 2007; Marie, 2000; Voglmayr, 2007). Pro izolaci jader protist je nejčastěji využíváno tří přístupů, případně jejich kombinace. První přístup spoléhá pouze na účinky izolačního pufru (Olefeld, 2018). Druhá metoda je převzata z metodiky studií na rostlinách a spočívá v rozsekání studovaného materiálu žiletkou s přidáním izolačního pufru (Qingwei et al., 2016; Weiss et al., 2010).V třetím postupu je při rozvolňování buněčné stěny využíváno enzymů (např. lytikázy, celulázy nebo macerozymu; (Weiss, 2010; Mazalová et al., 2011; Poulíčková, 2014).

4.1.4 Izolační pufry

Zvolení vhodného izolačního pufru je pro přesné určení velikosti genomu zásadním krokem (Doležel and Bartoš, 2005).

Konkrétní látky zajišťující stabilizaci chromatinu jsou například $MgCl_2$, $MgSO_4$ nebo spermin. Další důležitou součástí jsou chelatační činidla jako citrát sodný nebo EDTA, jež chrání DNA před účinkem nukleáz a to tak, že vyvazují kofaktory nukleáz, jako jsou bivalentní ionty. Pro dosažení dostatečné iontové síly se přidávají anorganické sole jako NaCl nebo KCl. Aby se docílilo zajištění pH pufru 7,0 - 8,0, potřebné pro správné barvení fluorochromy, do pufru jsou přidávány organické pufry jako HEPES, Tris nebo MOPS. Porušení plazmatické membrány a samotnému uvolnění jader z cytoplazmy přispívají obsažené detergenty jako například Triton X-100 nebo Tween 20. Ty mohou zároveň zajistit rozrušení chloroplastů a zabránit agregaci jader či cytoplazmatických zbytků. Mezi další přidávané komponenty izolačních roztoků lze uvést redukční činidla jako β-merkaptoethanol nebo dithiothreitol, které zachovávají proteiny chromatinu a zabraňují přítomným fenolickým látkám v interferenci barvení DNA (Jaroslav Doležel & Bartoš, 2005; João Loureiro 2006a). V některých případech je do pufru přidávána sacharóza nebo sorbitol k udržování izotonického prostředí (Greilhuber, 2007).

Dle údajů FLOWer database existuje až 28 izolačních roztoků (Loureiro, 2008). Pro vzorky haptofyt je nejčastěji používán izolační pufr obsahující 30 mM $MgCl_2$, 20 mM citrát sodný, 125 mM sorbitol, 55 m M HEPES, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 a 0,5 µl/ml β-

merkaptoethanol, nebo také $MgSO_4$ pufr (Read et al., 2013; Houdan et al., 2004; Vaulot et al., 1994; Medlin et al., 1996; Standeren, 2018). Pro chlorofytní řasy a obrněnky byl využit tzv. Galbraithův izolační pufr (Qingwei et al., 2016; Weiss et al., 2010). Jádra obrněnek byla v některých případech izolována pomocí tzv. McIlvainova pufru (Whiteley, 1993). K přípravě jader zlativek byl použit tzv. Ottova pufru (Olefeld, 2018) a k přípravě vzorků streptofytních řas pak izolační pufr LB01 (Mazalová et al., 2011; Poulíčková et al., 2014). Pro analýzu velikosti genomu metamonád byl použit Tris-$MgCl_2$ pufr (Bernander, 2001; Roxström-Lindquist, 2010)

4.1.5 Sekundární metabolity

Složení buněk je důležitým parametrem, který ovlivňovňuje kvalitu měření. Přítomnost sekundárních metabolitů, může vést k nestechiometrickému barvení DNA, jež vede k chybnému stanovení velikosti genomu. Napříč studiemi se zaměřením na protisty, však tento askepkt metodologie není příliš diskutován (Voglmayr, 2007). Na rostlinném materiálu však bylo prokázáno, že stechiometrické chyby jsou následkem přítomnosti fenolických látek (João Loureiro, 2006b; Noirot, 2000).

V rámci skupin zelených řas byla přítomnost fenolických látek popsána u sifonálních řas jako *Dasycladus,* u nichž se jednalo o kumariny (Menzel, 1983). Další fenolické látky jako gallotaniny byly nalezeny u spájivých řas jako je *Spirogyra* (Cannell, 1988).

4.1.6 Barvení DNA

K barvení DNA dostupné fluorochromy lze dělit na ty, jež se váží na DNA bez specifity na báze a na ty, které se váží na báze specificky (Doležel, 1992).

Jako fluorochromy, které se stechiometricky váží na DNA, lze uvést propidium jodid (PI) nebo ethidium bromid (EB). Jedná se o fluorochromy, které interkalačně barví DNA i dvouvláknovou RNA. Proto je nutné v případě jejich užití přidat RNázu, aby došlo k rozložení RNA přítomné ve vzorku (Greilhuber, 2007). Nicméně existují práce, jež uvádí, že vzorky ošetřené RNázou neprodukovaly rozdílné výsledky od těch, které ošetřené nebyly (Standeren, 2018). Dalším úskalím užití těchto dvou fluorochromů je překryv jejich emisního spektra s emisním spektrem chlorofylu u vzorků, v nichž jsou barveny celé buňky. Jak je již zmíněno výše, chlorofyl může být z buněk vymyt pomocí alkoholu v případě, že primárním cílem měření je samotná velikost genomu (LaJeunesse et al., 2005).

Další hojně využívané fluorescenční barvy pro protistní vzorky SYTOX Green, SYTOX Orange, SYBR Green a Pico Green partří také mezi fluorochromy barvící nespecificky DNA

(Connolly et al., 2008; Houdan et al., 2004; Reinecke, 2018; Veldhuis et al., 1997). Rovněž jako PI a EB se i tyto fluorochromy váží jak na DNA tak RNA a tudíž je doporučené ošetřit vzorky RNázou. Přičemž při užití fluorochromu Pico Green je třeba vzorky fixovat ve formaldehydu (Marie 1996). Zejména užití fluorochromu SYTOX Green je pak vyzdvihováno v kontextu přesného měření srovnatelného s PI a zároveň zachováním autofluorescence chlorofylu .(Parrow & Burkholder, 2002; Veldhuis et al., 1997)

V pracích zabývajících se protisty jsou používány rovněž fluorochromy se specifitou pro AT/GC páry bází a to konkrétně barvy řady Hoechst, DAPI (specifické pro AT páry bází) a Chromomycin A3 (specifický pro GC páry bází; Greilhuber, 2007). Právě však specifita pro jeden z párů bází dělá z těchto fluorochromů nevhodné barvy k přesnému stanovení velikosti genomu. Tato nepřesnost je přitom přítomna i v případě, kdy poměr AT/GC bází je stejný jak u užívaného standardu tak u měřeného vzorku (Doležel, 1992).

4.1.7 Výběr standardu

Pro stanovení velikosti genomu v absolutní hodnotě je třeba zkoumaný vzorek měřit společně se standardem, jehož velikost genomu je již známá. Standardy lze rozdělit podle metody jejich použití na standardy externí a interní. Standardy externí jsou přitom připravovány odděleně od zkoumaného vzorku, a i jejich měření probíhá zvlášť. Zatímco interní standardy se připravují zároveň se zkoumaným vzorkem. Použití externích standardů však není vhodné, jelikož oddělená příprava zkoumaného vzorku a standardu, ačkoliv je svou metodikou, v co největší možné shodě s přípravou vzorku, může způsobit nepřesné měření (Greilhuber, 2007).

Ideální standard by měl být velikostí genomu podobný námi zkoumanému vzorku, aby nedocházelo k nelineárním chybám, avšak zároveň by neměl mít stejnou velikost genomu, aby nedocházelo k překryvu vrcholů histogramu (*peak*; Vindeløv, 1983). Zároveň by měl být standard fylogeneticky příbuzný studovanému organismu. Dále by si měl být daný standard a vzorek podobný ve stavbě chromatinu a zároveň by onen standard měl být dobře dostupný (Johnston 1999). Standardů z protistních skupin je ale využíváno málo (Chun, 2017; Figueroa, 2010; Olefeld, 2018; Simon, 1994; Von Dassow et al., 2008; Zubáčová ,2008, viz Tab. 1). Z obrovské diverzity protist a neprozkoumané velikosti jejich genomů pak vyplývá potřeba po velkém počtu protistních standardů, ve srovnání s jinými studovanými skupinami. Nově stanovované standardy pak většinou nejsou tak dobře prostudovány jako ty již zavedené z jiných studovaných skupin a nemusí být stejně dobře dostupné.

Tab. 1: Velikosti genomů a užití protistních standardů. Kde 1 (Olefeld, 2018), 2 (Zubáčová, 2008), 3 (Simon ,1994), 4 (Vaulot, 1994), 5 (Chun, 2017), 6 (Von Dassow, 2008), 7 (Figueroa, 2010)

Standard	Třída	Velikost genomu (1C,pg)	Studované organismy	Článek
Synura spagnicola LO234K-E	Chrysophyceae	0,203	Chrysophyceae	1
Trichomonas vaginalis	Trichomonadidea	0,162 - 0,170	Trichomonadidea	2
Phaeocystis sp. PCC64	Prymnesiophyceae	0,210	Chlorophyceae, Prymnesiophyceae, Prasinophyceae, Pelagophyceae	3
Phaeocystis sp. Napales	Prymnesiophyceae	0,120	Prymnesiophyceae	4
Thalassiosira pseudonana	Mediophyceae	0,035	Labyrinthulomycetes, Mediophyceae	5,6
Saccharomyces cerevisiae	Saccharomycetes	0,013	Labyrinthulomycetes	5
Scrippsiela hangoei	Dinophyceae	23-26	Dinophyceae	7

Oproti tomu se hojněji užívají neportistní standardy jako například kuřecí erytrocyty, hovězí thymocyty, *Arabidopsis thaliana, Pisum sativum* nebo *Licopersicon esculentum* (Beaton & Cavalier-Smith, 1999; Connolly et al., 2008; Hong et al., 2016; LaJeunesse et al., 2005; Poulíčková et al., 2014; Read, 2013; Reinecke, 2018; Veldhuis et al., 1997; Weiss et al., 2010). Pro ty je hlavní výhodou, jejich dostupnost a dobře prostudované chování jako standardu. Z fylogenetické nepříbuznosti standardu a vzorku pak plynou nevýhody jako např. rozdílné složení buněk a velikost genomu mnohdy o několik řádů vzdálená od velikosti genomu studovaného organismu (Von Dassow, 2008). Přičemž u nejhojněji užívaného neprotistního standardu kuřecích erytrocytů je třeba zmínit nutnost brát v potaz pohlaví standardu, jelikož velikost genomu se mezi pohlavími liší (Nakamura, 1990)

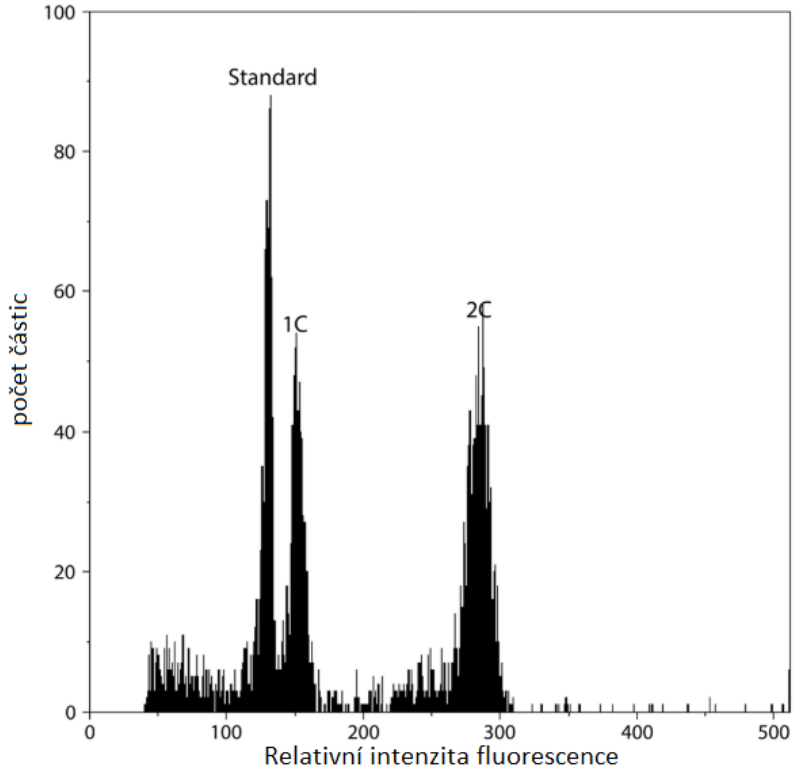
4.1.8 Analýza vzorku

Metodou průtokové cytometrie jsou pomocí paprsku monochromatického světla měřeny vlastnosti biologických částic, nejčastěji celých buněk nebo jader. Jednotlivé částice prochází paprskem excitačního záření, které prosvěcuje proud suspenze zkoumaných částic. Využívá se přitom dvou jevů, a to rozptylu světla nebo fluorescence zkoumaného materiálu (Kron, 2007; Radcliff & Jaroszeski, 1998). Značnou výhodou průtokové cytometrie je vysoký počet měřených částic během krátkého času. Měřený vzorek zpravidla obsahuje kolem 100 000 měřených partikulí (Bennett and Leitch, 1995).

Fluorescenční částice (nejčastěji jádra) po průchodu světelným paprskem o potřebné vlnové délce emitují záření. Relativní intenzita fluorescence vzorku a standardu je poté zaznamenána na lineární nebo logaritmické škále (Galbraith, 1997). Intenzita fluorescence je přitom úměrná obsahu DNA.

4.1.9 Stanovení velikosti genomu

Výsledná data měření intenzity fluorescence jsou vizualizována formou histogramu (Obr. 3). Na histogramu jsou viditelné vrcholy, kdy jak pro vzorek, tak pro standard jsou v ideálním případě přítomny vždy 2 vrcholy. Jsou-li měřené buňky vegetativní, pak první vrchol s nižší intenzitou fluorescence představuje populaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu. Druhý vrchol představuje populaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu a tudíž reprezentuje dvojnásobnou velikost genomu prvního vrchol (Dean, 1987; Vaulot 1986; Voglmayr, 2007).



Obr. 3: Příklad histogramu – velikost genomu Micrasterias muricata měřená společně se standardem Pisum sativum, převzato a upraveno z Poulíčková (2014)

První vrchol reprezentuje haploidní velikost genomu 1C pro organismy s haplontním životním cyklem nebo pro gametofytickou populaci buněk organismu s haplo-diplontním životním cyklem. U organismů s diplontním životním cyklem nebo pro sporofytickou populaci buněk organismu s haplo-diplontním životním cyklem pak tento vrchol představuje diploidní velikost genomu 2C. K tomu je třeba zmínit, že životní cykly a úrovně poloidie jsou napříč

protisty stále z velké části neznámé (Voglmayr, 2007).Absolutní velikost genomu lze spočítat jako (Doležel & Bartoš, 2005):

$$VG\ vzorku = \frac{PIF\ G1\ peaku\ vzorku}{PIF\ G1\ peaku\ standardu} \times VG\ standardu\ (pg/bp)$$

kde VG je zkratkou pro velikost genomu a PIF je zkratkou pro průměrnou intenzitu fluorescence.

Přesnost měření je pak udávána pomocí variačního koeficientu. U protistních vzorků jsou nezřídka publikovány i hodnoty vyšší než 10 % (Figueroa, 2010; Parrow & Burkholder, 2002; Veldhuis, 1997), přičemž v rámci rostlinných studií, jejichž metodika je již mnohem lépe optimalizovaná, jsou za uspokojivé výsledky považovány ty, kterých variační koeficent nepřesahuje 3 % (Galbraith, 1997).

4.2 Mikrospektrofotometrie

Při použití této metody je DNA zkoumaného organismu a standardu barvena pomocí fluorochromů. Následně je měřena intenzita fluorescence po excitaci fluorochromů navázaných na DNA. Měření je prováděno na různých typech mikrospektrofotometrů umožňujících excitaci (Coleman et al., 1981). Vzorek je přitom umístěn na mikroskopickém sklíčku. Statické umístění vzorku přitom umožňuje lokalizovat zdroj fluorescence a odlišit tak například mimojadernou fluorescenci buněčných struktur (Coleman et al., 1981). Měření se přitom provádí na malém množství buněk oproti průtokové cytometrii. To je v případě, kdy není možné zajistit potřebné množství buněk výhodné, zejména tedy u obtížně kultivovatelných protist. Oproti tomu, v situaci, kdy je možné měřit velké množství buněk, je samozřejmě preferované zajistit veliký soubor dat a tedy užít průtokovou cytometrii (Hardie et al., 2002)

Tato metoda byla využívána spíše v minulosti, a ve veliké míře byla užívána kupříkladu při studiu velikosti genomu u makroskopických mnohobuněčných chaluh (Phillips et al., 2011), ruduch (Kapraun & Freshwater, 2012) a zelených řas (Kapraun, 2007). V rámci protist je však tato metoda využívána mnohem méně. Lze zmínit práce studující zástupce z třídy Trebouxiophyceae (Yamamoto et al., 2001, 2011). Jako další je možné uvést práci studující zástupce třídy Cyanidiophyceae (Toda et al., 1995). Hodnoty z této studie, získané pomocí mikrospektrofotometrie za užití fluorochromů DAPI a PI, byly vyhodnoceny jako nepřesné ve srovnání s jinými metodami (Feulgenova denzitometrie a PFGE; Takahashi et al., 1993). Specifita vazby DAPI k AT bázím v DNA ve spojení s rozdílným poměrem párů bází mezi zkoumaným organismem a standardem, způsobila chybné stanovení pomocí právě tohoto

fluorochromu (Johann Greilhuber et al., 2007). Hodnota získaná pomocí barvení PI byla naproti tomu ovlivněna rozdílnou topologií DNA zkoumaného vzorku a standardu (Toda et al., 1995).

4.3 Feulgenova denzitometrie

Jedná se o metodu, během níž je na základě intenzity barvení přepočítáváno absolutní množství DNA zkoumaného vzorku. Na rozdíl od průtokové cytometrie a mikrospektrofotometrie je však v případě Feulgenovy denzitometrie měřena absorbance barveného vzorku, a ne fluorescence fluorochromů vázaných na DNA. Množství barvy je přímo úměrné množství DNA, a to je zároveň přímo závislé na množství absorbovaného světla (Hardie et al., 2002). Ve srovnání s dvěma výše uvedenými metodami však není možné pomocí Feulgenovy denzitometrie barvit shluky DNA menší než 0,2 p,g (např. DNA organel; Rasch, 1974). Naproti tomu je z výše uvedených metod finančně nejméně náročná a zároveň je díky tvorbě trvalých preparátů umožněno opakované měření (Hardie et al., 2002).

Obecně postup začíná fixací buněk. Stejně jako u průtokové cytometrie, jsou přitom i zde k fixaci nejčastěji používány alkoholové fixativy. Následně je vzorek hydrolyzován pomocí kyseliny chlorovodíkové (Hardie et al., 2002). Podmínky hydrolýzy jsou přitom jedním ze stěžejních kroků, na kterých závisí přesnost barvení DNA (Yamamoto et al., 2001). Přidáním silné kyseliny dochází při hydrolýze k tvorbě apurinní kyseliny s volnými aldehydovými skupinami. Poté je k vzorku přidáno Schiffovo činidlo, které se váže k volným skupinám aldehydu a tvoří tak růžové zbarvení. Nakonec je po vymytí přebývajícího Schiffova činidla vzorek na mikroskopickém sklíčku vysušen a připraven pro následné měření (Hardie et al., 2002). Samotné měření je pak možné provádět na mikroskopu s fotometrem, mikrospektrofotomterech nebo v rámci novějších studií na mikroskopu s připojenou kamerou. (Vilhar et al., 2001). V souvislosti s uvedeným postupem je nutné zmínit, že Feulgenova denzitometrie je oproti výše zmíněným metodám laboratorně velmi náročná na přípravu. Stejně však jako v případě mikrospektrofotometrie lze i pomocí Feulgenovy denzitometrie analyzovat jednotlivé buňky, z čehož vyplývá možnost zkoumat genom obtížně kultivovatelného organizmu (Hardie et al., 2002).

V rámci protistních studií byla metoda Feulgenovy denzitometrie užita například na zelené řasy třídy Trebouxiophyceae (Yamamoto et al., 2001), kde byly výsledky se značnou shodou srovnány se spektrofotometrickým měřením za užití PI. Dále pak byla tato metoda aplikována například v pracích zabývajícími se ruduchami z třídy Cyanidiophyceae (Muravenko et al., 2001; Toda et al., 1995) a v práci studující parazitické zástupce kmene Metamonada (Erlandsen & Rasch, 1994).

4.4 Celogenomové sekvenování

Rozvoj sekvenačních technik v posledních několika desetiletích umožnil sekvenovat celé genomy. Metody celogenomového sekvenování poskytují o zkoumaném organismu velké množství genomických informací, přičemž délka sekvenovaného genomu je jen jednou z nich. Stanovit velikost genomu tak většinou není hlavním cílem daného sekvenačního projektu (Ekblom & Wolf, 2014). V souvislosti se stále relativně vysokou výpočetní náročností těchto metod, je pak volba celogenomového sekvenování podmíněna snahou zodpovědět komplexnější otázky týkající se genomu organismu, nežli pouze potřebou kvantifikovat množství DNA (Pflug et al., 2019)..

Ke stanovení velikosti genomu pomocí celogenomového sekvenování je nejprve třeba izolovat nepoškozenou kvalitní DNA. Extrahovanou DNA je následně nutné rozstříhat na fragmenty. V závislosti na typu zvolené sekvenační metody pak pokračuje příprava knihovny fragmentů. Fragmenty jsou poté sekvenovány, čímž vznikají jednotlivá čtení. Ta jsou následně sestavena pomocí sestavovacích programů do celého genomu (Ekblom & Wolf, 2014; Sohn & Nam, 2018).

4.4.1 Izolace DNA a příprava knihovny

Prvním krokem je izolace kvalitní a nepoškozené DNA pro sekvenování. Množství potřebné DNA závisí na zvolené technice sekvenování. Sekvenační metody lze přitom rozdělit do tří generací, kdy první generace představuje prvotní techniky jako například Sangerovo sekvenování. Sekvenování druhé generace oproti tomu umožnilo detekovat přidávání jednotlivých bází v rámci jedné molekuly a zároveň umožnilo sekvenování ohromného množství molekul najednou. Sekvenování třetí generace pak umožnilo čtení dlouhých molekul bez nutnosti amplifikace (Heather & Chain, 2016). Techniky první a druhé generace sekvenování přitom vyžadují množství DNA v rozmezí od jednotek po desítky mikrogramů, zatímco metody třetí generace již potřebují pouze jednotky mikrogramů DNA (Ekblom & Wolf, 2014; Wong et al., 2012). Sekvenační projekty studující protista pak řeší již výše zmíněný problém potřeby relativně velikého množství biomasy nutné pro získání dostatečného množství DNA. Pro izolaci DNA je v pracích zaměřených na protista velmi často užívána fenol-chloroformová metoda (Blazejewski et al., 2015; Gobler et al., 2011; Zhu et al., 2020). Dále pak jsou hojně využívány komerčně dostupné kity pro extrakci DNA jako například Qiagen (John et al., 2010; Liu et al., 2018; Nelson et al., 2019).

Následným krokem je příprava knihoven fragmentů DNA o potřebné velikosti pro následné sekvenování. DNA je přitom rozštěpena na mnoho malých fragmentů. Pro snadnější

následné sestavení genomu se přitom využívá takzvaných *mate-pair* nebo *paired-end* knihoven. Jedná se o čtení jednoho fragmentu DNA z obou konců. V případě *paired-end* je fragment většinou dlouhý několik stovek bází a je možné jej ve výsledku osekvenovat z obou konců celý, zatímco v případě *mate-pair* knihoven je fragment dlouhý až několik tisíc bází. Čtení takového fragmentu pak podává informaci o okrajových oblastech daného fragmentu, čímž pomáhá například při sestavování čtení do kontigů (Ekblom & Wolf, 2014; J. T. Simpson & Pop, 2015).

4.4.2 Sekvenování

Přesnost stanovené délky sekvenovaného genomu je závislá na délkách čtení, která jsou jednotlivými sekvenačními technikami generovány (viz Tab. 2).

Tab. 2: Sekvenační techniky seřazené sestupně dle délky čtení (délky čtení z: Ekblom & Wolf, 2014) s příklady protistních sekvenačních projektů, kde byly užity.

Sekvenační technika	Délka čtení (bp)	Studované organismy	Protistní sekvenační projekty
SMRT	5000-10000	Chrysophyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae	(Majda et al., 2019; Mock et al., 2017; Starkenburg et al., 2017)
Sangerovo sekvenování	900-1000	Prymnesiophyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae	(Curtis et al. 2012; Mock et al. 2017; Read et al. 2013)
454 sekvenování	700-800	Euglenoideae, Eustigmatophyceae, Diplomonadida	(Corteggiani Carpinelli et al., 2014; Ebenezer et al., 2017; Jerlström-Hultqvist et al., 2010)
Illumina sekvenování	150	Conoidasida, Dinophyceae Conoidasida	(Blazejewski et al., 2015; Liu et al., 2018; Lorenzi et al., 2016)
Sekvenovace ligací SOLiD	50	Eustigmatophyceae	(Corteggiani Carpinelli et al., 2014)

Napříč studiemi zaměřenými na protista byly užity jak tradiční sekvenační postupy (Sangerovo sekvenování), tak metody sekvenování druhé generace (454 sekvenování) nebo již techniky třetí generace (SMRT sekvenování = Single Molecule Real-Time).

Dalším důležitým parametrem, který je třeba zmínit, je chybovost výše uvedených platforem. Především metody sekvenování druhé generace s krátkými čteními mají chybovost velice nízkou a čtení jimi produkována jsou tak relativně přesná, zatímco metody sekvenování

třetí generace, které generují dlouhá čtení, mají vysokou chybovost (15%) značně omezující jejich užití (Ekblom & Wolf, 2014).

4.4.3 Sestavení genomu

Sestavení genomu je posledním krokem vedoucím k zjištění velikosti genomu, přičemž právě tento krok je tím nejdůležitějším pro přesnost stanovené délky genomu. Při volbě přístupu sestavení genomu je přitom třeba počítat s délkou sekvenovaných čtení. Rozdílně dlouhá čtení totiž vyžadují rozdílné přístupy. Sekvenovaná čtení jsou pomocí sestavovacích programů seřazena do tzv. kontigů představujících delší celistvé sekvence DNA. Kontigy jsou pak dále sestavovány do delších úseků. Výsledná sekvence ale netvoří jednotný úsek, protože genom eukaryot je rozdělen do chromozomů (J. T. Simpson & Pop, 2015; Sohn & Nam, 2018).

Přesnost sestavení genomu je ovlivňována několika faktory. Tím hlavním z nich je přítomnost repetitivních sekvencí v rámci genomu. V případě, kdy jsou repetetivní sekvence delší než jednotlivá čtení, je obtížné sestavit danou oblast genomu. V rámci prostitních sekvenovaných genomů lze uvést kupříkladu práci zabývající se skrytěnkou *Goniomonas avonela*, kde je zmiňována značná fragmenatce sestaveného genomu, která vede k nepřesnému stanovení velikosti genomu. Dále pak úroveň pokrytí genomu limituje přesnost jeho sestavení. Příliš nízké pokrytí by totiž mohlo vyústit v neúplné sestavení (Ekblom & Wolf, 2014). Nakonec pak heterozygozita a vyšší úrovně ploidie mohou být problematické při sestavování genomu. Přítomnost jednonukleotidových polymorfismů ve čtení pak napovídá o vyšší úrovni ploidie, avšak není možné ploidii přesně určit. Jednonukleodtidové polymorfismy tak mohou vést k chybným cestám sestavení výsledné sekvence. V souvislosti s ploidií je pak nutné uvést, že výsledná velikost genomu stanovená pomocí celogenomového sekvenování odpovídá haploidnímu obsahu DNA (Majda et al., 2019; Simpson & Pop, 2015). Polyploidie společně se vysokým obsah repetitivních sekvencí představují problémy, s nimiž bylo nutné se vypořádat během sestavování genomu *Euglena gracilis*. Jedná se přitom o doposud největší protistní sekvenovaný genom o velikosti 1,435 Gbp (Ebenezer et al., 2017). Délka sekvenovaného genomu je dalším faktorem, který hraje roli již při výběru organismu k sekvenování, jelikož sekvenace delších genomů je finančně náročná a jejich následné sestavení obtížné (Simpson & Pop, 2015).

Pro sestavování takovýchto čtení se pak používají metody užívající tzv. k-mery. K-mery jsou krátké fragmenty čtení o délce k. Na základě k-merů jsou pak konstruovány de Bruijnovy grafy hledající cestu k sestavení původní sekvence. Pro sestavení delších čtení, která jsou produkována především Sangeorvým sekvenováním, 454 sekvenování, anebo SMRT

sekvenováním jsou používány sestavovací programy užívající Overlap-Layout-Consesus (OLC) přístup. Ten přitom při sestavování kontigů používá celá čtení ve srovnání s de Bruijnovýi grafy (Ekblom & Wolf, 2014; J. T. Simpson & Pop, 2015; Sohn & Nam, 2018).

Nakonec je třeba zmínit, že v současné době se začínají v hojnější míře objevovat sekvenační projekty, které užívají hybridního přístupu k sestavení genomu, kdy jsou použity jak krátká čtení, která zajišťují přesnost a nízkou chybovost při sestavování kontigů a zároveň jsou užita dlouhá čtení, jež umožňují překonání delších repetitivních sekvencí (Ebenezer et al., 2017; Majda et al., 2019).

4.4.4 Sekvenační projekty protist

Vzhledem k již zmiňované výpočetní náročnosti sestavení a finanční náročnosti sekvenování velikých genomů, jsou přednostně sekvenovány spíše malé genomy. To má za následek statistické podhodnocení zastoupení velikých genomu napříč sekvenovanými protisty. Zároveň je věnovaná veliká pozornost zejména parazitickým, či patogenním protistům, jejichž genomy jsou sekvenovány častěji i proto, že parazitický způsob života je spojen s malými genomy. Sekvenovaných genomů volně žijících protist je proto nepoměrně méně (Mukherjee et al., 2019; Sibbald & Archibald, 2017).

Jako příklad velikých sekvenovaných genomů (1-1,5 Gbp) pak lze uvést genomy obrněnek z rodu *Symbiodinium* (Aranda et al., 2016), přičemž obrněnky obecně patří mezi eukaryota s největšími genomy vůbec. Volba tohoto rodu obrněnek přitom byla založena na předchozích studiích užívajících průtokové cytometrie (LaJeunesse et al., 2005). Ty vyhodnotily zástupce rodu *Symbiodinium*, jako nositele nejmenších genomů mezi obrněnkami, jejichž sekvenace a sestavení genomu bylonejsnadnější (Liu et al., 2018).

Vzhledem k určení ploidie pro přesnost stanovení velikosti genomu je pak nutné zmínit sekevenančí projekt studující zástupce chrysofyt *Poteriospumella lacustris* (Majda et al., 2019). V rámci tohoto projektu byly sekvenování tři kmeny, které byly již dříve testovány pomocí průtokové cytometrie (Olefeld, 2018). Výsledky průtokové cytometrie přitom poskytly informace o absolutním množství DNA, zatímco sekvenování ukázalo haploidní velikost genomu. Metody pro zjištění ploidie pomocí distribuce k-merů a jednonukleotidových plolymorfismů pak společně se srovnáním dat z průtokové cytometrie a sekvenování odhalily různé úrovně poloidie v rámci těchto tří kmenů. Kombinace těchto přístupů tak umožnila jasnější vhled do evoluce velikosti genomu (Majda et al., 2019).

4.5 Pulzní gelová elektroforéza

Tato metoda na rozdíl od klasické DNA elektroforézy umožňuje separaci velkých molekul DNA od 50 kbp po molekuly do velikosti zhruba 6 Mbp (Higashiyama & Yamada, 1991; Wang & Liu, 2013). Jako horní limit se v literatuře někdy udává až 10 Mbp (Herschleb, 2007; Smith, 1987), avšak tato hodnota vychází z nepřesných a již zastaralých dat.

Pro tuto metodu je nejprve nutné extrahovat DNA vzorku a DNA velikostního markeru, pro který je známý počet chromozomů i velikost genomu. Extrahovaná DNA je poté umístěna na agarózový gel, kde po spuštění elektroforézy jednotlivé molekuly DNA putují od katody k anodě a rychlost jejich pohybu je přitom určena jejich velikostí. K efektivní separaci velikých molekul DNA je přitom užíváno střídání směru působení elektrického pole, kdy dochází k jejich reorientaci. Právě tato reorientace molekul usnadňuje jejich pohyb a umožňuje tak jejich separaci (Wang & Liu, 2013).Veliké molekuly putují pomaleji, zatímco ty malé prochází skrz gel rychle. Po skončení elektroforézy je gel barven pomocí EB, který je interkalačním barvivem DNA, a tudíž na gelu vizualizuje proužky reprezentující jednotlivé chromozomy. Vyšší intenzity některých proužků na gelu indukují přítomnost dvou nebo více chromozomů o podobné délce. Velikost separovaných chromozomů je pak určena na základě poměru jejich vzdálenosti od nejbližšího chromozomu velikostního markeru. Nakonec je sečtena délka všech identifikovaných chromozomů, jež představuje velikost celého genomu organismu. Pulzní gelová elektroforéza tedy nejen že odhaluje velikost genomu, ale zároveň podává informaci o karyotypu zkoumaného organismu (Alduina & Pisciotta, 2015).

4.5.1 Příprava vzorků pro PFGE

V případě prací, které se zabývají protisty, je třeba prvně získat suspenzi buněk o požadované hustotě (cca 1×10^{8}-1×10^{10}/ml; Nosenko et al., 2007; Souza et al. 2011). Suspenze buněk se následně promývá pufry a poté je smíchána s nízkotající agarózou a nalita do forem. V některých studiích jsou buď před tímto krokem anebo následně po něm přidány enzymy k odstranění buněčné stěny kvasinek (lysozym a zymolyáza), které jsou nejčastěji užity jako velikostní markery (Nosenko et al., 2007; Vollrath & Davis, 1987; Yamamoto et al., 2001).Ve studii, jež se zabývala karyotypem kmenů rodu *Chlorella,* pak byly užity i enzymy k odstranění buněčné stěny studované řasy (maceroenzym, celluláza; Higashiyama and Yamada, 1991).

Poté je ke vzorku přidán roztok s pufrem a EDTA, proteinázou K a detergenty (dodecylsíran sodný a lauroyl sarkosinát sodný). Proteináza K je přidávána, aby odstranila ze vzorku proteiny a purifikovala tak DNA, zatímco EDTA slouží k ochraně DNA před endonukleázami a detergenty v roztoku umožňují lyzi buněk.

Nakonec je agarózový bloček se vzorkem promyt pufrem s EDTA, čímž dojde ke kýženému vymytí proteinázy K a následně je možné takto připravené vzorky skladovat v pufru s EDTA a nebo je rovnou užít pro elektroforézu (Alduina & Pisciotta, 2015; Herschleb, 2007).

4.5.2 Podmínky běhu elektroforézy

Důležitým parametrem je pulzní interval, tedy čas, po jehož uplynutí se střídavě mění směr elektrického pole. Čím větší jsou totiž separované molekuly, tím delší pulzní interval je k jejich reorientaci potřeba, a tudíž ještě o kus delší čas je třeba k tomu, aby se následně po reorientaci posunuly v elektrickém poli. Pro separaci ideálně všech chromozomů je pak třeba použít více běhů elektroforézy s rozdílnými podmínkami. (Wang & Liu, 2013). Časovou a operační náročnost separace celého karyotypu vzorku pak ilustruje tabulka s podmínkami elektroforézy *Chlorella vulgaris* (Tab. 3Tab. 1Obr. 4).

Jako další důležitý parametr lze zmínit právě napětí, kdy pro menší molekuly (<2 Mbp) je možno použít vyššího napětí (6 V/cm), zatímco pro jasné rozdělení větších molekul je nutné použít napětí nižší.

Dále koncentrace agarózového gelu ovlivňuje průběh elektroforézy. Vyšší koncentrace agarózy (1-1,3%) umožňuje lepší rozlišení výsledků, avšak vyžaduje delší dobu běhu elektroforézy, kdežto užití agarózy o nižší koncentraci (0,4-0,5%) urychlí průběh elektroforézy, avšak sníží rozlišení výsledků (Wang & Liu, 2013).

Tab. 3: Příklad podmínek pulzní gelové elektroforézy, užitých ke karyotypingu *Chlorella vulgaris* (Higashiyama & Yamada, 1991)

Velikost chromozomu (Mbp)	Pulzní interval (min)	Napětí (V/cm)	Doba běhu (hod)
0,8-2,5	5	3,3	24
	7	3	24
	8	2,6	24
2-3	12	2	96
>2,5	25	1,6	72
	20	2	48

Poté je třeba zmínit, že pro běh elektroforézy je zapotřebí elektroforetických pufrů, jenž obsahem solí zajišťují ideální elektrickou konduktivitu. Nejčastěji je užíván 0,5×TBE (Tris-borátový pufr), jenž umožňuje dlouhotrvající běhy elektroforézy a užití vyššího napětí. Dalším nejčastěji používaným pufrem je 1×TAE (Tris-acetátový pufr), který je vhodný pro separaci molekul větších jak 3 Mbp (Alduina & Pisciotta, 2015).

Pro pulzní gelovou elektroforézu je rovněž důležitým parametrem reorientační úhel. Ten je ve většině případů 120°, přičemž snížení velikosti úhlu vede k rychlejšímu průběhu elektroforézy a s ním spojené ztráty rozlišení.

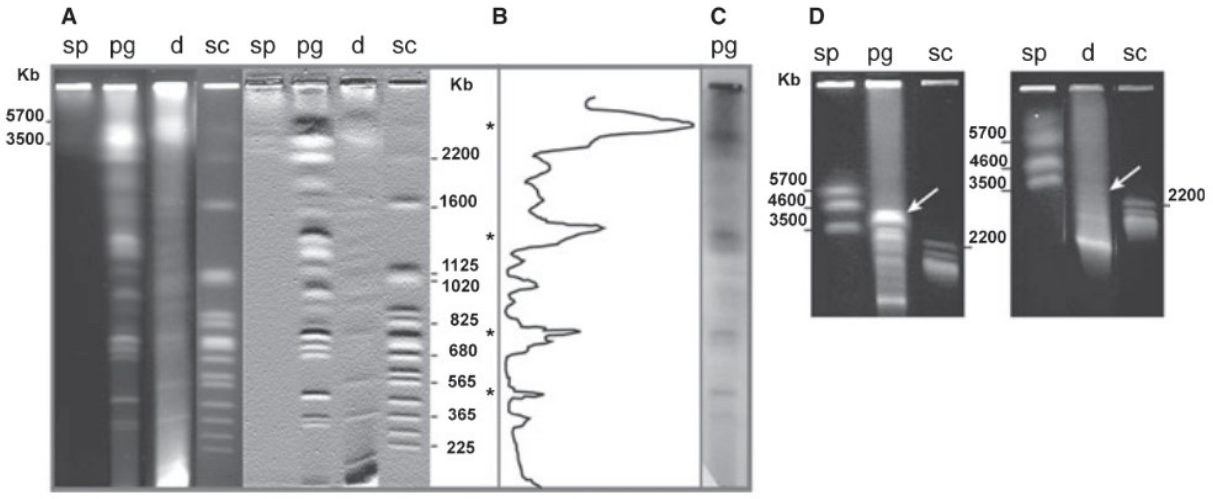
Celá elektroforéza by přitom v optimálních podmínkách měla probíhat při teplotě cca 14 °C, jelikož běh elektroforézy při pokojové teplotě by ji urychlil a prudce snížil důvěryhodnost jejích výsledků (Wang & Liu, 2013).

4.5.3 Velikostní markery

Pro určení velikosti zkoumaných chromozomů, je třeba použít velikostní markery, které jsou velikostí svých chromozomů podobné zkoumanému vzorku. Velikost chromozomů dostupných velikostních markerů tak nepřímo limituje rozlišení této metody. V pracích, které se zabývají protisty jsou obecně jako nejčastější velikostní markery užívány chromosomy kvasinek, konkrétně druhy *Saccharomyces cerevisiae* (0,225 – 2,2 Mbp), *Hansenula wingei* (1,05 – 3,15 Mbp), *Candida albicans* (1 – 4 Mbp) a *Schizosaccharomyces pombe* (3,5 - 5,7 Mbp) (Shirley, 1994; Sibley & Boothroyd, 1992; Souza 2011; Yamamoto 2001). Přičemž právě starší práce popisující karyotyp *Schizosaccharomyces pombe* stály za nadhodnocením možného rozlišení metody pulzní gelové elektroforézy na uváděných 10 Mbp. Tyto práce totiž chybně určily velikost největšího chromozomu této kvasinky na 9 Mbp (Smith 1987) a 7 Mbp (Vollrath & Davis, 1987), avšak skutečná velikost tohoto chromozomu je 5,7 Mbp (J. B. Fan 1989). Možnost určit velikost i dobře separovaného chromozomu je touto hodnotou limitována, na což naráží například ve studii odhalující karyotyp několika kmenů rodu *Chlorella* (Higashiyama & Yamada, 1991).

4.5.4 Shrnutí užití PFGE v rámci protist

Metoda pulzní gelové elektroforézy představuje poměrně přesnou metodu k odhalení velikosti genomu. Napříč protistními organismy byla pak tato metoda užita především u parazitických organismů z kmene Apicomplexa (Jones 1997; Morzaria & Young, 1992; Shirley, 1994; L. H. T. Van Der Ploeg 1985), dále pak na parazitické organismy z kmene Metamonada (J. bing Fan 1991; Roxström-Lindquist 2010) a zároveň se několik prací věnovalo parazitickým organismům z kmene Euglenozoa (Souza 2011; L. H. t. van der Ploeg 1989). Z volně žijících protistních organizmů byly touto metodou zkoumány zelené řasy (Courties 1998; Higashiyama & Yamada, 1991; Yamamoto 2001), haptofytní řasy (Nosenko 2007, viz Obr. 4) a několika zástupců ruduch (Maleszka, 1993; Takahashi1 1993; Toda 1995)



Obr. 4: Příklad běhů PFGE, A sekce – separace malých chromozomů, B sekce – graf intenzity barvení DNA proporcionální ku koncentraci DNA, C sekce – Southern blot A sekce běhu pg s hybridizovanou sondou eukaryotické sekvence aktinu, D sekce – separace středně velkých chromozomů, kde sp = schizosaccharomyces pombe, sc = saccharomyces cerevisiae, pg = *Pavlova gyrans*, d =*Diacronema* sp. Převzato z Nosenko 2007

Délka chromozomu velikostního markeru *S. pombe* 5,7 Mbp je pro tuto metodu horní limitující hranicí ve velikosti chromozomu, který je možné separovat. Genomy organismů s chromozomy většími, než je cca 6 Mbp, proto nelze touto metodu přesně popsat. Krom již výše zmíněné práce studující karyotyp kmenů rodu *Chlorella* (Higashiyama & Yamada, 1991), naráží na tento limit zároveň práce studující karyotyp parazitického zástupce kmene Apicomplexa *Toxoplasma gondi* (Sibley & Boothroyd, 1992).

Dalším úskalím je přítomnost dvou či více chromozomů o přibližně stejné délce, jejichž přesný počet není možné určit ani po densitometrii barvení gelu pomocí EB. To v několika případech vedlo k podhodnocení velikosti genomu studovaného organismu o zhruba 20 %. Takové nepřesnosti byly pozorovány u zelené řasy *Ostreococcus tauri* (Courties, 1998), ruduchy *Cyanidioschyzon merolae* (Takahashi, 1993) a u haptofytních řas *Pavlova gyrans* a *Diacronema* sp. (Nosenko et al., 2007).

Hlavní nevýhodou této metody je její veliká časová náročnost. Samotná příprava vzorků pro elektroforézu a zároveň i běhy elektroforézy jsou náročné na čas a v případě nutnosti separovat veliké molekuly se potřebný čas ještě prodlužuje (Sibley & Boothroyd, 1992).

4.6 Ostatní metody

V této kapitole budou zmíněny metody, které byly ke stanovení velikosti genomu prostistních organismů užity jen zřídka.

4.6.1 Kvantitativní real-time -PCR

Pro zjištění velikosti genomu několika rozsivek byla užita metoda kvantitativní real-time PCR. Konkrétně byla užita ve studii (Von Dassow et al., 2008) na 3 kmenech rodu *Thalassiosira* a dále ve článku (Mock et al., 2017) na druhu *Fragilariopsis* cylindrus Limitující pro tuto metodu je, že je možné ji aplikovat pouze na organismus se známou sekvencí jeho genomu, a nebo alespoň se známou sekvencí genomu blízce příbuzného druhu (Smith & Osborn, 2009). Tato relativně nová metoda představuje možnost stanovit haploidní velikost genomu na základě kvantifikace tzv. *single copy* genů v známém množství DNA. Během této metody je nejprve izolována DNA zkoumaného vzorku, pro kterou je stanovena koncentrace pomocí měření UV absorbance DNA. Poté jsou generovány standardy *single copy* genů pomocí klasické PCR pro užití v následné kvantitativní real-time PCR. Pomocí té je zjištěn počet kopií tzv. *single copy* genů v haploidním genomu (Wilhelm et al., 2003). Výsledná velikost genomu je pak vypočítána jako $C \times N_A/M_{bp}$, kde C odpovídá množství DNA vzorku × počet kopií *single copy* genů, N_A udává avogardovu konstantu a M_{bp} je zkratkou pro molární hmotnost průměrného počtu bází párů.

4.6.2 Reasociační kinetika

V rámci studií zaměřených na protista byla tato metoda užita ke stanovení velikosti genomu zástupce kmene euglenozoa *Euglena graciilis* (Rawson, 1975) a u několika druhů rodu *Chlorella* (Dörr & Huss, 1990). Metoda byla také užita ke stanovení velikosti genomu obrněnky *Heterocapsa pygmea* (Triplett et al., 1993). Avšak hodnota uváděná v této práci byla třikrát vyšší, než hodnota získaná pomocí průtokové cytometrie (LaJeunesse et al., 2005), což poukazuje na nutnost zvýšené opatrnosti při užití dané metody. Další svědectví o nepřesnosti této metody pak udává článek užívající pulzní gelové elektroforézy zaměřený na zástupce kmene Metamonada (J. bing Fan et al., 1991). Tato studie porovnává své výsledky velikosti genomu s šestkrát vyššími hodnotami než při zapojení techniky reasociační kinetiky (C.Boothroyd et al., 1987; Nash et al., 1985).

Metoda reasociační kinetiky DNA je jednou z prvních metod, které byly k stanovení velikosti genomu užity (Doležel & Bartoš, 2005). Technika je založena na rychlosti opětovného spojení komplementárních vláken DNA po jejím zahřátí. Rychlost reasociace je závislá zejména na množství dané sekvence ve vzorku, což umožňuje určit zastoupení repetitivních a unikátních sekvencí genomu. Vzorek je pro potřeby této metody připraven izolací a fragmentací DNA zkoumaného organismu a standardu (Britten & Kohne, 1968). Příprava vzorku z nepřesně určeného počtu buněk, které se mohou nacházet v rozdílných fázích buněčného cyklu, pak

představuje hlavní nevýhodu této metody společně s náročnou laboratorní přípravou. V současnosti tak byla tato metoda nahrazena spíše cytometrickými metodami a již se ke stanovení velikosti genomu nepoužívá (Dhillon et al., 1980).

4.6.3 Difenylaminová reakce

Pro stanovení velikosti dosud největšího genomu protist byla využita metoda difenylaminové reakce. Touto metodou byla analýza velikosti genomu améby *Polychaos dubia* s výsledkem 670 Gbp (Friz, 1968) zřejmě značně nadhodnocená (Gregory, 2005). Nepřesnosti napovídá fakt, že v pozdější době stanovené velikosti genomu příbuzných améb byly o řád nižší (Byers, 1986). Dále byla tato metoda užita k stanovení velikosti genomu ve dvou článcích studujících zelené řasy z třídy Chlorophyceae (Kates et al., 1968; Reinecke et al., 2018) a také v práci studující zelené řasy třídy Ulvophyceae (Spring et al., 1974). Rovněž relativně veliké genomy obrněnek byly pomocí difenylaminové rekce stanoveny ve studiích (Rizzo & Noodén, 1973; Wargo & Rizzo, 2000)

Pro stanovení velikosti genomu pomocí reakce DNA s difenylaminem je opět nutné izolovat DNA z určeného počtu buněk (Kates et al., 1968; Reinecke et al., 2018). Izolace DNA se přitom provádí pomocí $HClO_3$ nebo $HClO_4$, v té je následně vzorek ponechán. Barvení DNA je poté prováděno přidáním difenylaminového činidla společně s acetaldehydem (případně formaldehydem). Barvený vzorek je následně po několikahodinovém barvení měřen na spektrofotometru. Pro stanovení obsahu DNA ve vzorku je pak nutné připravit kalibrační řadu vzorků DNA o známé koncentraci a měřit jejich absorbance. Výsledná velikost genomu je pak vypočtena jako podíl stanoveného množství DNA ve vzorku a počtu buněk užitých k přípravě vzorku (Burton, 1968; Mirsky & Ris, 1951).

Ke stanovení velikosti genomu byla difenylaminová reakce užívána především v druhé polovině 20. století. V současné době se díky laboratorní a časové náročnosti a v mnohých případech i kvůli nepřesnému měření tato metoda skoro neužívá (Doležel & Greilhuber, 2010).

4.6.4 Diaminobenzoová reakce

Tato metoda nenašla v rámci protist velikého uplatnění. To lze zdůvodnit stejně jako u předchozí metody značnou laboratorní náročností přípravy (Doležel & Greilhuber, 2010). Zároveň se tyto obě metody potýkají s nepřesnostmi plynoucími z užívání izolované DNA z nepřesně stanoveného počtu buněk. Nicméně v minulosti byla tato metoda použitá v práci (Triplett et al., 1993) ke stanovení velikosti genomu obrněnky *Heterocapsa pygmeae*. Rovněž byla tato metoda užitá v jedné z prvních studií, které se zabývaly velikostí genomu protsit

(Holm-Hansen, 1969), a to ve třídách Mediophyceae, Bacillariophyceae, Dinophyceae, Chrysophyceae, Chlorophyceae a Coccolithophyceae.

Reakce DNA s kyselinou diaminobenzoovou je svým principem je značně podobná výše zmíněné difenylaminové reakci. Na rozdíl od difenylaminové reakce však není měřena absorbance barvené DNA ale fluorescenční produkt reakce 3,5-diaminobenzoové kyseliny s DNA vzorku (Kissane & Robins, 1958; P. S. Thomas & Farquhar, 1978).

5 Velikost genomu u protist

Navzdory tomu, že studiu velikosti genomu se věnuje vědecká společenost již sedm desetiletí (Swift, 1950), velikost genomu u protist stále není dostatečně prozkoumána. Oproti tomu bylo věnováno mnoho pozornosti studiu rostlin, živočichů a hub, což přispělo k relativně dobrému prostudování těchto taxonomických skupin. Pro všechny z výše uvedených skupin existují i databáze velikostí genomů (http://www.genomesize.com -databáze velikosti genomu živočichů, 6222 záznamů T.R. Gregory, 2020; https://cvalues.science.kew.org/search -databáze velikosti genomu rostlin, 12273 Leitch et al., 2019; http://www.zbi.ee/fungal-genomesize/ - databáze velikosti genomu hub 2353 záznamů B Kullman et al., 2005). Nic takového však neexistuje pro protista. Některé záznamy jednobuněčných řas jsou ale zahrnuty v databázi velikostí genomů rostlin (Leitch et al., 2019) a stejně tomu tak je u mnohých zástupců jednobuněčných hub, jejichž genomy jsou zahrnuty v databázi velikosti genomu hub (B Kullman et al., 2005). Další částečný přehled známých velikostí genomů protist nabízí databáze osekvenovaných genomů (https://gold.jgi.doe.gov; Mukherjee et al., 2019), kde je publikováno 751 záznamů. Je zde ale nutné uvést, že dané záznamy pocházejí ze sekvenačních projektů s různou úrovní sestavení, a proto je nutné být přistupovat k těmto hodnotám obezřetně, protože nemusí přesně udávat velikost genomu. Data z celogenomového sekvenování přitom nepokrývají protistní diverzitu rovnoměrně, ale zaměřují se na relativně menší genomy, především parazitické a patogenní zástupce (Sibbald & Archibald, 2017). Valná většina studií zabývajících se explicitně velikostí genomu však v současné době užívá průtokové cytometrie a to i v rámci protist. Menšinový podíl pak lze ještě stále připisovat statickým cytometrickým metodám (Feulgenova denzitometrie a mikrospektrofotometrie) a pulzní gelové elektroforéze. Cytochemické metody (reasociační kinetika, diphanylaminová a diaminobenzoová reakce s DNA) se naproti tomu již v současné době prakticky nepoužívají (Doležel & Greilhuber, 2010).

5.1 Studované taxony

5.1.1 Rozsivky

Rozsivky představují relativně mladou a bohatě diverzifikovanou skupinu (Sorhannus, 2007), u které je možné pozorovat značnou proměnlivost a přizpůsobivost ve velikosti genomu. Časté polyploidizace, či jiné přestavby genomu v rámci blízce příbuzných druhů nasvědčují této flexibilitě a možné speciaci (Bowler et al., 2008; Oliver et al., 2007; Von Dassow et al., 2008). Dokladem průběhu polyploidizace je pak například práce porovnávající dvě recentně oddělené populace rozsivky *Ditylum brightwellii*, mezi kterými se velikost genomu lišila o dvojnásobek (Koester et al., 2010). Obdobné výsledky napovídající polyploidizaci byly pozorovány mezi kmeny *Thalassiosira weissfolgii* (Von Dassow et al., 2008). V rámci celé skupiny velikost genomu variuje v širokém rozmezí 0,03 – 58,18 pg (Armbrust et al., 2004; Connolly et al., 2008; Mock et al., 2017; Von Dassow et al., 2008).

5.1.2 Krásivky

Studie zaměřené na analýzu variability velikosti genomu napříč krásivkami (Mazalová et al. 2011; Poulíčková et al. 2014) odhalily značné vnitrodruhové rozdíly obsahu DNA mezi jednotlivými kmeny u druhů M*icrasterias rotata*, *M. truncata* a *Triploceros graciles.* Na základě těchto dat pak lze podpořit domněnku, že za veliké genomy krásivek mohou do značné míry polyploidizační události. Tyto práce stanovily velikosti genomů studovaných krásivek v intervalu 1,02 – 32,37 pg (Mazalová et al. 2011; Poulíčková et al. 2014).

5.1.3 Obrněnky

V rámci skupiny obrněnek byly popsány jedny z největších eukaryotických genomů vůbec. Velikost genomů obrněnek se nachází v rozmezí 1,5 – 225,0 pg (Figueroa et al., 2010; Hong et al., 2016; LaJeunesse et al., 2005; Liu et al., 2018; Parrow & Burkholder, 2002; Wargo & Rizzo, 2000), přičemž ještě vyšší hodnota 278,06 pg byla u obrněnek naměřena ve starší práci (Veldhuis et al., 1997) užívající neoptimalizované metodiky průtokové cytometrie. Velké genomy obrněnek byly uváděny jako následek možné polyploidizace (Loeblich et al., 1981), nicméně současné genomické studie spíše poukazují na duplikace konkrétních genů, jako následek selekčního tlaku na metabolickou diverzitu (Liu et al., 2018). Naopak nejmenší genomy obrněnek (1,5 - 3,5 pg) se nachází v symbiotických obrněnkách korálů rodu *Symbiodinium*(Aranda et al., 2016; LaJeunesse et al., 2005).

5.1.4 Haptofyta

Probádaná variabilita velikosti genomu u haptofyt se pohybuje od 0,16 po 1,72 pg (Boucher et al., 1991; Medlin et al., 1996; Nosenko et al., 2007; Read et al., 2013; Standeren, 2018). I v rámci haptofyt je možné uvést ještě vyšší hodnotu 10,82 pg z již zmíněné starší práce užívající neoptimalizovnou metodiku (Veldhuis et al., 1997). V rámci druhového komplexu *Emiliania huxleyi* byla popsána mezidruhová variabilita ve velikosti genomu od 0,18 – 0,76 pg (Medlin et al., 1996; Read et al., 2013), přičemž je vysvětlována vysokým zastoupením tandemových repetic v genomu(Read et al., 2013).

5.1.5 Ostatní

Kromě výše zmíněných skupin, jejichž genomy byly v rámci protist studovány, je zbytek protistní diverzity prostudován velice řídce. Z toho velké množství pozornosti však bylo věnováno parazitickým a patogenním skupinám protist. Z nich je možné jmenovat například Kinetoplastida, v rámci, kterých byly studovány především trypanozomy. Variabilita velikosti genomu napříč zástupci této skupiny pak byla přisouzena vlivu velkého množství transponovatelných elementů (Bradwell et al., 2018; Souza et al., 2011). Další parazitickou skupinou, které byla věnována pozornost, je třída Treponomadea a do ní patřící Diplomonády s typicky miniaturními genomy 0,01 pg (Adam et al., 2013; J. bing Fan et al., 1991; Franzén et al., 2013).

5.2 Souvislosti s fyziologickými vlastnostmi protisty

Velikost genomu napříč eukaryotní diverzitou souvisí s mnoha důležitými fyziologickými vlastnostmi. Pozitivní korelace velikosti buněk s velikostí genomu byla popsána napříč protistní diverzitou (Petrov, 2001; Shuter, 1983) a konkrétně pak v jednotlivých skupinách například u obrněnek (LaJeunesse et al., 2005), rozsivek (Connolly et al., 2008) zlativek (Olefeld, 2018), skrytěnek (Beaton & Cavalier-Smith, 1999) a krásivek (Poulíčková et al., 2014). Dalším často zmiňovaným parametrem, jenž někteří autoři uvádějí jakožto korelující s velikostí genomu, je rychlost dělení nebo celkově rychlost růstu daného organismu. Organismy s malými genomy pak vykazují rychlejší růst, zatímco organismy s velikými genomy disponují pomalým růstem (Gregory, 2005; Shuter 1983). Je však důležité zmínit, že tato korelace není přítomna v případě porovnávání příbuzných druhů s rozdílnou ploidií (Bennett, 1971; Cavalier-Smith, 2005)

Na základě těchto souvislostí pak Cavalier-Smith (1980) předkládá možné evoluční vysvětlení působení r- a K- selekce na protistní organismy. Minimalizace genomu, zmenšení

buněk a urychlení buněčného dělení jsou přitom následky působení r-selekce, zatímco K-selekce zvýhodňuje veliké buňky, s velkým genomem a pomalým buněčným dělením.

Zajímavý pohled na evoluci způsobu výživy a velikosti genomu nabízí v práci, která se zabývala zlativkami (Olefeld et al., 2018). U fototrofních zlativek autoři pozorovali relativně větší genomy (0,2 - 12,4 pg), zatímco u heterotrofních a mixotrofních zlativek pozorovali genomy menší (0,05-0,3 pg). Velikost genomu byla zároveň pozitivně korelující s objemem buněk. Autoři z výsledků usuzují, že na počátku evoluce zlativek byl fototrofní předek, který byl vlivem limitace zdrojů uhlíku nucen k zmenšení genomu a přechodu na jiný způsob výživy.

S velikostí genomu a způsobem života pak lze hledat spojení mezi parazitickými nebo symbiotickými organismy. Obecně jsou totiž organismy s takovým způsobem života charakterizovány malými genomy (Gregory, 2005). Jako příklady z protist lze uvést miniaturní genomy mikrosporídií (Pelin et al., 2016) nebo parazitických diplomonád (Wielinga et al., 2015), v případě symbiontů pak obrněnky rodu *Symbiodinium* (LaJeunesse et al., 2005). Miniaturizace genomů, těchto organizmů je zatím diskutována jako možný důsledek homogenního prostředí v rámci hostitelského organismu nebo jako potřeba rychlo růstu a dělení (Smith & Holt, 1996) .

Na další zajímavou ekologickou souvislost poukazují autoři práce studující velikost genomu u rozsivek (Von Dassow et al., 2008). Předkládají zde, že zvětšení genomu u některých z rozsivek, a na to navazující zvětšení objemu daných buněk, může mít za následek intenzivnější pokles větších mrtvých buněk do sedimentu (Von Dassow et al., 2008; Waite et al., 1997). Vzhledem k silnému zastoupení rozsivek v mořském fytoplanktonu (Simpson & Eglit, 2016) by taková změna ve velikosti genomu, mohla mít za následek navýšení exportu uhlíků na dna oceánů (Von Dassow et al., 2008).

6 Závěr

Velikost genomu představuje důležitý charakteristický znak organismů. Napříč diverzitou všech eukaryotických organismů přitom variuje v největším rozsahu právě mezi protisty (Gregory, 2001). Konkrétně široké spektrum velikostí protistních genomů, jejich krátká reprodukční doba a vysoké populační hustoty, činí z protist ideální modelové organismy pro studium velikosti genomu (Cavalier-Smith, 1980; Lynch & Conery, 2003; Simpson & Eglit, 2016). S velikostí genomu zároveň souvisí řada fyziologických parametrů, které mohou ovlivnit i ekologii organisumu.

Konkrétně studium protist se potýká s úskalím nutnosti kultivace zkoumaného organismu, aby bylo možné zajistit dostatečné množství biomasy (Mazalová et al., 2011).

Dalším problém je způsoben heterogenitou buněčných stěn a jiných povrchových struktur, které brání analýze jádra (Mazalová et al., 2011; Veldhuis et al., 1997). Stejně tak přítomnost sekundárních metabolitů v rámci některých skupin způsobuje problémy s analýzou genomu (Voglmayr, 2007).

V současné době je nejčastěji využívanou metodou pro studium velikosti genomu u protist průtoková cytometrie, která umožňuje rychle měření velikého množství částic. Protistní skupiny se však potýkají s neoptimalizovanou metodikou, pro přípravu vzorků a samotné měření. Konkrétně zde chybí dobře prostudované standardy (Johnston et al., 1999), a postupy pro izolaci jader širokého spektra heterogenních buněk protist (Mazalová et al., 2011). V případě, kdy není možné zajistit dostatečné množství buněk pro analýzu, jsou používány metody statické cytometrie (Feulgenova denzitometrie a mikrospektrofotometrie), které byly v ostatních případech pro svou časovou náročnost nahrazeny právě průtokovou cytometrií (Hardie et al., 2002). V případech organismů s relativně malými chromozomy je k analýze obsahu DNA možné použít pulzní gelovou elektroforézu, která zároveň umožňuje studovat karyotyp (Sibley & Boothroyd, 1992). Tato metoda je však časově velice náročná a zároveň vyžaduje složitou laboratorní přípravu (Wang & Liu, 2013). Paralelní zdroj dat o velikostech genomu pak představují projekty celogenomového sekvenování. Ty jsou limitované především finanční a výpočetní náročností studia větších genomů (Sibbald & Archibald, 2017). Z toho vyplývají nerovnoměrně rozložená data dosavadně sekvenovaných protist, zaměřující se především na parazitické zástupce s malými genomy.

Ve srovnání s dobře prostudovanými skupinami živočichů a rostlin (Gregory, 2005), je velikost genomu u protist stále nedostatečně prozkoumána a vyžaduje ještě mnoho dat a zejména ucelené metodické postupy pro jednotlivé protistní skupiny, které by umožnily lepší srovnání měření.

V návaznosti na tuto rešerši je plánovaná diplomová práce se zaměřením na studium velikosti genomu u rodu spájivých řas *Zygnema*. Pro naměřené hodnoty budou hledány souvislosti s fylogenezí jednotlivých linií a zároveň budou studovány případné kolerace velikosti genomu a různých ekofyziologických adaptací.

7 Seznam použité literatury

Adam, R. D., Dahlstrom, E. W., Martens, C. A., Bruno, D. P., Barbian, K. D., Ricklefs, S. M., Hernandez, M. M., Narla, N. P., Patel, R. B., Porcella, S. F., & Nash, T. E. (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of Genotypes A1 and E (WB and pig). *Genome Biology and Evolution*, *5*(12), 2498– 2511

Alduina, R., & Pisciotta, A. (2015). Pulsed Field Electrophoresis and Genome Size Estimates. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1231*, 1–13.

Aranda, M., Li, Y., Liew, Y. J., Baumgarten, S., Simakov, O., Wilson, M. C., Piel, J., Ashoor, H., Bougouffa, S., Bajic, V. B., Ryu, T., Ravasi, T., Bayer, T., Micklem, G., Kim, H., Bhak, J., LaJeunesse, T. C., & Voolstra, C. R. (2016). Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Scientific Reports*, *6*.

Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., … Rokhsar, D. S. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, *306*(5693), 79–86.

Beaton, M. J., & Cavalier-Smith, T. (1999). Eukaryotic non-coding DNA is functional: Evidence from the differential scaling of cryptomonad genomes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *266*(1433), 2053–2059.

Bennett, M. D. (1971). The duration of meiosis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *178*(1052), 277–299.

Bennett, M. D. (1972). Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. In *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences* (Vol. 181, Issue 63, pp. 109–135).

Bennett, M. D., & Leitch, I. J. (1995). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, *76*(2), 113–176.

Bennetzen, J. L., Ma, J., & Devos, K. M. (2005). Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany*, *95*(1), 127–132.

Bennnett, M. D. (1971). The duration of meiosis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *178*(1052), 277–299.

Bernander, R., Palm, J. E. D., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, *3*(1), 55–62.

Blazejewski, T., Nursimulu, N., Pszenny, V., Dangoudoubiyam, S., Namasivayam, S., Chiasson, M. A., Chessman, K., Tonkin, M., Swapna, L. S., Hung, S. S., Bridgers, J., Ricklefs, S. M., Boulanger, M. J., Dubey, J. P., Porcella, S. F., Kissinger, J. C., Howe, D. K., Grigg, M. E., & Parkinsona, J. (2015). Systems-based analysis of the *Sarcocystis neurona* genome identifies pathways that contribute to a heteroxenous life cycle. *MBio*, *6*(1).

Boucher, N., Vaulot, D., & Partensky, F. (1991). Flow cytometric determination of phytoplankton DNA in cultures and oceanic populations. *Marine Ecology Progress Series*, *71*(1), 75–84. https://doi.org/10.3354/meps071075

Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otillar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Grigoriev, I. V. (2008). The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, *456*(7219), 239–244.

Bradwell, K. R., Koparde, V. N., Matveyev, A. V., Serrano, M. G., Alves, J. M. P., Parikh, H., Huang, B., Lee, V., Espinosa-Alvarez, O., Ortiz, P. A., Costa-Martins, A. G., Teixeira, M. M. G., & Buck, G. A. (2018). Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–20.

Britten, R. J., & Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. In *Science* (Vol. 161, Issue 3841, pp. 529–540). Science.

Burton, K. (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in Enzymology*, *12*(PART B), 163–166.

Byers, T. J. (1986). Molecular Biology of DNA in *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba*, and *Naegleria*. *International Review of Cytology*, *99*(C), 311–341.

C.Boothroyd, J., Wang, A., David, A. C., & C.Wang, C. (1987). An unusually compact ribosomal DNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Research*, *15*, 4065–4084.

Cannell, R. J., Farmer, P., & Walker, J. M. (1988). Purification and characterization of pentagalloylglucose, and alpha-glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *The Biochemical Journal*, *255*(3), 937–941.

Cavalier-Smith, T. (1980). r- and K-tactics in the evolution of protist developmental systems: Cell and genome size, phenotype diversifying selection, and cell cycle patterns. *BioSystems*, *12*(1–2), 43–59.

Cavalier-Smith, Thomas. (2005). *Economy , Speed and Size Matter : Evolutionary Forces Driving Nuclear Genome Miniaturization and Expansion*. 147–175.

Cenci, U., Sibbald, S. J., Curtis, B. A., Kamikawa, R., Eme, L., Moog, D., Henrissat, B., Maréchal, E., Chabi, M., Djemiel, C., Roger, A. J., Kim, E., & Archibald, J. M. (2018). Nuclear genome sequence of the plastid-lacking cryptomonad *Goniomonas avonlea* provides insights into the evolution of secondary plastids. *BMC Biology*, *16*(1), 137.

Chun, A. R. (2017). Physiological, ultrastructure, and preliminary genomic characterization of the marine protist *Thraustochytrium sp* . LLF1b (class Labyrinthulomycetes). UNIVERSITY OF CALIFORNIA , SAN DIEGO.

Coleman, A. W., Maguire, M. J., & Coleman, J. R. (1981). Mithramycin- and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *29*(8), 959–968.

Connolly, J. A., Oliver, M. J., Beaulieu, J. M., Knight, C. A., Tomanek, L., & Moline, M. A. (2008). Correlated evolution of genome size and cell volume in diatoms (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *44*(1), 124–131.

Corradi, N., Pombert, J. F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis.* *Nature Communications*, *1*(6).

Corteggiani Carpinelli, E., Telatin, A., Vitulo, N., Forcato, C., D'Angelo, M., Schiavon, R., Vezzi, A., Giacometti, G. M., Morosinotto, T., & Valle, G. (2014). Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion. *Molecular Plant*, *7*(2), 323–335.

Courties, C., Perasso, R., Chrétiennot-Dinet, M. J., Gouy, M., Guillou, L., & Troussellier, M. (1998). Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology*, *34*(5), 844–849.

Curtis, B. A., Tanifuji, G., Maruyama, S., Gile, G. H., Hopkins, J. F., Eveleigh, R. J. M., Nakayama, T., Malik, S. B., Onodera, N. T., Slamovits, C. H., Spencer, D. F., Lane, C. E., Gray, M. W., Archibald, J. M., Burki, F., Hirakawa, Y., Reyes-Prieto, A., Keeling, P. J., Fast, N. M., … Mc Fadden, G. I. (2012). Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature*, *492*(7427), 59–65.

Darzynkiewicz, Z., Halicka, H. D., & Zhao, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *675*, 137–147.

Dean, P. N. (1987). Data Analysis in Cell Kinetics Research. In *Techniques in Cell Cycle Analysis* (pp. 207–253). Humana Press.

Dhillon, S. S., Rake, A. V., & Miksche, J. P. (1980). Reassociation Kinetics and Cytophotometric Characterization of Peanut (Arachis hypogaea L.) DNA . *Plant Physiology*, *65*(6), 1121–1127.

Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Letter to the editor. *Cytometry*, *51A*(2), 127–128.

Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., & Obermayer, R. (1998). Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Annals of Botany*, *82*(suppl_1), 17–26.

Doležel, J., & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, *95*(1), 99–110.

Doležel, J., & Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: Are we getting closer? In *Cytometry Part A* (Vol. 77, Issue 7, pp. 635–642).

Doležel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, *85*(4), 625–631.

Doolittle, W. F., & Sapienza, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, *284*(5757), 601–603.

Dörr, R., & Huss, V. A. R. (1990). Characterization of nuclear DNA in 12 species of *Chlorella* (chlorococcales, chlorophyta) by DNA reassociation. *BioSystems*, *24*(2), 145–155.

Ebenezer, T. G. E., Carrington, M., Lebert, M., Kelly, S., & Field, M. C. (2017). *Euglena gracilis* genome and transcriptome: Organelles, nuclear genome assembly strategies and initial features. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 979, pp. 125–140). Springer New York LLC.

Ekblom, R., & Wolf, J. B. W. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. In *Evolutionary Applications* (Vol. 7, Issue 9, pp. 1026–1042). Wiley-Blackwell.

Erlandsen, S. L., & Rasch, E. M. (1994). The DNA content of trophozoites and cysts of Giardia lamblia by microdensitometric quantitation of Feulgen staining and examination by laser scanning confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *42*(11), 1413–

Fan, J. B., Chikashige, Y., Smith, C. L., Niwa, O., Yanagida, M., & Cantor, C. R. (1989). Construction of a Not I restriction map of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Nucleic Acids Research*, *17*(7), 2801–2818.

Fan, J. bing, Korman, S. H., Cantor, C. R., & Smith, C. L. (1991). *Giardia lamblia*: Haploid genome size determined by pulsed field gel electrophoresis is less than 12 Mb. *Nucleic Acids Research*, *19*(8), 1905–1908.

Figueroa, R. I., Garcés, E., & Bravo, I. (2010). The use of flow cytometry for species identification and life-cycle studies in dinoflagellates. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *57*(3–4), 301–307.

Finnegan, D. J. (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, *5*(C), 103–107.

Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Ankarklev, J., Ferella, M., Andersson, B., & Svärd, S. G. (2013). Transcriptome Profiling of Giardia intestinalis Using Strand-specific RNA-Seq. *PLoS Computational Biology*, *9*(3), 11–13.

Friz, C. T. (1968). The biochemical composition of the free-living *Amoebae Chaos chaos*, *Amoeba dubia* and *Amoeba proteus*. *Comparative Biochemistry And Physiology*, *26*(1), 81–90.

Galbraith, D. W. (1990). Flow Cytometric Analysis of Plant Genomes. *Methods in Cell Biology*, *33*(C), 549–562.

Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, *220*(4601), 1049–1051.

Galbraith, D. W., Lambert, G. M., Macas, J., & Dolezel, J. (1997). Analysis of Nuclear DNA Content and Ploidy in Higher Plants. *Current Protocols in Cytometry*, *2*(1), 7.6.1-7.6.22.

Gobler, C. J., Berry, D. L., Dyhrman, S. T., Wilhelm, S. W., Salamov, A., Lobanov, A. V., Zhang, Y., Collier, J. L., Wurch, L. L., Kustka, A. B., Dill, B. D., Shah, M., VerBerkmoes, N. C., Kuo, A., Terry, A., Pangilinan, J., Lindquist, E. A., Lucas, S., Paulsen, I. T., Grigoriev, I. V. (2011). Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(11), 4352–4357.

GrahaM, J. e., WilcOx, L. W., & GrahaM, L. . (2008). *Algae (2nd Edition)*. Benjamin Cummings, San Francisco, CA.

Gregory, T. Ryan. (2005). The evolution of the genome. Elsevier Academic.

Gregory, T. Ryan. (2004). Macroevolution, hierarchy theory, and the C-value enigma. *Paleobiology*, *30*(2), 179–202.

Gregory, T.R. (2020). Animal Genome Size Database. http://www.genomesize.com

Gregory, T Ryan. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C-value enigma. *Biological Reviews*, *76*(1), 65–101.

Gregory, T Ryan. (2005). The C-value Enigma in Plants and Animals : A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annals of Botany* 133–146.

Greilhuber, J. (1998). Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Annals of Botany*, *82*(SUPPL. A), 27–35.

Greilhuber, Johann, Doležel, J., Lysák, M. A., & Bennett, M. D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, *95*(1), 255–260.

Greilhuber, Johann, Temsch, E. M., & Loureiro, J. C. M. (2007). Nuclear DNA Content Measurement. In *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes* (pp. 67–101).

Hardie, D. C., Gregory, T. R., & Hebert, P. D. N. (2002). From Pixels to Picograms : A Beginners ’ Guide to Genome Quantification by Feulgen Image *Analysis Densitometry*. *50*(6), 735–749.

Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. In *Genomics* (Vol. 107, Issue 1, pp. 1–8). Academic Press Inc.

Herschleb, J., Ananiev, G., & Schwartz, D. C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, *2*(3), 677–684.

Hessen, D. O., Daufresne, M., & Leinaas, H. P. (2013). Temperature-size relations from the cellular-genomic perspective. *Biological Reviews*, *88*(2), 476–489.

Higashiyama, T., & Yamada, T. (1991). Electrophoretic karyotyping and chromosomal gene mapping of *Chlorella*. *Nucleic Acids Research*, *19*(22), 6191–6195.

Holm-Hansen, O. (1969). Algae: Amounts of DNA and organic carbon in single cells. *Science*, *163*(3862), 87–88.

Hong, H., Lee, H., Jo, J., Kim, H. M., Kim, S., Yeon, J., Jeon, C. B., Kang, H., Park, M. G., Park, C., & Kim, Y. (2016). The exceptionally large genome of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae): determination by flow cytometry. *Algae 31*(4), 373–378.

Houdan, A., Billard, C., Marie, D., Not, F., Sâez, A. G., Young, J. R., & Probert, I. (2004). Holococcolithophore- heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: Flow cytometric analysis of relative ploidy levels. *Systematics and Biodiversity*, *1*(4), 453–465.

Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J. O., Svärd, S. G., & Andersson, B. (2010). Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics*, *11*(1), 11-13.

John, U., Beszteri, S., Glöckner, G., Singh, R., Medlin, L., & Cembella, A. D. (2010). Genomic characterisation of the ichthyotoxic prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*, and the expression of polyketide synthase genes in synchronized cultures. *European Journal of Phycology*, *45*(3), 215–229.

Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, *86*(5), 609–613.

Jones, S. H., Lew, A. E., Jorgensen, W. K., & Barker, S. C. (1997). *Babesia bovis*: Genome size, number of chromosomes and telomeric probe hybridisation. *International Journal for Parasitology*, *27*(12), 1569–1573

Kapraun, D. F. (2007). Nuclear DNA content estimates in green algal lineages: Chlorophyta and streptophyta. *Annals of Botany*, *99*(4), 677–701.

Kapraun, D. F., & Freshwater, D. W. (2012). Estimates of nuclear DNA content in red algal lineages. *Annals of Botany PLANTS*, *2012*, pls005.

Kates, J. R., Chiang, K. S., & Jones, R. F. (1968). Studies on DNA replication during synchronized vegetative growth and gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Experimental Cell Research*, *49*(1), 121–135.

Keeling, P. J., & Burki, F. (2019). Progress towards the Tree of Eukaryotes. In *Current Biology* (Vol. 29, Issue 16, pp. R808–R817). Cell Press.

Kidwell, M. G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, *115*(1), 49–63.

Kissane J. M., & Robins, E. (1958). The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, *233*(1), 184–188.

Knight, C. A., Molinari, N. A., & Petrov, D. A. (2005). The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany*, *95*(1), 177–190.

Koester, J. A., Swalwell, J. E., Von Dassow, P., & Armbrust, E. V. (2010). Genome size differentiates co-occurring populations of the planktonic diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyta). *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 1–11.

Kron, P., Suda, J., & Husband, B. C. (2007). Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and SystematicsKron, P., Suda, J., & Husband, B. C. (2007). Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 38(1), 847–876. Https://Doi.Org/1*, *38*(1), 847–876.

Kullman, B. Tamm, H., & Kullman, K. (2005). *Fungal Genome Size Database,*. http://www.zbi.ee/fungal-genomesize/

Kullman, B. (2000). Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi. *Folia Cryptog. Estonica*, *36*, 31–46.

LaJeunesse, T. C., Lambert, G., Andersen, R. A., Coffroth, M. A., & Galbraith, D. W. (2005). *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *Journal of Phycology*, *41*(4), 880–886.

Leitch, I., Johnston, E., Pellicer, J., Hidalgo, O., & Bennett, M. (2019). *Plant DNA C-values Database (release 7.1)*. https://cvalues.science.kew.org/search

Liu, H., Stephens, T. G., González-Pech, R. A., Beltran, V. H., Lapeyre, B., Bongaerts, P., Cooke, I., Aranda, M., Bourne, D. G., Forêt, S., Miller, D. J., van Oppen, M. J. H., Voolstra, C. R., Ragan, M. A., & Chan, C. X. (2018). *Symbiodinium* genomes reveal adaptive evolution of functions related to coral-dinoflagellate symbiosis. *Communications Biology*, *1*, 95.

Loeblich, A. R., Schmidt, R. J., & Sherley, J. L. (1981). Scanning electron microscopy of *Heterocapsa pygmaea* sp. nov., and evidence for polyploidy as a speciation mechanism in dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*, *3*(1), 67–79.

Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B. P., Ajioka, J. W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J. C., Boyle, J. P., Dardé, M. L., Diaz-Miranda, M. A., Dubey, J. P., Fritz, H. M., Gennari, S. M., Gregory, B. D., … Sibley, L. D. (2016). Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications*, 7:10147.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Santos, C., Doležel, J., & Suda, J. (2008). *FLOWer: A Plant DNA Flow Cytometry Database*. (Release 1.0, May 2008). http://flower.web.ua.pt/

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006a). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, *98*(3), 679–689.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006b). Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany*, *98*(3), 515–527.

Lynch, M., & Conery, J. S. (2003). The Origins of Genome Complexity. *Science*, *302*(5649), 1401–1404.

Majda, S., Boenigk, J., Beisser, D., & Archibald, J. (2019). Intraspecific Variation in Protists: Clues for Microevolution from *Poteriospumella lacustris* (Chrysophyceae). *Genome Biology and Evolution*, *11*(9), 2492–2504.

Maleszka, R. (1993). Electrophoretic analysis of the nuclear and organellar genomes in the ultra-small alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Current Genetics*, *24*(6), 548–550.

Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., & Vaulot, D. (2000). DNA/RNA Analysis of Phytoplankton by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, *11*(1), 11.12.1-11.12.14.

Marie, D., Vaulot, D., & Partensky, F. (1996). Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(5), 1649–1655.

Mazalová, P., Šarhanová, P., Ondřej, V., & Poulíčková, A. (2011). Quantification of DNA content in freshwater microalgae using flow cytometry: A modified protocol for selected green microalgae. *Fottea*, *11*(2), 317–328.

Medlin, L. K., Barker, G. L. A., Campbell, L., Green, J. C., Hayes, P. K., Marie, D., Wrieden, S., & Vaulot, D. (1996). Genetic characterisation of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). *Journal of Marine Systems*, *9*(1–2), 13–31.

Menzel, D., Kazlauskas, R., & Reichelt, J. (1983). Coumarins in the Siphonalean Green Algal Family Dasycladaceae Kiitzing (Chlorophyceae). *Botanica Marina*, *26*(1), 23–30.

Mirsky, A. E., & Ris, H. (1951). The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *The Journal of General Physiology*, *34*(4), 451–462.

Mock, T., Otillar, R. P., Strauss, J., McMullan, M., Paajanen, P., Schmutz, J., Salamov, A., Sanges, R., Toseland, A., Ward, B. J., Allen, A. E., Dupont, C. L., Frickenhaus, S., Maumus, F., Veluchamy, A., Wu, T., Barry, K. W., Falciatore, A., Ferrante, M. I., Grigoriev, I. V. (2017). Evolutionary genomics of the cold-Adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature*, *541*(7638), 536–540.

Morzaria, S. P., & Young, J. R. (1992). Restriction mapping of the genome of the protozoan parasite *Theileria parva* (pulsed-field gel electrophoresis/chromosomes/Sfi I linking clones). In *Genetics* (Vol. 89).

Mukherjee, S., Stamatis, D., Bertsch, J., Ovchinnikova, G., Katta, H. Y., Mojica, A., Chen, I.-M. A., Kyrpides, N. C., & Reddy, T. B. K. (2019). Genomes OnLine database (GOLD) v.7: updates and new features. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D649–D659.

Muravenko, O., Selyakh, I., Kononenko, N., & Stadnichuk, I. (2001). Chromosome numbers and nuclear dna contents in the red microalgae *Cyanidium caldarium* and three galdieria species. *European Journal of Phycology*, *36*(3), 227–232.

Nakamura, D., Tiersch, T. R., Douglass, M., & Chandler, R. W. (1990). Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. *Cytogenetic and Genome Research*, *53*(4), 201–205.

Nash, T. E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J. B., Conrad, J. D., & Gillin, F. D. (1985). Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *Journal of Infectious Diseases*, *152*(1), 64–73.

Nelson, D. R., Chaiboonchoe, A., Fu, W., Hazzouri, K. M., Huang, Z., Jaiswal, A., Daakour, S., Mystikou, A., Arnoux, M., Sultana, M., & Salehi-Ashtiani, K. (2019). Potential for Heightened Sulfur-Metabolic Capacity in Coastal Subtropical Microalgae. *IScience*, *11*, 450–465.

Noirot, M., Barre, P., Louarn, J., Duperray, C., & Hamon, S. (2000). Nucleus-cytosol interactions - A source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Annals of Botany*, *86*(2), 309–316.

Nosenko, T., Boese, B., & Bhattacharya, D. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of genome size and structure in *Pavlova gyrans* and *Diacronema sp*. (Haptophyta). *Journal of Phycology*, *43*(4), 763–767.

Ohno, S. (1972). So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symposia in Biology*, *23*, 366–370.

Olefeld, J. L., Majda, S., Albach, D. C., Marks, S., & Boenigk, J. (2018). Genome size of chrysophytes varies with cell size and nutritional mode. *Organisms Diversity and Evolution*, *18*(2), 163–173.

Oliver, M. J., Petrov, D., Ackerly, D., Falkowski, P., & Schofield, O. M. (2007). The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. *Genome Research*, *17*(5), 594–601.

Orgel, L. E., & Crick, F. H. C. (1980). Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, *284*(5757), 604–607.

Pagel, M., & Johnstone, R. A. (1992). Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *249*(1325), 119–124.

Parrow, M. W., & Burkholder, J. A. M. (2002). Flow cytometric determination of zoospore DNA content and population DNA distribution in cultured *Pfiesteria spp.* (Pyrrhophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *267*(1), 35–51.

Peacock, L., Ferris, V., Bailey, M., & Gibson, W. (2014). Mating compatibility in the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. *Parasites and Vectors*, *7*(1), 1–10.

Pelin, A., Moteshareie, H., Sak, B., Selman, M., Naor, A., Eyahpaise, M. E., Farinelli, L., Golshani, A., Kvac, M., & Corradi, N. (2016). The genome of an *Encephalitozoon cuniculi* type III strain reveals insights into the genetic diversity and mode of reproduction of a ubiquitous vertebrate pathogen. *Heredity*, *116*(5), 458–465.

Petrov, D. A. (2001). Evolution of genome size: New approaches to an old problem. In *Trends in Genetics* (Vol. 17, Issue 1, pp. 23–28).

Pflug, J., Johnston, J. S., Holmes, V. R., Burrus, C., & Maddison, D. R. (2019). Measuring genome sizes using read-depth, k-mers, and flow cytometry: methodological comparisons in beetles (Coleoptera). *BioRxiv*, *September*, 761304.

Phillips, N., Kapraun, D. F., Gómez Garreta, A., Ribera Siguan, M. A., Rull, J. L., Salvador Soler, N., Lewis, R., & Kawai, H. (2011). Estimates of nuclear DNA content in 98 species of brown algae (Phaeophyta). *AoB PLANTS*, *2011*, plr001.

Poulíčková, A., Mazalová, P., Vašut, R. J., Šarhanová, P., Neustupa, J., & Škaloud, P. (2014). DNA content variation and its significance in the evolution of the genus *Micrasterias* (desmidiales, streptophyta). *PLoS ONE*, *9*(1).

Qingwei, D., Sui, Z., Lianpeng, C., Huihui, W., Yuan, L., Ping, M., Erlei, S., Niaz, Z., & Zhou, Q. (2016). Genome size of *Alexandrium catenella* and *Gracilariopsis lemaneiformis* estimated by flow cytometry. *Journal of Ocean University of China*, *15*(4), 704–710.

Radcliff, G., & Jaroszeski, M. J. (1998). Basics of flow cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *91*, 1–24.

Rasch, E. M. (1974). The DNA content of sperm and hemocyte nuclei of the silkworm, Bombyx mori L. *Chromosoma*, *45*(1), 1–26.

Rawson, J. R. Y. (1975). The characterization of *Euglena gracilis* DNA by its reassociation kinetics. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, *402*(2), 171–178.

Read, B. A., Kegel, J., Klute, M. J., Kuo, A., Lefebvre, S. C., Maumus, F., Mayer, C., Miller, J., Monier, A., Salamov, A., Young, J., Aguilar, M., Claverie, J. M., Frickenhaus, S., Gonzalez, K., Herman, E. K., Lin, Y. C., Napier, J., Ogata, H.. Wurch, L. L. (2013). Pan genome of the phytoplankton *Emiliania* underpins its global distribution. *Nature*, *499*(7457), 209–213.

Reinecke, D. L., Castillo-Flores, A., Boussiba, S., & Zarka, A. (2018). Polyploid polynuclear consecutive cell-cycle enables large genome-size in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, *33*, 456–461.

Ribeiro, S., Berge, T., Lundholm, N., & Ellegaard, M. (2013). Hundred Years of Environmental Change and Phytoplankton Ecophysiological Variability Archived in Coastal Sediments. *PLoS ONE*, *8*(4).

Rizzo, P. J., & Noodén, L. D. (1973). Isolation and Chemical Composition of Dinoflagellate Nuclei. *The Journal of Protozoology*, *20*(5), 666–672. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1973.tb03595.x

Roxström-Lindquist, K., Jerlström-Hultqvist, J., Jørgensen, A., Troell, K., Svärd, S. G., & Andersson, J. O. (2010). Large genomic differences between the morphologically indistinguishable diplomonads *Spironucleus barkhanus* and *Spironucleus salmonicida*. *BMC Genomics*, *11*(1), 258.

Shirley, M. W. (1994). The genome of Eimeria tenella: Further studies on its molecular organisation. *Parasitology Research*, *80*(5), 366–373. https://doi.org/10.1007/BF00932373

Shuter, B. J., Thomas, J. E., Taylor, W. D., & Zimmerman, A. M. (1983). Phenotypic correlates of genomic DNA content in unicellular eukaryotes and other cells. *American Naturalist*, *122*(1), 26–44.

Shuter, Brian J, Thomas, J. E., Taylor, W. D., & Zimmerman, A. M. (1983). Phenotypic correlates of genomic DNA content in unicellular eukaryotes and other cells. *American Naturalist*, *122*(1), 26–44.

Sibbald, S. J., & Archibald, J. M. (2017). More protist genomes needed. *Nature Ecology and Evolution*, *1*(5), 1–3.

Sibley, L. D., & Boothroyd, J. C. (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *51*(2), 291–300.

Simon, N., Barlow, R. G., Marie, D., Partensky, F., & Vaulot, D. (1994). Characterization of oceanic photosytnhetic picoeukaryotes by flow cytometry. *Journal of Phycology*, *30*(6), 922–935.

Simpson, A. G. B., & Eglit, Y. (2016). Protist Diversification. In *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (pp. 344–360). Elsevier.

Simpson, J. T., & Pop, M. (2015). The Theory and Practice of Genome Sequence Assembly. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *16*(1), 153–172.

Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, *67*(1), 6–20.

Smith, C. L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J. Bin, Yanagida, M., & Cantor, C. R. (1987). An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, *15*(11), 4481–4489.

Smith, V. H., & Holt, R. D. (1996). Resource competition and within-host disease dynamics. *Trends in Ecology and Evolution*, *11*(9), 386–389.

Sohn, J. Il, & Nam, J. W. (2018). The present and future of de novo whole-genome assembly. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(1), 23–40.

Sorhannus, U. (2007). A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution. *Marine Micropaleontology*, *65*(1–2), 1–12.

Souza, R. T., Lima, F. M., Barros, R. M., Cortez, D. R., Santos, M. F., Cordero, E. M., Ruiz, J. C., Goldenberg, S., Teixeira, M. M. G., & da Silveira, J. F. (2011). Genome size, karyotype

polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi. PLoS ONE*, *6*(8), e23042.

Spring, H., Trendelenburg, M., Scheer, U., Cytobiologie, W. F.-, & 1974, U. (1974). Structural and biochemical studies of the primary nucleus of two green algal species, *Acetabularia mediterranea* and *Acetabularia major*. *Cytobiologie*, *10*(1), 1–65.

Standeren, E. (2018). *Cell- and genome size responses to different temperatures in haptophytes* [University of Oslo]. http://urn.nb.no/URN:NBN:no-69388

Starkenburg, S. R., Polle, J. E. W., Hovde, B., Daligault, H. E., Davenport, K. W., Huang, A., Neofotis, P., & McKie-Krisberg, Z. (2017). Draft nuclear genome, complete chloroplast genome, and complete mitochondrial genome for the biofuel/ bioproduct feedstock species *Scenedesmus obliquus* strain DOE0152z. *Genome Announcements*, *5*(32).

Swift, H. (1950). The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *36*(11), 643–654.

Takahashi, H., Suzuki1, K., Ohta2, N., Suzuki1, T., Takano1, H., Kawano1, S., & Kuroiwa1, T. (1993). An Electrophoretic Karyotype of *Cyanidioschyzon merolae. Cytologia,* 58, 477-482.

Thomas, C. A. (1971). The Genetic Organization of Chromosomes. *Annual Review of Genetics*, *5*(1), 237–256.

Thomas, P. S., & Farquhar, M. N. (1978). Specific measurement of DNA in nuclei and nucleic acids using diaminobenzoic acid. *Analytical Biochemistry*, *89*(1), 35–44.

Toda, K., Takahashi, H., Itoh, R., & Kuroiwa, T. (1995). DNA Contents of Cell Nuclei in Two Cyanidiophyceae: *Cyanidioschyzon merolae* and *Cyanidium caldarium* Forma A. *Cytologia*, *60*(2), 183–188. 3

Triplett, E. L., Govind, N. S., Roman, S. J., Jovine, R. V. M., & Prezelin, B. B. (1993). Characterization of the sequence organization of DNA from the dinoflagellate *Heterocapsa pygmaea* (Glenodinium sp.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *2*(4), 239–245.

Van der Ploeg, L. H. t., Smith, C. L., Polvere, R. I., & Gottesdiener, K. M. (1989). Improved separation of chromosome-sized DNA from *Trypanosoma brucei*, stock 427-60. *Nucleic Acids Research*, *17*(8), 3217–3227.

Van Der Ploeg, L. H. T., Smits, M., Ponnudurai, T., Vermeulen, A., Meuwissen, J. H. E. T., & Langsley, G. (1985). Chromosome-sized DNA molecules of *Plasmodium falciparum*. *Science*, *229*(4714), 658–661.

Vaulot, D., Olson, R. J., & Chisholm, S. W. (1986). Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Experimental Cell Research*, *167*(1), 38–52.

Vaulot, D., Birrien, J. -L, Marie, D., Casotti, R., Veldhuis, M. J. W., Kraay, G. W., & Chrétiennot-Dinet, M. -J. (1994). Moprhology, ploidy, pigment composition, genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology*, *30*(6), 1022–1035.

Veldhuis, M. J. W., Cucci, T. L., & Sieracki, M. E. (1997). Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: Taxonomic and ecological implications. *Journal of Phycology*, *33*(3), 527–541.

Vilhar, B., Greilhuber, J., Koce, J. D., Temsch, E. M., & Dermastia, M. (2001). Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany*, *87*(6), 719–728. https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1394

Vindeløv, L. L., Christensen, I. J., & Nissen, N. I. (1983). Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry*, *3*(5), 328–331.

Vinogradov, A. E. (1994). Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry*, *16*(1), 34–40.

Voglmayr, H. (2007). DNA Flow Cytometry in Non-Vascular Plants. In *Flow Cytometry with Plant Cells* (pp. 267–286). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Vollrath, D., & Davis, R. W. (1987). Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucleic Acids Research*, *15*(19), 7865–7876.

Von Dassow, P., Petersen, T. W., Chepurnov, V. A., & Virginia Armbrust, E. (2008). Inter- and intraspecific relationships between nuclear DNA content and cell size in selected members of the centric diatom genus *Thalassiosira* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *44*(2), 335–349.

Waite, A., Fisher, A., Thompson, P., & Harrison, P. (1997). Sinking rate versus cell volume relationships illuminate sinking rate control mechanisms in marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, *157*, 97–108.

Wang, C. X., & Liu, S. L. (2013). Pulsed-field Gel Electrophoresis. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 529–531). Elsevier Inc.

Wargo, M. J., & Rizzo, P. J. (2000). Characterization of *Gymnodinium mikimotoi* (Dinophyceae) and identifacition of the major histone like protein, HGm. *Journal of Phycology*, *36*(3), 584–589.

Weiss, T. L., Spencer Johnston, J., Fujisawa, K., Sumimoto, K., Okada, S., Chappell, J., & Devarenne, T. P. (2010). Phylogenetic placement, genome size, and gc content of the liquid-hydrocarbon-producing green microalga *Botryococcus braunii* strain berkeley (showa) (chlorophyta). *Journal of Phycology*, *46*(3), 534–540.

Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, *42*(1), 225–249.

Whiteley, A. S., Burkill, P. H., & Sleigh, M. A. (1993). Rapid method for cell cycle analysis in a predatory marine dinoflagellate. *Cytometry*, *14*(8), 909–915.

Wielinga, C., Thompson, R. C. A., Monis, P., & Ryan, U. (2015). Identification of polymorphic genes for use in assemblage B genotyping assays through comparative genomics of multiple assemblage B *Giardia duodenalis* isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *201*(1), 1–4.

Wilhelm, J., Pingoud, A., & Hahn, M. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research, 31*(10).

Wong, P. B. Y., Wiley, E. O., Johnson, W. E., Ryder, O. A., O'Brien, S. J., Haussler, D., Koepfli, K. P., Houck, M. L., Perelman, P., Mastromonaco, G., Bentley, A. C., Venkatesh, B., Zhang, Y. P., & Murphy, R. W. (2012). Tissue sampling methods and standards for vertebrate genomics. In *GigaScience* (Vol. 1, Issue 1, p. 8). Oxford University Press. 1-8

Yamamoto, M., Handa, S., & Kawano, S. (2011). DNA Content of *Stichococcus bacillaris (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)* Nuclei Determined with Laser Scanning Cytometry. *Cytologia, 76*(2), 157–161.

Yamamoto, M., Nozaki, H., Sag, N., & Butcher, N. (2001). Evolutionarty relationshjips among multiple modes of sell diovision in the genus Nannochloris (Chlorophyta) revealed by genome size, actin gene multiplicity, and phylogeny. *Journal of Phycology, v*. 37 106–120.

Zhu, X., Li, S., Liu, L., Li, S., Luo, Y., Lv, C., Wang, B., Cheng, C. H. K., Chen, H., & Yang, X. (2020). Genome sequencing and analysis of *Thraustochytriidae sp*. SZU445 provides novel insights into the polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway. *Marine Drugs*, *18*(2).

Zubáčová, Z., Cimbůrek, Z., & Tachezy, J. (2008). Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *161*(1), 49–54. 4