Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Protistologie

Studijní obor: N-PROT

Bc. Natálie Čížková

Evoluce množství jaderné DNA rodu *Mallomonas* a její souvislost s ekofyziologií

Evolution of nuclear DNA content variation in the genus *Mallomonas* and its ecophysiological consequences

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Dora Čertnerová, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze 28.4.2024

Čížková

……..

Natálie Čížková

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Doře Čertnerové, Ph.D. za veškerou ochotu, cenné rady při zpracování diplomové práce a motivaci v průběhu celého magisterského studia. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi doc. Mgr. Pavlovi Škaloudovi, Ph.D. za pomoc s fylogenetickým stromem a poskytnutí řasových kultur. Mé velké díky rozhodně patří i Ing. Haně Šípkové, Ph.D. za pomoc v cytometrické laboratoři a trpělivost při seřizováním cytometru. Dále nesmím opomenout své spolužáky a členy algologického oddělení Přf UK za podnětné rady v postupu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svému příteli Strahinjovi za psychickou podporu a v neposlední řadě moc děkuji celé své rodině a kamarádům, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia.

Abstrakt

Variabilita velikosti genomu mezi eukaryoty a souvislosti vyplývající z této variability jsou z velké části stále neznámé. To platí zejména pro jednobuněčné eukaryotické organismy neboli protista, o jejichž obsahu jaderné DNA je k dispozici jen minimum údajů. Napříč studiemi zabývajícími se rostlinami či živočichy však bylo mnohokrát prokázáno, že je velikost genomu úzce spjata s velikostí buňky a může také souviset s dalšími ekofyziologickými parametry, jako je například rychlost růstu, rychlost metabolismu anebo životní strategie. U protist představuje buňka jejich celé tělo a umožnuje tak sledovat přímý vliv velikosti genomu na fenotypové projevy organismu. V této diplomové práci se podařilo pomocí průtokové cytometrie stanovit absolutní množství jaderné DNA pro 165 kmenů rodu *Mallomonas* (Chrysophyceae, Stramenopila) náležících k 64 druhům, čímž byla odhalena diverzita v množství jaderné DNA pro téměř 1/4 celosvětově uznávané diverzity tohoto rodu. Na základě získaných dat byla zjištěna až 100násobná variabilita v množství jaderné DNA napříč druhy *Mallomonas* (0.12 pg – 11.4 pg). Detekovaná vnitrodruhová variabilita v množství jaderné DNA ukazuje na působení nejrůznějších evolučních mechanismů. Násobné změny (i v rámci blízce příbuzných druhů) naznačují, že u rodu *Mallomonas* zřejmě dochází k častému procesu polyploidizace. Zároveň byly na základě rekonstrukce fylogeneze jednotlivých linií sledovány evolučních trendy ve změně množství jaderné DNA. Pomocí lineární a PGLS regrese byly dále vysvětleny vzájemné vztahy mezi množstvím jaderné DNA a ekofyziologickými parametry jednotlivých linií – velikost buňky, rychlost pohybu, ekologické nároky. Pozitivní vztah byl prokázán pro velikost buněk, zatímco v případě rychlosti pohybu a environmentálních proměnných nebyla pozorována žádná závislost. Tato diplomová práce je zároveň první zmínkou pojednávající o potencionálním vzniku částečné endoreduplikace u jednobuněčných organismů.

Klíčová slova: velikost genomu, velikost buňky, průtoková cytometrie, *Mallomonas*, evoluce, rychlost pohybu buňky

Abstract:

The variability of genome size among eukaryotes and its consequences remains largely unknown. This is particularly true for unicellular eukaryotic organisms, also known as protists, whose nuclear DNA content is still largely unexplored. Across plants or animal studies, it has been repeatedly demonstrated that genome size is closely associated with cell size and may also be related to other eco-physiological parameters, such as growth rate, metabolic rate, or life strategy. In protists, the cell represents their entire body, allowing for the direct assessment of the impact of genome size on organismal phenotypic traits. In this thesis, with the use of flow cytometry, the absolute amount of nuclear DNA was estimated for 165 strains of the genus *Mallomonas* (Chrysophyceae) belonging to 64 species, revealing diversity in nuclear DNA content for nearly 1/4 of the globally recognized diversity of this genus. Based on the obtained data, up to 100-fold variability in nuclear DNA content was found across *Mallomonas* species (0.12 pg – 11.4 pg). Detected intraspecific variability in nuclear DNA content suggests the influence of various evolutionary mechanisms, for example multiple-fold difference in DNA content (even within closely related species) suggest frequent polyploidization in the genus *Mallomonas*. Furthermore, evolutionary trends were examined based on phylogenetic reconstruction of DNA content evolution. In addition, relationships between nuclear DNA content and eco-physiological parameters of cells – cell size, velocity, and ecological requirements – were investigated using linear and PGLS regression. A positive relationship was revealed for cell size, while no dependence was observed in the case of velocity and environmental variables. This thesis also discusses the potential presence of partial endoreduplication in unicellular organisms for the first time.

Key words: genome size, cell size, flow cytometry, *Mallomonas*, evolution, cell velocity

Seznam použitých zkratek:

BS	Buněčná stěna
CCM	Carbon Concentrating Mechanism
CRBC	Chicken Red Blood Cells
CV	Koeficient variability
DAPI	4',6diamidin-2-fenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EB	Ethidium Bromide
FCM	Flow Cytometry Method
FSC	Forward Scatter
ML	Maximum Likelihood
PGLS	Phylogenetic Generalized Least Squares
PI	Propidium Iodide
SSC	Side Scatter
TEs	Transponovatelné elementy
WGD	Whole Genome Duplication
WGS	Whole Genome Sequencing

Obsah

1 Úvod ... 1
1.1 Variabilita velikosti genomu u eukaryot ... 1
1.1.1 Variabilita velikosti genomu u protist ... 2
1.1.2 Mechanismy ovlivňující velikost genomu ... 3
1.1.3 Souvislost velikosti genomu s dalšími vlastnostmi organismů ... 5
1.2 Metody stanovení množství jaderné DNA ... 7
1.2.1 Průtoková cytometrie ... 8
1.3 Základní charakteristika třídy Chrysophyceae ... 12
1.3.1 Velikost genomu v rámci třídy Chrysophyceae ... 13
1.3.2 Modelový rod *Mallomonas* ... 14
2 Cíle práce ... 17
3 Metodika ... 18
3.1 Kultivace rodu *Mallomonas* in vitro ... 18
3.2 Stanovení obsahu jaderné DNA ... 20
3.2.1 Příprava vzorku na FCM ... 20
3.2.2 Příprava standardů pro FCM ... 20
3.2.3 Analýza množství jaderné DNA a procentuálního zastoupení GC párů bází ... 20
3.3 Analýza píků s odlišnou intenzitou fluorescence ... 22
3.4 Analýza rychlosti pohybu ... 24
3.5 Analýza velikosti buňky ... 25
3.6 Analýza ekologických proměnných ... 26
3.6.1 Vytvoření mapy geografického rozšíření ... 27
3.7 Rekonstrukce evoluce velikosti genomu ... 28
3.8 Statistická analýza dat ... 28
4 Výsledky ... 29
4.1 Variabilita v množství jaderné DNA v rámci rodu *Mallomonas* ... 29
4.2 Analýza píků s odlišnou intenzitou fluorescence ... 30
4.3 Rekonstrukce evoluce množství jaderné DNA ... 31
4.4 Vztah velikosti buňky s množstvím jaderné DNA ... 34
4.5 Analýza rychlosti pohybu a její souvislost s množstvím DNA/velikostí buňky ... 37
4.6 Vztah geografického rozšíření, environmentálních proměnných a množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas* ... 39
4.6.1 Souvislost s environmentálními proměnnými ... 40

5 Diskuze 46
5.1 Průtoková cytometrie 46
5.2 Možný původ detekovaných píků s odlišnou intenzitou fluorescence 47
5.3 Srovnání množství jaderné DNA u modelového rodu *Mallomonas* 48
5.3.1 Vnitrodruhová variabilita v množství DNA u rodu *Mallomonas* a polyploidizace jako možný významný mechanismus jejího vzniku 49
5.4 Vztah velikosti buňky a množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas* 51
5.5 Vztah rychlosti pohybu a množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas* 52
5.6 Environmentální nároky a geografické rozšíření ve vztahu s obsahem DNA 53
6 Závěr 56
7 Zdroje 57
8 Přílohy 67

1 Úvod

Velikost genomu kvantitativně vyjadřuje celkové množství DNA v jádře buňky. Tato velikost se udává pomocí tzv. C-hodnoty (angl. *C-value*) odpovídající množství DNA v jedné haploidní sadě chromozomů (Swift, 1950). Kvantifikace obsahu jaderné DNA může být provedena buď v počtu párů bází (bp, Mbp, Gbp) nebo v jednotkách hmotnosti – pikogramů (pg), kdy 1 pg odpovídá přibližně 978 Mbp (Sessions, 2013).

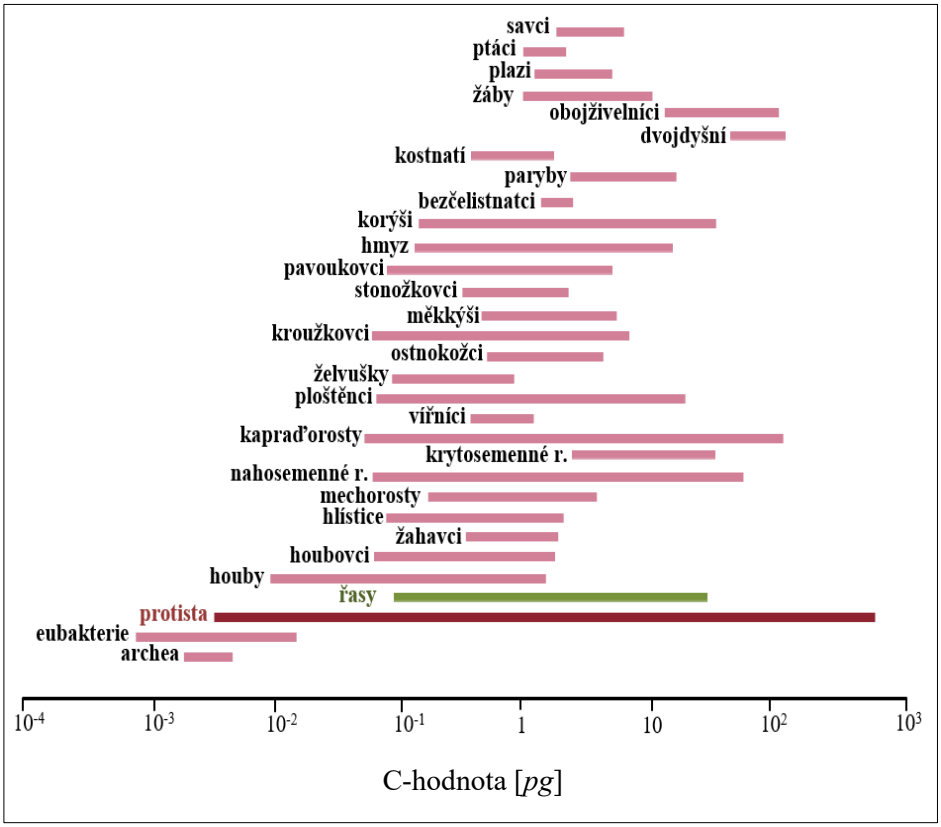
1.1 Variabilita velikosti genomu u eukaryot

Diverzita velikosti genomu mezi eukaryoty je více než 200 000násobná (Gregory (2001); obr. 1)). Například u rostliny *Paris japonica* dosahuje 1C velikost genomu hodnoty 148.8 Gbp, což je 50krát více, než u lidí (1C = 3.2 Gbp; (Gregory, 2001)), a přitom se z hlediska komplexity jedná o jednodušší organismus (Hidalgo, et al., 2017; Pellicer, et al., 2010). Tento fenomén vysvětluje tzv. paradox C-hodnoty říkající, že množství jaderné DNA nesouvisí s komplexitou organismu ani s počtem protein-kódujících genů. Navíc se zdá, že se v množství jaderné DNA se mohou lišit i blízce příbuzné organismy (Amparo, et al., 2013; Moore, 1984). Proto byl později paradox C-hodnoty rozveden na tzv. enigmu C-hodnoty, která se nezabývá pouze vztahem komplexity a velikosti genomu organismů, avšak řeší celý soubor otázek zabývajících se evolučními mechanismy vzniku malých/velkých genomů (Gregory, 2005a). Při bližším pohledu na složení jaderného genomu se zjistilo, že právě nekódující DNA (introny, repetitivní sekvence) je hlavním faktorem stojícím za vzniklou variabilitou velikosti genomu u příbuzných organismů. Existují dvě hlavní hypotézy vysvětlující vznik nadbytečné nekódující DNA. Adaptivní teorie říká, že extra DNA má v rámci organismu regulační a strukturní funkci (Moore, 1984), zatímco druhá teorie tvrdí, že nadbytečná DNA byla fixována náhodným procesem (genetickým driftem) a nepřináší buňce žádnou výhodu – teorie „junk“ DNA (Petrov, 2001). Nejnovější verzí této teorie je teorie sobecké DNA předpokládající, že extra DNA je tvořena parazitickými transponovatelnými elementy, jejichž nárůst je v rámci genomu špatně kontrolovatelný (Gregory, 2001).

Většina eukaryot má tendenci si zachovávat menší či střední velikosti genomu a výskyt velkých genomů je spíše výjimkou. U mnoha eukaryot, u kterých došlo k dramatickému nárůstu jaderné DNA, nebyla pozorována velikost genomu přesahující hranici 150 Gbp (Hidalgo, et al., 2017). Zdá se tedy, že DNA není akumulována do nekonečna a je zajištěna určitá forma její regulace (Vinogradov, 2003). V živočišné říši se velké genomy vyskytují u některých zástupců ryb – např. *Protopterus aethiopicus* (1C = 132.8 Gbp; Pedersen (1971)) a obojživelníků –

salamandři (až 1C = 120 Gbp; Sclavi, et al. (2019)). U rostlin dominuje obsahem DNA již zmíněná krytosemenná rostlina *Paris japonica* (1C = 148.8 Gbp; (Pellicer, et al., 2010)) a dále nelze opomenout kapraďorost *Tmesipteris obliqua* (1C = 147.3 Gbp; Hidalgo, et al. (2017)).

Také se zdá, že každý organismus má minimální hranici velikosti genomu, pod kterou nelze jít, jinak by to nebylo slučitelné s jeho životními funkcemi (Malerba, et al., 2020). Musí být totiž zajištěné kódování genů pro zachování základních metabolických drah a syntézu proteinů (Lawrence, 1999). Mezi živočichy s malými genomy se řadí parazitické hlístice – 1C = 19.56 Mbp (Leroy, et al., 2007). Ze zástupců z řad krytosemenných rostlin lze zmínit rod *Genlisea* – 1C = 61 Mbp (Fleischmann, et al., 2014) nebo v rámci hub kvasinka *Hansenula polymorpha* – 1C = 8.97 Mbp (Mohanta, et al., 2015).



Obrázek č. 1: Variabilita velikosti genomu u různých skupin organismů se zvýrazněnými skupinami protista a řasy – upraveno dle Gregory (2004)

1.1.1 Variabilita velikosti genomu u protist

Variabilita velikosti genomu a jeho evoluční následky jsou nejvíce prostudovány na rostlinách (Pellicer, et al., 2018) a zvířatech (Gregory, 2005b). Mnohem méně informací máme o jednobuněčných eukaryotických organismech tzv. protistech. U této skupiny byla přitom zjištěna největší variabilita ve velikosti genomu napříč celým „eukaryotickým stromem života“

(Cavalier-Smith, 2005). Mezi protista s největšími genomy byly řazeny améby (*Amoeba proteus* – 670 Gbp; Friz (1968)). Avšak odhad velikosti genomu u améb je problematický a ohledně přesnosti naměřených dat panuje zřetelná nejistota. Ve skutečnosti jejich genomy nebudou tak ohromné, jak se doposud zdály (Gregory, 2005c; Pellicer, et al., 2010), a skutečnými rekordmany s největšími genomy mezi protisty by mohly být obrněnky, např. *Prorocentrum micans* (271.8 Gbp; Veldhuis, et al. (1997)). Jejich protipólem jsou pak parazitické mikrosporídie – *Encephalitozoon intestinalis* s miniaturními genomy nepřesahujícími hodnotu 2.1 Mbp (Peyretaillade, et al., 2011).

Zajímavé velikosti genomu nenacházíme pouze u heterotrofních protist, ale také u zelených řas. Mezi rekordmany s nejmenšími genomy patří prasinophytní řasy z řádu Mamiellales – např. *Ostreococcus tauri*. Jedná se o pikoplanktonní jednobuněčné mořské organismy s velmi redukovanou velikostí buňky a genomu až na 12.56 Mbp (Derelle, et al., 2006). Další miniaturní genomy nalezneme v třídě Trebouxiophyceae u parazitického zástupce rodu *Helicosporidium* (17 Mbp; Pombert, et al. (2014)). Naopak větší genomy se nachází u řas převážně se sifonální a sifonokladální stélkou (Ulvophyceae) – např. *Codium fragile* 3.43 Gbp anebo u řas spájivých (Zygnematophyceae) – např. *Spirogyra* 1.96 Gbp (Keeling, et al., 2005) či *Micrasterias rotata* 31.72 Gbp (Poulíčková, et al., 2014). Více informací o velikosti genomu řas lze získat z rostlinné databáze „*Plant DNA C-values Database*“.

1.1.2 Mechanismy ovlivňující velikost genomu

Změna obsahu jaderné DNA může být způsobena hned několika evolučními procesy (obr. 2). Aktivita mobilních – transponovatelných elementů (TEs) se zdá být majoritním hráčem zapříčiňujícím vznik expandovaných genomů (Bennetzen, et al., 2005). Princip fungování je založen na jejich schopnosti provádět tzv. transpozici – přemisťovat se v genomu z místa na místo a časem tak navyšovat svůj počet (Hayward, et al., 2022; Schrader, et al., 2019). Podle typu mechanismu se rozlišují 2 typy TEs. Retrotranspozóny jsou časté u eukaryot, přemisťují se prostřednictvím RNA meziproduktu a využívají mechanismus „kopírovat-vložit“ (např. LTR, LINEs, SINEs). DNA transpozóny se přemisťují prostřednictvím DNA meziproduktu, používají mechanismus „vyjmout a vložit“ a jsou častější u prokaryot (např. TIR, Helitrony; Wicker, et al. (2007)). Vyšší aktivita repetitivních elementů byla pozorována např. v rámci skupin vršenek (Naville, et al., 2019) a nezmarů (Wong, et al., 2019). Ze zástupců rostlin lze zmínit kukuřici, u které došlo k masivní akumulaci dlouhých terminálních repetic = LTR tvořících přes 70 % jejího celkového jaderného genomu (Sanmiguel, et al., 1998).

Velice důležitým způsobem zvětšení genomu je pomocí polyploidizace neboli celogenomové duplikace (WGD). Jedná se o proces, při kterém organismus získá více než dvě kompletní sady homologních chromozomů (Adams, et al., 2005). Mezi hlavní typy polyploidie patří autopolyploidie a allopolyplodie. Autopolyploidie nastává znásobením sady chromozomů pocházejících z téhož druhu. Allopolyplodie vzniká prostřednictvím hybridizace a dochází tak ke znásobení sady chromozomů pocházejících z odlišných druhů (Soltis, 2013). Polyploidie je extrémně vzácná u savců a ptáků (Otto, 2007), zatímco u rostlin se jedná o relativně běžný proces a je možné, že každá krytosemenná rostlina si v historii tímto procesem alespoň jednou prošla (Van de Peer, et al., 2017). Z hlediska vysokého počtu chromozomů jsou zajímaví i někteří zástupci řas, kde např. u druhu *Netrium digitus* (Zygnematophyceae) byl detekován vysoký počet chromozomů – 592 a spekuluje se, že by se právě mohlo jednat o polyploidního jedince (Brandham, 1965). U mnohobuněčných organismů se setkáváme také s tzv. endopolyploidií neboli somatickou polyploidií (Čertner, et al., 2022). Výskyt endopolyploidie je v rámci organismu tkáňově specifický, kdy např. endosperm, děložní lístky nebo cévní svazky podléhají více endopolyploidii nežli třeba samotné listové čepele (Barow, et al., 2003; Scholes, et al., 2015).

K vyššímu obsahu jaderné DNA může přispět i masivní genová duplikace. Například u řasy *Closterium* (Zygnematophyceae) bylo zdvojnásobeno až 30 % genů (Kawaguchi, et al., 2023). Mezi další mechanismy patří chromozomové mutace – duplikace části chromosomů anebo aneuploidizace, která ale může vést i ke ztrátě chromozomů (Chen, et al., 2012).

Stejně jako jsou mechanismy zapříčiňující expanzi genomu, existují i mechanismy stojící za snížením obsahu jaderné DNA. Nehomologní rekombinace je pravděpodobně jeden z hlavních mechanismů způsobujících zmenšení genomu. Tento proces je založen na rekombinaci dvou nekomplementárních úseků DNA vedoucích k chromozomovým mutacím, jako je např. delece – ztráta části chromosomu (Devos, et al., 2002). Ke zmenšení velikosti genomu může dojít i rediploidizací, kdy se z polyploidního jedince zpětně stává plně funkční diploidní jedinec (Mandáková, et al., 2018). Redukce genomu může také probíhat zkracováním oblastí bohatých na introny nebo intragenetických oblastí (Cavalier-Smith, 2005; Gregory, et al., 1999). Dále může dojít ke snížení počtu genových kopií, fúzi genů účastnících se stejné metabolické dráhy (Keeling, 2007), anebo ztrátě již nepotřebných genů (např. při přechodu z fotoautotrofie na heterotrofii) a zachování pouze tzv. housekeeping genů potřebných pro udržení základních buněčných funkcí (Warrington, 2000).

1.1.3 Souvislost velikosti genomu s dalšími vlastnostmi organismů

Zdá se, že velikost genomu by mohla souviset s fyziologií, ekologií a fenotypovými projevy buňky či celého organismu (obr. 2). Cavalier-Smith (1978) přišel s teorii nukleoskeletární DNA, která naznačuje, že existuje pozitivní vztah mezi velikostí genomu a velikostí buňky, a že tedy větší buňky budou obsahovat větší množství DNA nežli ty malé. Optimalizace karyoplazmatického poměru, tj. objemu jádra k objemu cytoplazmy, tak bude zásadním faktorem hrajícím roli v životních strategiích organismů a jejich adaptačních vlastnostech (Strassburger, 1893). Vztah mezi velikostí buňky a genomu se dá názorně ukázat u symbiotických (LaJeunesse, et al., 2005) či parazitických organismů (Peyretaillade, et al., 2011), které jsou většinou malé a tvarově jednoduché (kokální) kvůli prostorovému omezení hostitelem. Pro udržení karyoplazmatického poměru došlo u těchto organismů k redukci velikosti genomu. Některé parazitické mikrosporídie to dovedly až k takové dokonalosti, že ztratily veškeré introny, a dokonce geny pro základní metabolickou dráhu – glykolýzu (Keeling, et al., 2010). U některých mnohobuněčných organismů lze dále pozorovat vliv množství jaderné DNA na velikosti jednotlivých orgánů anebo přímo celého těla (Stelzer, et al., 2021). Tato závislost však nebyla pozorována např. u korýšů či ryb. Jejich velikost těla zůstává s rostoucím množstvím DNA stejná, ale mění se počet buněk v rámci organismu – méně větších buněk s větším množstvím DNA nežli více s malým množstvím DNA (Jeffery, et al., 2016).

Velikost genomu by mohla prostřednictvím velikosti buňky souviset i s dalšími fyziologickými aspekty organismu, jako je např. rychlost růstu nebo metabolismu. Se zmenšujícím se množstvím jaderné DNA, a tím pádem i velikostí buňky, dochází u některých organismů ke zvýšení rychlosti metabolismu (Mueller, 2015). Rychlejší metabolismus umožnuje např. rychlejší syntézu látek potřebných pro obranu (toxiny, sekundární metabolity) nebo rychlejší reakci na environmentální změny prostředí. Negativní závislost s velikostí genomu byla nalezena ve vztahu s rychlostí vývoje anebo dělení buněk – meióze/mitóze, protože pro replikaci většího množství jaderné DNA je zapotřebí více času (Bennett, 1971; Gregory, 2005a). Zdá se, že výhodou pomalu dělících se buněk, by mohla být schopnost tolerovat větší množství naakumulované nekódující DNA (Gregory, 2001).

Na velikost genomu by se také dalo nahlížet z pohledu r/K strategie. Zdá se, že organismy s malými genomy se nacházejí spíše v oblastech se stresujícími faktory, kdy je potřeba rychle reagovat na měnící se podmínky prostředí a mohly by tak představovat r-stratégy. To zahrnuje adaptaci na nestálé prostředí doprovázenou menšími velikostmi buněk, rychlejším dělením a produkcí populací o mnoha jedincích (Šmarda, et al., 2010). Naopak,

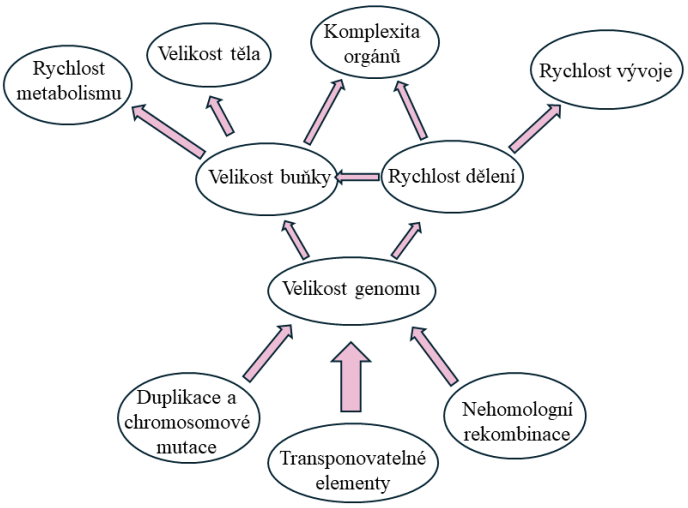
organismy s větším genomem, pomalejším vývojem a výskytem ve stabilnějším prostředí by mohly být považovány za K-stratégy (Cavalier-Smith, 1980).

Zvětšující se velikost genomu by mohla mít také vliv na zvyšující se riziko extinkce – ztráta fitness, pokles jedinců v populacích, akumulace mutací (Kraaijeveld, 2010). U rostlin se zároveň sledovalo, zdali riziko extinkce stoupá s vyššími stupni ploidie. Ve studii Mayrose, et al. (2011) poukázali na fakt, že u polyploidních linií kapraďorostů a nahosemenných rostlin je vyšší rychlost vymírání než u diploidních zástupců. Autoři tak označují polyploidii za „evoluční slepou uličku“. Naopak mladší studie Wood, et al. (2009) tvrdí, že v tomto ohledu neexistuje rozdíl mezi diploidními a polyploidními liniemi, a tak souvislost mezi mírou polyploidie a extinkce zůstává stále nejasná.

Na velikosti genomu mohou dále působit selekční tlaky v podobě ekologických podmínek prostředí (Doležel, et al., 2007). Mít velké genomy je nákladné z hlediska spotřeby dusíku a fosforu, které tvoří základní kostru DNA (Šmarda, et al., 2013). Tyto prvky jsou pro organismy mnohdy limitující, a pokud se organismus vyskytuje v prostředí chudých na tyto prvky, mohou být selekčně tlačeny směrem k malým genomům. Ve vztahu s dostupností živin byl také hodnocen poměr AT ku GC párů bází, protože nukleotid cytosin se liší od thyminu o jeden navázaný dusík. To vedlo k předpokladu, že by organismy s nižším zastoupením GC párů bází mohly dominovat v oblastech chudých na živiny (Majda, et al., 2021).

Teplota je obecně důležitým parametrem determinujícím vlastnosti organismů. Jedno z empirických ekologických pravidel předpovídá výskyt větších jedinců s větším množstvím DNA v chladnějším prostředí (Hessen, et al., 2013). V chladnějším prostředí mají organismy pomalejší metabolismus, a tak je akumulace nekódující DNA jednodušší než u organismů s rychlým metabolismem vyskytujících se v prostředí s vyšší teplotou (Brochmann, et al., 2004). Velikost genomu může mít také vliv na disperzi organismů. Rostliny s většími genomy mají tendenci vytvářet velká semena, která jsou těžší a špatně se šíří (Carta, et al., 2022). Naopak malá velikost genomu může hrát roli v invazivnosti organismů. Například vysoce invazivní mořská řasa *Caulerpa* (Ulvophyceae) má malý genom – 28 Mbp, což ji zmnožuje se rychleji dělit a tím pádem se rychleji rozšiřovat (Arimoto, et al., 2019). Souvislost s velikostí genomu potvrzují i další studie zabývající se invazivností rostlin (Rejmánek, 1996). Naopak

Pyšek, et al. (2007) publikoval články popisující vyšší invazivnost u polyploidních jedinců s vyšším obsahem jaderné DNA.



Obrázek č. 2: Souhrnné schéma popisující mechanismy ovlivňující velikost genomu a další vlastnosti organismů – upraveno dle Gregory (2005)

V porovnání s mnohobuněčnými organismy jsou protista zajímavou modelovou skupinou pro sledování přímého vlivu velikosti genomu na fenotypové projevy buňky. Jejich tělo je tvořeno jedinou buňkou, rychle se dělí a mají velké populace, což jim umožňuje rychleji reagovat na měnící se podmínky prostředí (Foissner, 2007). Protistní organismy tak poskytují na základě těchto vlastností nový vhled pro studium souvislostí mezi velikostí genomu a ekofyziologickými nároky organismů.

1.2 Metody stanovení množství jaderné DNA

Existuje mnoho způsobů, jak stanovit množství jaderné DNA. Jednotlivé metody se liší přístupem, časovou náročností a finanční dostupností. Nejstarší metodou pro stanovení velikosti genomu je reasociační kinetika vysokomolekulární genomové DNA (c_0t-assays). Avšak její poměrně náročná laboratorní příprava a nespolehlivé výsledky vedly k oproštění od této metody a nahrazení metodami novými, jako je např. mikrospektrofotometrie využívající barvení pomocí fluorochromů vázajících se na molekuly DNA (Palmer, et al., 1997; Zacharias, et al., 1982). Tato metoda byla například hojně využívána pro stanovení velikosti genomu u zástupců chaluh (Phaeophyceae; Phillips, et al. (2011)). Další metodou je Feulgenova obrazová denzitometrie založená na Feulgenově barvení. Jedná se o dodnes využívanou metodu, která vyniká svou cenovou dostupností, ale je omezena schopností simultánně analyzovat větší počet částic, což jí činí časově náročnou (Hardie, et al., 2002). Mezi další metodu patří obrazová analýza a kvantitativní PCR v reálném čase pro absolutní kvantifikaci jedné kopie genu ve

známém množství (hmotnosti) jaderné DNA (Wilhelm, et al., 2004). Informace o velikosti genomu se také dají získat celogenomovým sekvenováním (WGS). Avšak tato metoda je finančně velmi nákladná a zjištění velikosti genomu je spíše vedlejším produktem (Pfenninger, et al., 2021). Posledním zmíněným a zároveň nejvíce užívaným způsobem, jak stanovit množství jaderné DNA, je metoda průtokové cytometrie, která je blíže popsána v následující podkapitole.

1.2.1 Průtoková cytometrie

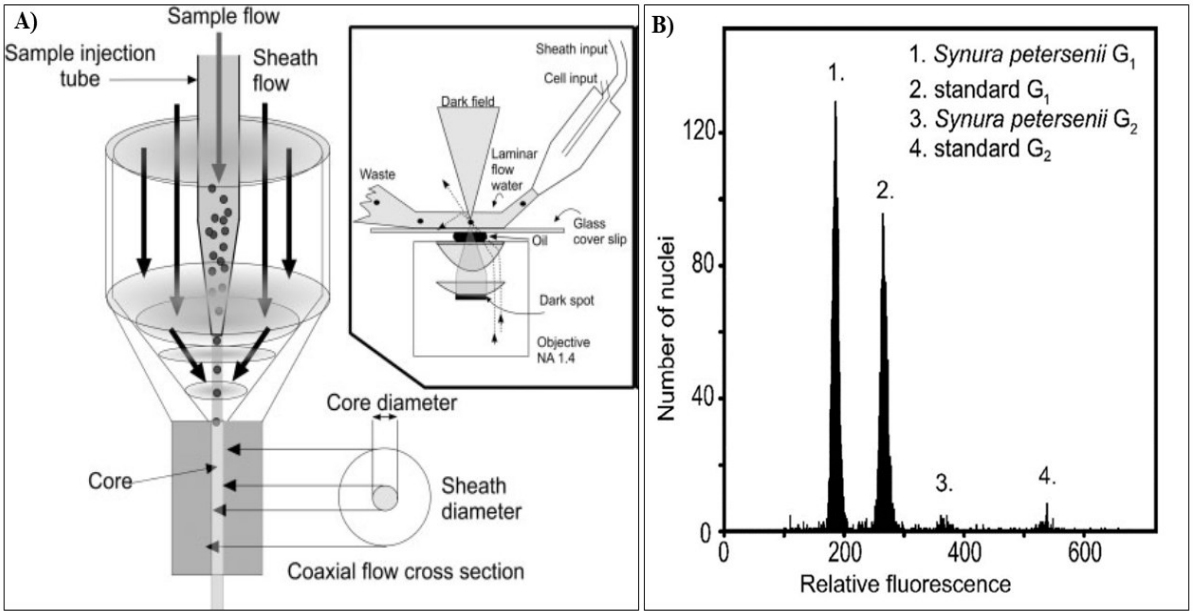
Průtoková cytometrie (FCM, Flow Cytometry) se stala velmi účinnou metodou používanou v mnoha technických oborech (Doležel, et al., 2007). Využití FCM není omezeno pouze pro stanovení velikosti genomu zkoumaného materiálu, ale také umožňuje analýzu tvaru a velikosti částic – např. buněk. Své uplatnění nalézá i v biomedicínských oborech (imunologie, virologie, molekulární biologie) při monitoringu různých onemocnění – rakovina, infekční nemoci. Dalším využitím je počítání či třídění buněk do uniformních populací a jejich následná analýza (McKinnon, 2018). Průtoková cytometrie také pomohla rozšířit obzor v oblasti biologie rostlin, a to konkrétně ve studiu polyploidie, životních cyklů, křížení, testování kvality semen či taxonomii (Galbraith, et al., 2021).

Metoda průtokové cytometrie poskytuje hned několik výhod – nenáročná příprava materiálu, rychlá analýza vzorků, stanovení obsahu DNA v mitoticky neaktivních buňkách, cenová dostupnost, nedestruktivnost (Sliwinska, et al., 2022). Nevýhodou FCM je požadavek na čerstvý rostlinný materiál anebo obtížná analýza druhů s vysokým obsahem sekundárních metabolitů (taniny, slizovité sloučeniny apod.), které se váží na fluorochromy, čímž ovlivňují výslednou intenzitu fluorescence (Galbraith, et al., 2021; Greilhuber, et al., 2007).

1.2.1.1 Aparatura a princip průtokové cytometrie

Typický průtokový cytometr se skládá z pěti základních provozních jednotek (obr. 3) – zdroj světla (laser, diody), průtoková komora, optika (čočky, filtry, zrcadla), fotodetektory/konvektory, počítač (Doležel, et al., 2007). Samotný název metody naznačuje, že je založena na průtoku kapaliny (angl. *sheat*) nesoucí obarvené izolované částice (buňky, jádra), které jsou hydrodynamickou fokusací koncentrovány do úzkého provazce (Adan, et al., 2017). Jednotlivé částice jsou detekovány zdrojem světla, jehož rozptyl a emitovaná fluorescence je zaznamenána optickou soupravou cytometru. V cytometru existují dva typy detektorů fluorescence. První detektor je umístěn v ose dopadajícího laserového paprsku a snímá intenzitu fluorescence v předním rozptylu světla (FSC = Forward Scatter). Druhý detektor je umístěn v 90° úhlu na dopadající paprsek a snímá intenzitu fluorescence v bočním rozptylu světla (SSC

= Side Scatter). Zatímco FSC poskytuje informaci o velikosti analyzovaných částic, tak SSC o stavu – granularitě/kulatosti částic (stav cytosolu, buněčné inkluzi apod.; Jahan-Tigh, et al. (2012), Doležel, et al. (2007)). Získané informace o relativní intenzitě fluorescence jsou následně v počítači přeneseny do digitální podoby ve formě histogramu viz. obr. 3. Samotný odhad absolutního množství jaderné DNA je proveden výpočtem porovnávajícím intenzitu fluorescence referenčního standardu a vzorku (Doležel, et al., 2005). Bližší metodické postupy výpočtu jsou dále rozebrány v této diplomové práci v kapitole 4.2.3.



Obrázek č. 3: A) princip fungování klasického průtokového cytometru (Doležel, et al., 2007), B) FCM histogram intenzity relativní fluorescence jader obarvených PI značením. První pík odpovídá G_1 fázi analyzovaného vzorku a druhý pík G_1 fázi rostlinného standardu (Čertnerová, et al., 2021)

1.2.1.2 Fluorescenční barvení DNA

Pro vizualizaci DNA existuje několik způsobů fluorescenčního značení –fluorochromů. Pro odhad absolutního množství jaderné DNA se používá fluorescenční značení nespecificky se vázající na báze DNA. Do této skupiny fluorochromů se řadí propidium jodid (PI), jež je nejhojněji využívaným barvením. PI je excitováno modrým světlem (488 nm) a emituje červenou fluorescenci o vlnové délce 617 nm (Suzuki, et al., 1997). Ethidium bromid (EB) je dalším interkalačním značením ale s posunutým excitačním spektrem do UV oblasti (302 nm). Pro stanovení ploidie či poměru AT ku GC párů bází jsou používána fluorescenční barviva přednostně se vázající na jeden typ páru bází DNA (Greilhuber, et al., 2007). DAPI barvení (4',6diamidin-2-fenylindol) se specificky váže na AT páry bází v malém žlábku dvoušroubovice DNA. DAPI je excitováno UV světlem (358 nm) a emituje modrou

fluorescenci o vlnové délce 461 nm (Larsen, et al., 1989). Další alternativou je pak CMA3 (Chromomycin A3) vázající se v oblastech bohatých na GC páry bází za přítomnosti Mg^{2+} iontů (Goldberg, et al., 1971).

1.2.1.3 Referenční standardy pro FCM

Pro získání informace o množství jaderné DNA analyzovaného vzorku je potřeba přidat referenční standard o známé velikosti genomu (Loureiro, et al., 2023). Standardy musí splňovat určitá kritéria, aby mohly být použity pro FCM. Musí být jasně taxonomicky definované, se stabilní velikostí genomu, ploidií a bez vnitrodruhové variability. Zároveň musí být jednoduše pěstované, snadno dostupné, neovlivňující stabilitu jader a barvení DNA při přípravě vzorku (Temsch, et al., 2022). Cílem je najít takový standard, který by měl velikost genomu co nejbližší ke studovanému materiálu, ale zároveň aby nedocházelo k jejich překrytí – ideálně v rozmezí 0,5–2násobku velikosti vzorku. Obecně je lepší, aby si vzorek a standard fylogeneticky odpovídaly (Greilhuber, et al., 2007; Sliwinska, et al., 2022). Problémem je ale nedostatečný počet zavedených standardů pro jednotlivé skupiny. Výjimkou tak není použití rostlinného standardu na živočišném materiálu a naopak, avšak výsledky musí být opatrně interpretovány (Greilhuber, et al., 2007; Vindeløv, et al., 1983).

Důležitým krokem je také výběr tkáně zvoleného standardu. Rostliny jsou mnohobuněčné a jejich části se mohou lišit úrovní ploidie. Například kořeny, trichomy, semena jsou často endopolyploidní (Leitch, et al., 2017). Pro FCM se nejvíce využívají listová pletiva, která jsou bohatá na počet buněk a mají stabilní C-hodnotu (Doležel, et al., 2007). Existuje mnoho zavedených rostlinných standardů (Temsch, et al., 2022), avšak v laboratoři FCM na Přírodovědecké fakultě UK se pracuje hlavně se čtyřmi (*Pisum sativum* cv. Ctirad, *Carex acutiformis* – „*wild clone*“, *Solanum pseudocapsicum* – „*commercial clone*“ a *Bellis perennis* – „*wild clone*“).

Rozlišujeme dva typy standardizace dle jejich přípravy. Při interní standardizaci se standard připravuje společně se studovaným vzorkem a využívá se hlavně při FCM s cílem stanovit absolutní velikost genomu (Loureiro, et al., 2023). Existuje také tzv. (pseudo-)interní standardizace, kdy vzorek a standard jsou připraveny separátně a k jejich smíchání a společné analýze dochází až posléze (Noirot, et al., 2005). Druhým typem je externí standardizace, kdy jsou jádra vzorku a referenčního standardu izolována, obarvena a analyzována odděleně. Standard je na začátku změřen samostatně, pro zjištění jeho pozice na škále relativní intenzity fluorescence. Analyzované vzorky jsou pak měřeny samostatně, bez standardu. Externí

standardizace se hlavně používá pro rychlé skenování úrovní ploidie, avšak poskytuje informaci pouze o relativní velikosti genomu (Loureiro, et al., 2023; Temsch, et al., 2022).

1.2.1.4 Stanovení velikosti genomu pomocí FCM u řas

Stanovení absolutní velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie je v posledních letech poměrně hojně využívané při studiu rostlin a živočichů, avšak u řas je v samotných počátcích (Čertnerová, et al., 2021; Sliwinska, et al., 2022). V porovnání s rostlinami/živočichy je u řas problematičtější získání dostatečné biomasy pro FCM. Kultivace je u hodně druhů časově náročná a doprovázena mnoha problémy (Mazalová, et al., 2011). Například u heterotrofních zástupců je potřeba přidat do média potravu – bakterie, které mohou ovlivňovat výsledek FCM analýz (Whiteley, et al., 1993). Dalším problémem je nedostatek či nedostupnost zavedených řasových standardů (Čertnerová & Galbraith, 2021; Mazalová, et al., 2011). V dnešní době se jako referenční standard pro řasy s malou velikostí genomu používá zelená řasa *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-400 cw15 mt+; 2C = 0.24 pg; (Lemaire, et al., 1999)). V průběhu let proběhly také pokusy o zavedení dalších řasových standardů, jako je např. *Micrasterias pinnatifida* (SVCK 411; 2C = 3.4 pg; Mazalová, et al. (2011)) anebo *Scrippsiella hangoei* (2C = 47 pg; Figueroa, et al. (2010)). Avšak tyto standardy nejsou aktivně využívány. U některých řas (např. kokolitky) se stále můžeme setkat s použitím červených krvinek (CRBC = chicken red blood cells) jakožto s referenčním standardem (Standeren, 2018). Většinou se ale u řasových vzorků volí rostlinné standardy, které sice stejně jako CRBC nejsou pro některé skupiny fylogeneticky odpovídající, ale zato jsou více spolehlivé (Doležel, et al., 2007).

Pro řasy neexistuje žádný univerzální přístup na přípravu FCM vzorků, který by se dal aplikovat na všechny skupiny řas. Řasy mají často heterogenní a složité uspořádání buněčných stěn (BS), které je těžké rozbít a izolovat tak z buněk jádra (Stace, 1989). Pro FCM řas s BS se doporučuje použít mladé kultury v exponenciální fázi růstu, protože BS ještě není dostatečně vyvinutá (Mazalová, et al., 2011). Izolace jader se dá docílit mechanickými tak chemickými způsoby. Zelené řasy jsou z hlediska kompozice buněčné stěny podobné vyšším rostlinám – až 70 % celulózy (Preston, 1974), proto je možné k izolaci použít enzymy (celulázy, pektinázy, hemicelulázy) degradující BS (Mazalová, et al., 2011). Avšak ne vždy je degradace stoprocentní a musí být doplněna o další přístupy. Použití fixativů (ethanol, formaldehyd, aceton) může také vést k narušení BS. Výhodou tohoto přístupu je, že eliminují fluorescenci semiautonomních organel, ale zároveň mohou ovlivnit vlastnosti barvení jaderné DNA a snižovat tak výslednou relativní fluorescenci (Leers, et al., 1999). Dalším možným přístupem je mechanické nasekání žiletkou, podobně jako u vyšších rostlin. Tento přístup je možné využít

u makrořas, například chaluh z řádu Laminariales (Gall, et al., 1996) anebo u vláknitých řas jako je např. rod *Zygnema* (Čertnerová, 2021). Naopak křemičité chrysomonády nemají buněčnou stěnu, a tak je izolace jader v porovnání s řasami opatřenými BS poměrně jednoduchá (Čertnerová & Galbraith, 2021). Přidáním izolačního pufru dojde k osmotickému stresu následovaného lýzí buněk a uvolnění jader do prostředí.

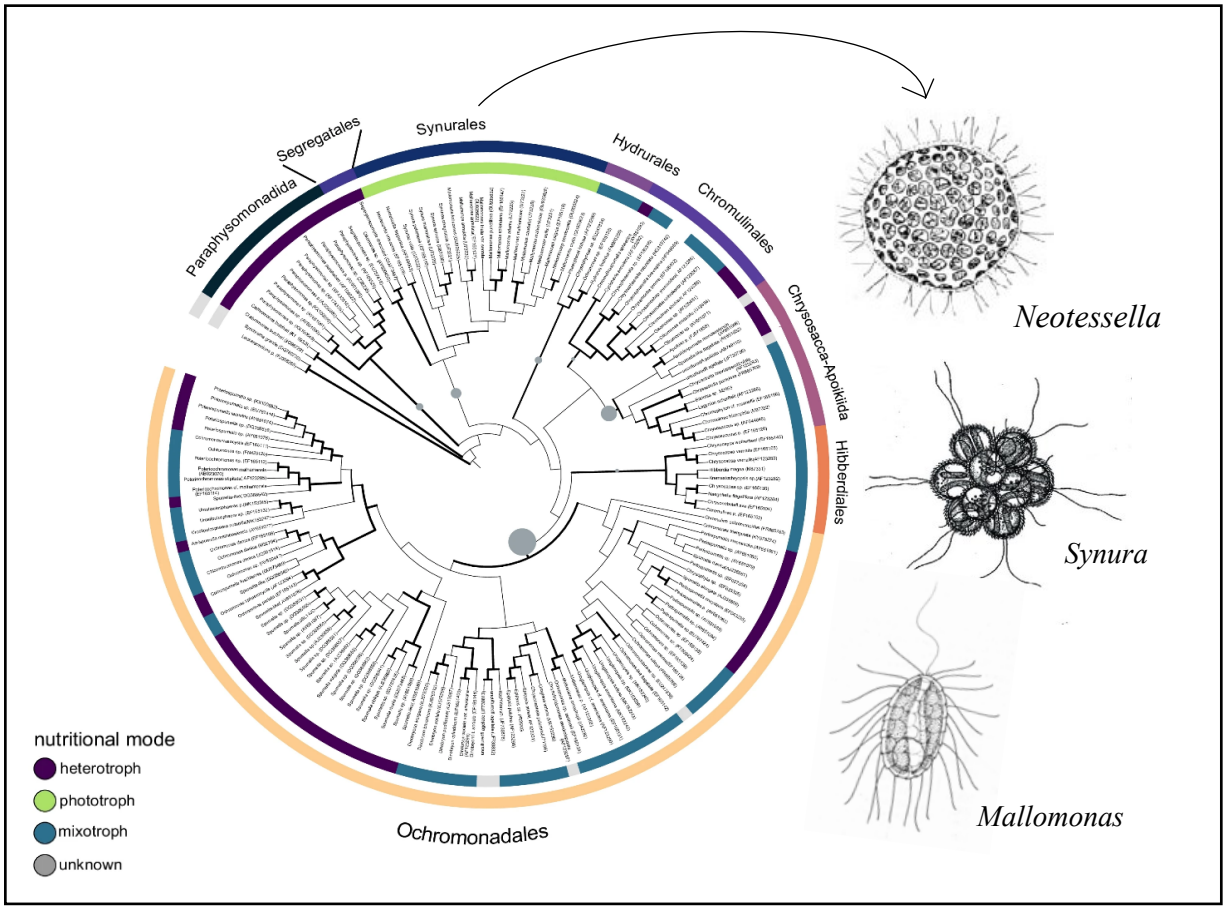
1.3 Základní charakteristika třídy Chrysophyceae

Třída Chrysophyceae se taxonomicky řadí do superskupiny SAR a to konkrétně do Stramenopil – Ochrophyta (Brown, et al., 2010). Český název „zlativky" odkazuje na jejich zlatavou barvu způsobenou obsahem hnědého pigmentu fukoxanthin (Andersen, et al., 1983). Buňky jsou většinou chráněny schránkou/lorikou anorganického či organického původu (Kristiansen, et al., 2017). V rámci Chrysophyceae se nachází různé potravní strategie, od fotoautotrofie přes mixotrofii až k heterotrofii (Bock, et al., 2022). Druhy jako *Uroglena volvox* mohou mít i ekonomické dopady (Green, et al., 2017). V severní Americe byly zaznamenány případy vzniku rozsáhlého vodního květu nepříjemného zápachu, který znehodnocoval kvalitu tamní pitné vody (Nicholls, et al., 2015).

Přestože není o jejich životním cyklu mnoho známo, patrně se jedná o řasy s izomorfním haplo-diplontním životním cyklem (Čertnerová, et al., 2022). To znamená, že si obě fáze morfologicky odpovídají a u obou dochází k mitotickému dělení (Mable, et al., 1998). O rozmnožování se toho také ví velmi málo. Převažuje hlavně nepohlavní – vegetativní rozmnožování. Pohlavní rozmnožování (izogamie) bylo pozorováno jen v ojedinělých případech a pro většinu druhů zůstává kryptické (Kristiansen, et al., 2007). Kraus, et al. (2019) ale poskytli nepřímý důkaz o pohlavním rozmnožováním díky osekvenování jaderného genomu a nalezení specifických genů pro meiózu. Na konci vegetační sezóny dochází k produkci rezistenčních odpočívajících stádií – stomatocyst, tvořených křemíkem. Ty mohou vznikat pohlavní i nepohlavní cestou a jsou hojně využívány v paleoekologii jako indikátor historických podmínek prostředí (Sandgren, 1991).

Třída Chrysophyceae celkem obsahuje 8 řádů (obr. 4), kdy Ochromonadales zahrnuje skoro 50 % celkové diverzity (Bock, et al., 2022). Řád Synurales vznikl pravděpodobně v evoluci před 280 miliony let (Siver, et al., 2015) a spadají sem 3 rody – koloniální *Synura*, *Neotessella* a solitérní rod *Mallomonas* (Kristiansen, 2001). Rod *Neotessella* je nejstarší a tvoří samostatnou linii. Druhá linie zahrnuje rod *Synura* a *Mallomonas.* Jo, et al. (2013) datovali stáří

Mallomonas na zhruba 130 milionů let a rod *Synura* by tak měl být nejmladším zástupcem z této skupiny (Siver, et al., 2015).



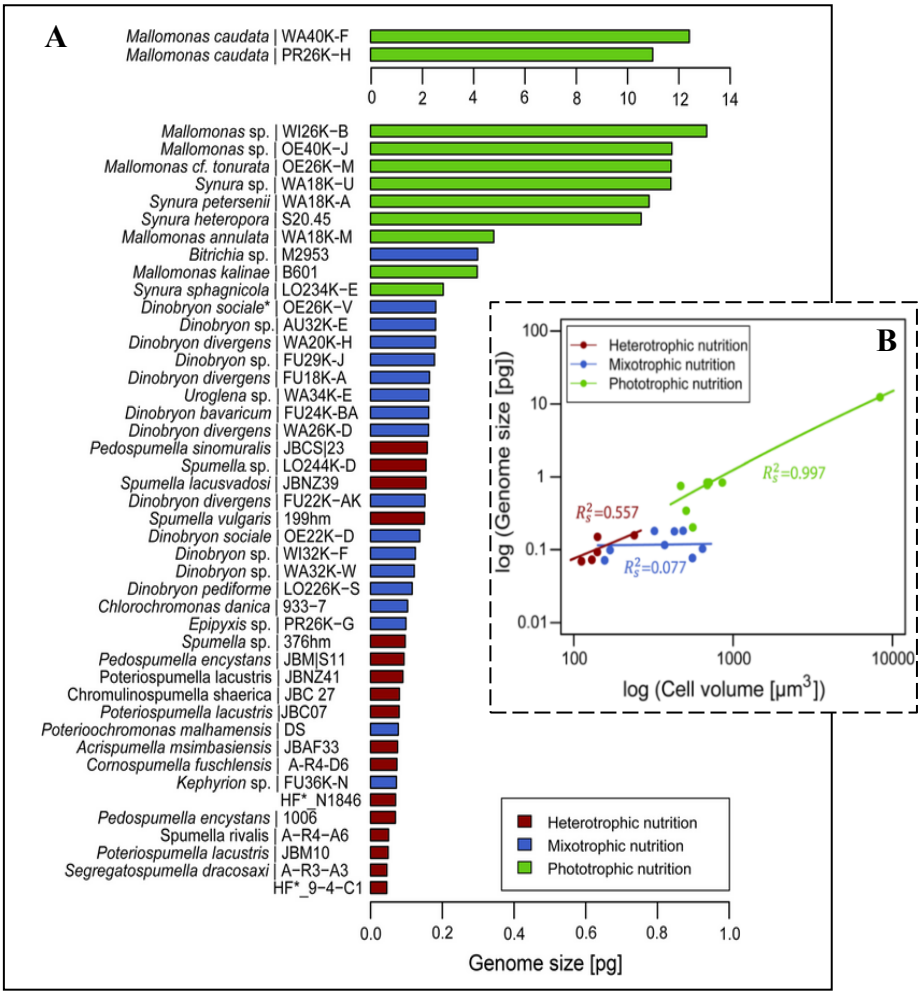
Obrázek č. 4: Fylogenetické vztahy v rámci třídy Chrysophyceae s vyznačenými potravními strategiemi – převzato Bock, et al. (2022), Kristiansen (2001)

1.3.1 Velikost genomu v rámci třídy Chrysophyceae

U třídy Chrysophyceae byl poměrně nedávno zjištěn velký rozsah ve velikosti genomu, a to v rozmezí od 0.09 pg – *Segregatospumella dracosaxi* do 24.84. pg – *Mallomonas caudata* (Čertnerová, et al., 2020; Olefeld, et al., 2018). Ve studii Olefeld (2018) zkoumali mimo jiné závislost mezi velikostí genomu a některými ekofyziologickými vlastnostmi buněk, jako jsou např. potravní strategie. Rozdíly v objemu buněk a velikostí genomu mezi fototrofními, heterotrofními a mixotrofními chrysomonádami jsou pravděpodobně spojené s různými životními strategiemi (obr. 5). Fotoautotrofie je nejspíše původní potravní strategií chrysomonád spojená s větší velikostí těla, delší životností a nižšími rychlostmi růstu. Omezená dostupnost živin v prostředí vedla ke vzniku mixotrofie a heterotrofie doprovázenou pozvolnou redukcí velikosti buňky a zmenšováním velikostí genomu (např. ztráta genů pro fotosyntézu; Majda, et al. (2021)). Optimalizace poměru velikosti predátora ke kořisti pravděpodobně vedla

k redukci velikosti buněk a umožnila tak rozšíření spektra potenciálních kořistí – ultrabakterií (de Castro, et al., 2009).

Vizualizace chromozomů a přesné určení ploidie je u chrysomonád velmi náročné, protože jejich chromozomy jsou příliš malé a obtížně detekovatelné (McIntyre, 2012). Dle článku Čertnerová et al. (2022) se zdá, že chrysomonády jsou většinou v diploidní fázi životního cyklu a pozorování změny životní fáze je extrémně vzácné. Proto je vhodnější u této skupiny používat pojem množství/obsah jaderné DNA (angl. *DNA content*) nežli termín velikost genomu (Čertnerová & Galbraith, 2021).



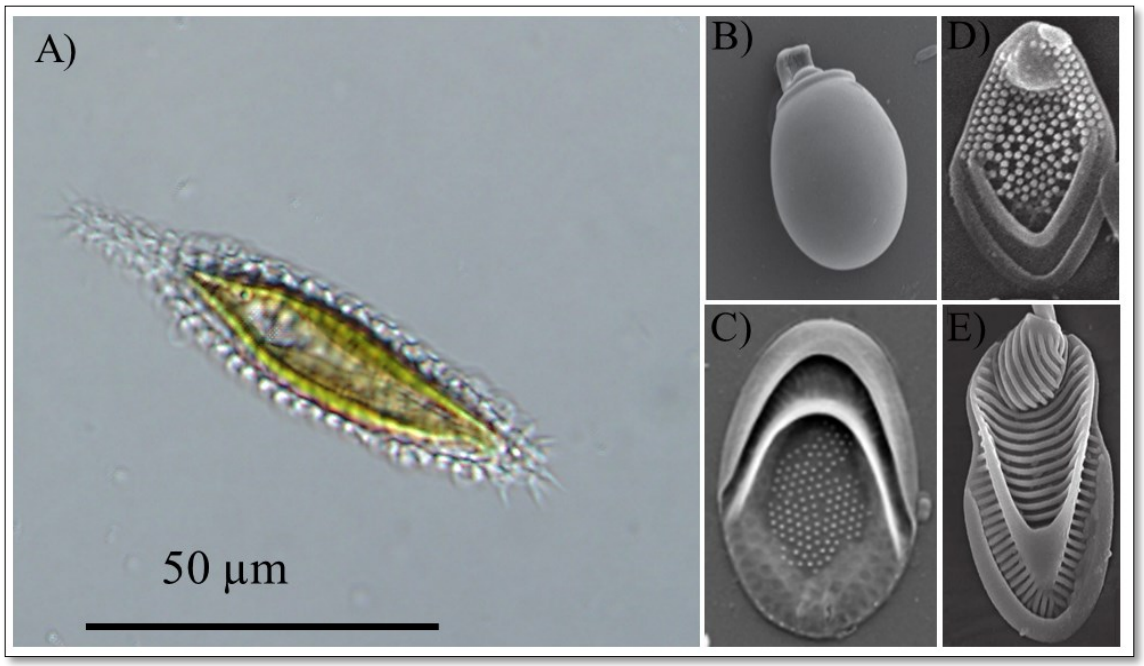
Obrázek č. 5: A) variabilita velikosti genomu v rámci třídy Chrysophyceae , B) regrese velikosti genomu a velikosti buňky ve vztahu s potravní strategií – převzato Olefeld et al., (2018)

1.3.2 Modelový rod *Mallomonas*

Zástupci rodu *Mallomonas* (obr. 6) jsou jednobuněčné organismy se dvěma heteromorfními paralelními bičíky umístěnými na apexu buňky. Tvar buňky je většinou

kulovitý, oválný nebo elipsoidní (Siver, 1991). *Mallomonas* nemají buněčnou stěnu, což jim umožnuje nabývat různých velikostí (Olefeld, et al., 2018). U více jak 70 % druhů nepřesahovala délka buněk 30 µm. Minimální délka byla naměřena pro *M. canina* a *M. dickii* (6 µm) a maximální pro *M. caudata* (91 µm). Šířka buněk byla pro více jak polovinu druhů menší než 10 µm. Minimální šířka byla naměřena pro *M. dickii* (2.9 µm) a maximální pro *M. caudata* a *M. matvienkoae* (25 µm; Siver (1991)).

Rod *Mallomonas* spadá do skupiny řas označovaných jako křemičité chrysomonády (řád Synurales), kvůli produkci druhově specifických křemičitých šupin. Šupiny se liší svým tvarem/velikostí v závislosti na umístění na buňce a většinou jsou opatřeny ostny připevněnými k šupině pomocí struktury dóm (Asmund, et al., 1986). Nejvíce charakteristickou strukturou je tzv. V-žebro. Právě křemičité šupiny jsou jedním ze základních morfologických znaků stojících za taxonomickým členěním *Mallomonas*. Podle (ne)přítomnosti V-žebra je rod rozdělen do dvou linií – A1 a A2, kdy v linii A2 V-žebro chybí (Siver, et al., 2015). Morfologickou taxonomii postupně doplnily molekulární metody, díky kterým mohla být sestavena komplexnější fylogeneze (Škaloud, Kristiansen, et al., 2013). V této době je celosvětově uznáváno přes 260 druhů rodu *Mallomonas* (Guiry, 2024), které jsou dále rozděleny do více než 10 sekcí. Avšak očekává se, že druhová diverzita bude ještě mnohem větší.



Obrázek č. 6: Příklady charakteristik rodu *Mallomonas*, A) *Mallomonas insignis* (vlastní foto), B) odpočívající rezistentní stádium – stomatocysta (Ignatenko, et al., 2022), C) křemičitá šupina *M. insignis*, D) křemičitá šupina *M. annulata*, E) křemičitá šupina *M. asmundiae* (Kapustin, et al., 2020)

1.3.2.1 Ekologie rodu *Mallomonas*

Mallomonas je planktonní řasou vyskytující se především ve sladkých oligotrofních vodách (Kristiansen & Škaloud, 2017), ale některé druhy mohou být i mořské (*M. cuspis*, *M. marina*; Jeong, et al. (2019)). Mimo oligotrofní druhy je možné nalézt druhy prosperující na lokalitách s vyšší trofií. Například v jednom dánském jezeře s vysokou koncentrací fosforu byly nalezeny kromě klasických eutrofních druhů (zelené řasy, sinice) i některé druhy *Mallomonas* – *M. elongata*, *M. tonsurata* (Kristiansen, 1985a).

Druhové zastoupení *Mallomonas* je ovlivněno především teplotou, konduktivitou a pH (Kristiansen & Škaloud, 2017). U rodu *Mallomonas* se dříve myslelo, že se vyskytuje spíše v chladných vodách (okolo 12° C). Dnes se ale ví, že existuje spousta tropických mallomonád, např. *M. rimosa,* rostoucích při teplotě nad 25° C (Gusev, et al., 2023). Většinou se jedná o efemerní organismy s největší abundací na jaře či podzimu (Takahashi, 1978). Výjimkou je např. *M. caudata,* která jako jedna z mála druhů, může v letních měsících vytvářet vodní květ (Hoffmann, et al., 1992). Některé druhy jsou ale teplotně nezávislé a přetrvávají v průběhu celého roku (*M. crassisquama*; Siver (1991)).

Množství iontů (konduktivita) je dalším aspektem formujícím výskyt druhů *Mallomonas*. Většina druhů se primárně vyskytuje okolo nízké specifické konduktivity, avšak najdou se i druhy s vysokou specifickou konduktivitou, např. *M. acaroides* var. *acaroides* (Siver, et al., 1989). Dalším důležitým parametrem je pH, které ovlivňuje toxicitu kovů a rozpustnost živin (Foy, et al., 1978). Rod *Mallomonas,* stejně jako ostatní chrysomonády, nemá tzv. karbon koncentrující mechanismus (CCM), a tak potřebuje rozpuštěný anorganický uhlík ve formě CO_2, který se nachází hlavně v kyselém prostředí (Raven, et al., 2005). Zástupci rodu *Mallomonas* tak nejčastěji svým výskytem pokrývají pH hodnotu od neutrálního až po mírně kyselé (Siver, 1989), avšak najdou se i acidofilní druhy (pH pod 5.5) jako např. *M. paludosa* (Siver, 1991) nebo *M. hamata* (Smol, et al., 1984).

Potřeba vyšší koncentrace rozpuštěného uhlíku poukázala na fakt, že by *Mallomonas* mohl s největší pravděpodobností být mixotrofní organismus. Z tohoto důvodu je potřeba při jejich kultivaci přidat do média půdní dekokt (sterilizovaný půdní extrakt), aby se dosáhlo jejich optimálního růstu.

Přibližně třetina druhů rodu *Mallomonas* je považována za endemity a další třetina za druhy kosmopolitně rozšířené. Z toho vyplývá, že rod *Mallomonas* pokrývá svým výskytem širokou škálu ekologických podmínek a zároveň zahrnuje i druhy s velmi úzkou ekologickou valencí, které mohou sloužit jako dobrý bioindikátor podmínek prostředí (Kristiansen, 1986).

2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je stanovit množství jaderné DNA u co největšího počtu zástupců napříč rodem *Mallomonas* a odhalit možné ekofyziologické následky související se zjištěnou variabilitou v obsahu jaderné DNA.

V této práci jsou konkrétně kladeny následující otázky:

1) Mají určité linie tendenci k přítomnosti menšího/většího množství jaderné DNA, nebo se jejich množství mění na fylogenetickém stromě víceméně náhodně?
2) Souvisí množství jaderné DNA s velikostí buněk i ve studovaném rodě *Mallomonas*, který disponuje velkou variabilitou ve velikosti buněk?
3) Pohybují se větší buňky obsahující větší množství jaderné DNA pomaleji?
4) Existují konkrétní ekologické nároky pro kmeny obsahující menší/větší množství jaderné DNA?
5) Vyskytují se druhy s menším genomem (a menšími buňkami) častěji?

3 Metodika

3.1 Kultivace rodu *Mallomonas* in vitro

Pro analýzu množství jaderné DNA bylo celkem použito 165 kmenů rodu *Mallomonas* pro získání co nejrobustnějšího datasetu (obr. 7). Kultury pocházely z rozsáhlé sbírky kmenů *Mallomonas* z běžících projektů na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, konkrétně od Mgr. Ivy Jadrné, Mgr. Petra Knotka, doc. Mgr. Pavla Škalouda, Ph.D. Zahraniční kmeny – Oksan120807B, Daeojeong031415NH1, Silso012611J, Jeongsan121209J, Banmunji010910H byly poskytnuty od Woonghi Shina a kmeny CCMP ze sbírky NCMA. Kmeny byly vybrány tak, aby byla obsažena co možná největší druhová diverzita.

Kultury rodu *Mallomonas* byly kultivovány ve sterilních 25ml Erlenmayerových baňkách v lednici při teplotě 12 °C a 24hodinovém osvětlením. Pro kultivaci bylo použito tekuté WC-chryso médium s přidaným půdním dekoktem (tab. 1; (Guillard, et al., 1972)). Pro většinu druhů bylo připraveno médium obsahující TES pufr upravující pH média v rozmezí hodnot 6.8–8.2. Pro kultivaci 9 kmenů (CZ115D, NL42C, CZ79G, CZ93H, US29B, NL25I, CZ121L, CZ121J, CZ159D) bylo použito médium obsahující MES pufr upravující pH média na hodnoty mezi 5.5–6.5. Připravený roztok média byl následně sterilizován v autoklávu (120 °C po dobu 20 minut). Po vychladnutí média byly přidány sekundární vitamíny (tab. 2). Stav kultur byl průběžně kontrolován pod invertovaným mikroskopem (množství buněk, množství média a případná kontaminace houbovými/řasovými organismy) a dle potřeby byly kultury přeočkovány do nových Erlenmayerových baněk.

Tabulka č.1: Příprava WC-chryso média na 950 ml destilované vody

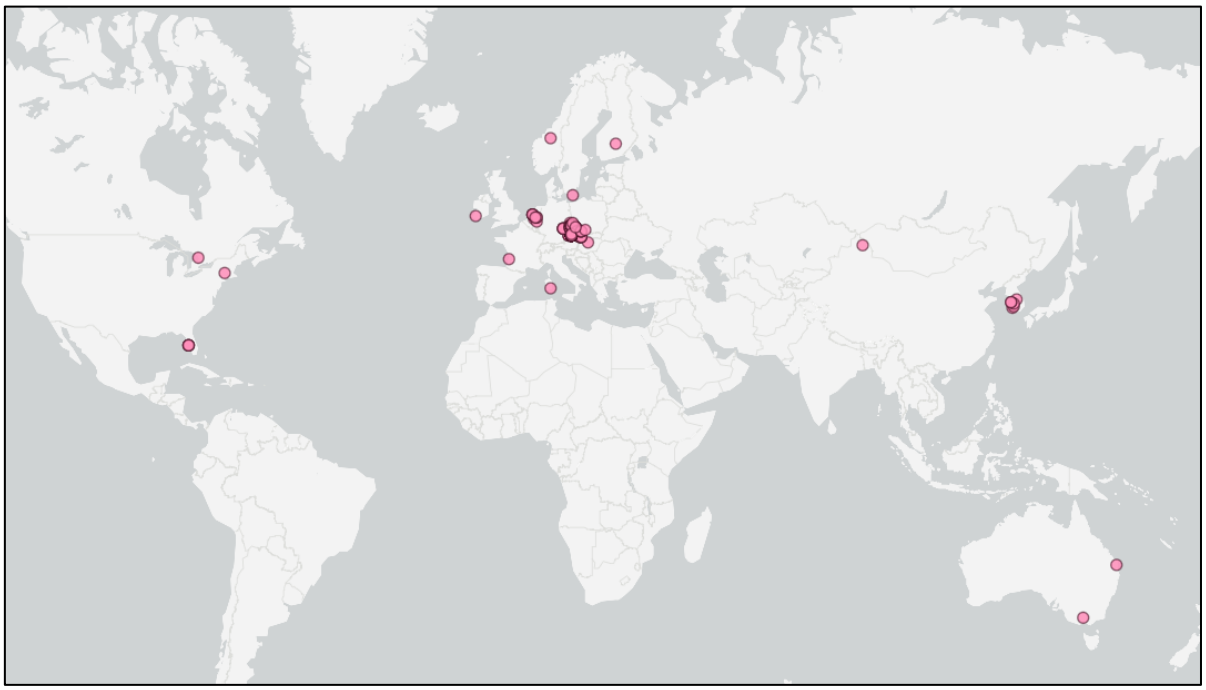
látka	**koncentrace**	**množství**
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.09 M	1 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.11 M	1 ml
$NaHCO_3$	0.38 M	1 ml
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.02 M	1 ml
$NaNO_3$	0.49 M	1 ml
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	0.05 M	2 ml
Stopové prvky kovů (tab. 3)	-	1 ml
TES pufr	-	0.116 g
MES pufr	-	0.200 g
sekundární vitamíny (tab. 2)	-	1 ml
Půdní dekokt	-	20 ml

Tabulka č. 2: Složení sekundárních vitamínů pro WC-chryso médium (množství na 1 litr destilované vody)

látka	**zásobní roztok**	**množství**	**výsledná koncentrace**
Thiamine · HCl (vitamín B_1)	-	100 mg	$2.96x10^{-7}$ M
Biotin (vitamín H)	0.2 g/l dH_2O	2.5 ml	$2.05x10^{-9}$ M
Vitamín B_{12} (cyanocobalamin)	0.5 g/l dH_2O	1 ml	$3.69x10^{-10}$ M

Tabulka č. 3: Složení stopových mikroprvků pro WC-chryso médium (množství na 1 litr destilované vody)

látka	**množství [mg]**
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	31.4
$MnSO_4 \cdot H_2O$	4.50
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1.46
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2.35
NH_4VO_3	0.13
Na_2SeO_3	0.27



Obrázek č. 7: Geografické rozšíření jednotlivých měřených kmenů rodu *Mallomonas*

3.2 Stanovení obsahu jaderné DNA

3.2.1 Příprava vzorku na FCM

Pro přípravu vzorků na průtokovou cytometrii byly z každé kultury odebrány 2 ml, ideálně v její exponenciální fázi růstu. Mikrozkumavka Eppendorf se 2 ml kultury byla následně zcentrifugována při 5500 rpm po dobu pěti minut pro oddělení pevné fáze (biomasy) od tekuté fáze (média). Poté bylo pipetou opatrně odebráno médium a následně přidáno 350 µl Otto I pufru (0.1 M kyselina citronová monohydrát, 0,5% Tween 20; podle Doležel, et al. (2007)). Pro homogenizaci biomasy s pufrem byl krátce použit vortex při minimální rychlosti. Vzorky připravené pro FCM byly měřeny do 12 h od jejich přípravy.

3.2.2 Příprava standardů pro FCM

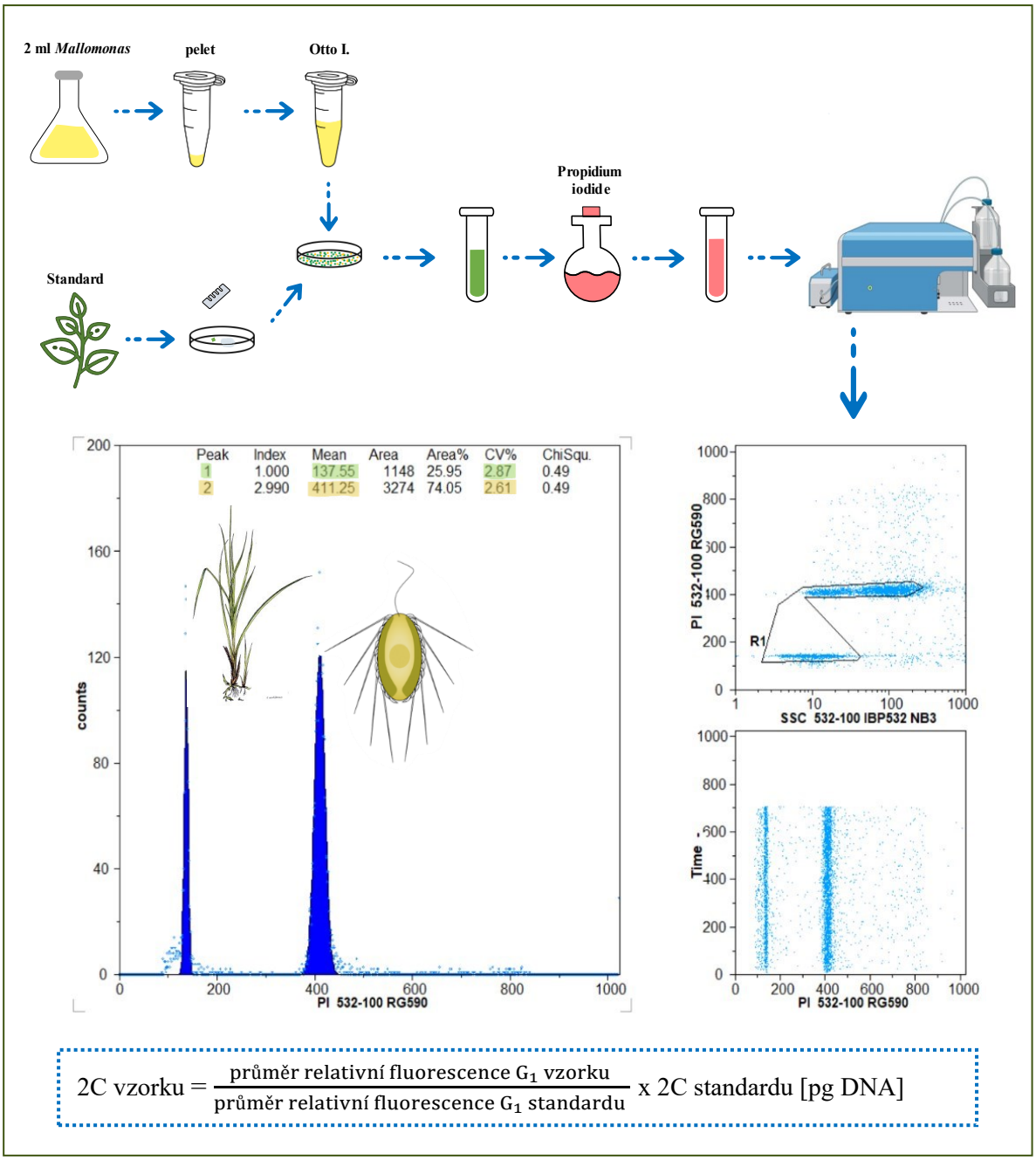
Výběr vhodného standardu byl důležitým krokem při analýze studovaného kmene rodu *Mallomonas*. Jako (pseudo)-interní standard byl použit čerstvý rostlinný materiál, a to konkrétně listy *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 7.841 pg; Šmarda, et al. (2014)), *Solanum pseudocapsicum* (*„commercial clone“*, 2C = 2.59 pg; Temsch, et al. (2010)), *Carex acutiformis* („*wild clone*“, 2C = 0.82 pg; Veselý, et al. (2012)). Množství přidaného listového pletiva se lišilo v závislosti na zvoleném standardu. Pro *Carex* muselo být použito více biomasy než například pro *Solanum*. Avšak ve většině případů se hmotnost standardu pohybovala okolo 20 mg. Standardy byly nasekány ostrou žiletkou v plastových Petriho miskách s 650 µl ledově vychlazeného Otto I pufru, čímž došlo k mechanickému narušení buněčné stěny a izolaci jader standardu. K takto připravenému standardu byla přidána řasová biomasa (200 µl – 300 µl), tak aby byl co nejvíce vyvážen poměr jader řasy ku standardu. Obě složky byly společně důkladně promíchány a přeneseny pipetou přes filtr (42µm nylonová síťka) do speciální 3.5ml cytometrické zkumavky.

3.2.3 Analýza množství jaderné DNA a procentuálního zastoupení GC párů bází

Pro přibližně 20 vzorků bylo připraveno propidium jodid fluorescenční značení (PI) o objemu 25 ml skládající se z: Otto II pufr (0.4 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; V = 20-25 ml),1 ml RNázy, 1 ml PI a 44 µl β-merkaptoethanolu podle Doležel, et al. (2007). Přidání RNázy je nezbytné, protože PI se váže kromě DNA i na RNA, a tu je potřeba ve vzorku rozštípat (Greilhuber, et al., 2007; Suzuki, et al., 1997). Připravené PI značení bylo ponecháno při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Ke každému vzorku bylo dále přidáno 900 µl PI roztoku. Takto připravený vzorek byl poté analyzován průtokovým cytometrem Partec CyFlow Space opatřeným zeleným *solid-state* laserem o vlnové délce 532 nm.

Před každým FCM měřením byly analyzovány standardy samostatně pro ověření kvality měření – koeficientu variability píku (CV hodnota). Pokud bylo CV vyšší než 5 %, tak byl cytometr promyt vodou zředěným savem a případně seřízen. Po dosažení požadované CV hodnoty standardu se mohlo přejít k samotné analýze obsahu jaderné DNA vzorků řas. Kmeny každého nově analyzovaného druhu rodu *Mallomonas* byly nejprve měřeny bez standardu pro pilotní analýzu píku na škále relativní fluorescence. Při následných vlastních analýzách množství jaderné DNA byly kmeny daného druhu již měřeny s příslušným zvoleným standardem. Vzorky byly měřeny rychlostí 25-40 jader za sekundu a analýza skončila při dosažení 5 000 změřených částic (jader). V průběhu měření byla také kontrolována kvalita navázání fluorochromů a kontinuita měření. Výsledky FCM byly analyzovány pomocí programu FloMax (verze 2.4d) a výpočet absolutního množství jaderné DNA se řídil vzorečkem podle Doležel & Bartoš (2005) viz obr. 8. Pík vzorku o nižší intenzitě fluorescence byl určen jako jádra v G_1 fázi buněčného cyklu, pík o násobně vyšší intenzitě fluorescence jako jádra v G_2 fázi buněčného cyklu. Z důvodu ne zcela jasné ploidní úrovně studovaných vzorků je v diplomové práci spíše používán termín *množství jaderné DNA* namísto termínu *velikost genomu*, která je vztažena k jedné, případně dvěma chromozomovým sadám (1C/2C hodnota). Pro téměř každý kmen byla provedena alespoň tři nezávislá měření s odstupem nejméně jednoho dne, pro minimalizování odchylek měření vzniklých nastavením aparatury cytometru. Pokud se jednotlivé naměřené hodnoty lišily o více než 3 %, bylo provedeno dodatečné měření. Z vyhovujících měření byl následně vypočítán průměr. Celková příprava vzorku pro PI FCM a jeho analýza je blíže znázorněna na obrázku č. 8.

V případě, kdy bylo zapotřebí zjistit poměr obsahu AT ku GC párů bází, byl ke vzorku přidán DAPI roztok skládajícího se z: 1 ml Otto II pufru, 4 $\mu g \cdot ml^{-1}$ DAPI a 2 $\mu l \cdot ml^{-1}$ β-merkaptoethanolu. Vzorek obarvený DAPI byl analyzován průtokovým cytometrem Partec CyFlow Space vybaveným UV laserem/LED paprskem o vlnové délce 355/365 nm. V porovnání s PI FCM byla analýza zastavena po dosažení 3 000 změřených jader. Počet GC párů bází byl stanoven prostřednictvím veřejně dostupné excelovské tabulky *http://sci.muni.cz/botany/systemgr/download/Festuca/ATGCFlow.xls* (Šmarda, et al., 2008).

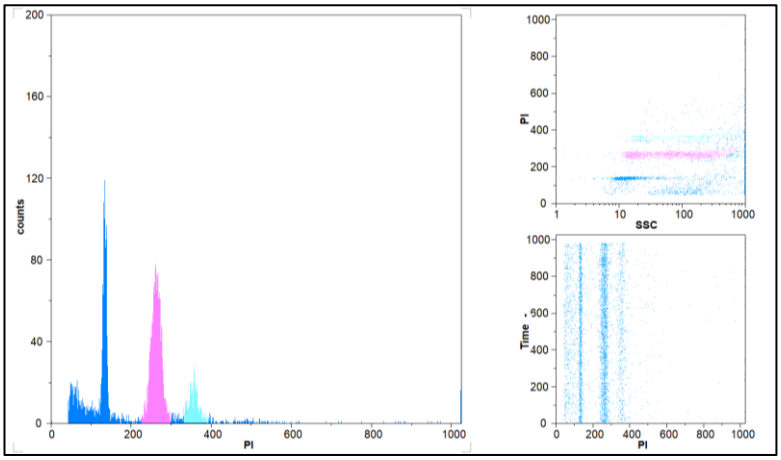


Obrázek č. 8: Grafické znázornění přípravy vzorku pro PI FCM a výsledná analýza včetně ukázky ohraničení píků jader (tzv. gating) v programu FloMax ver. 2.4d – vlastní schéma

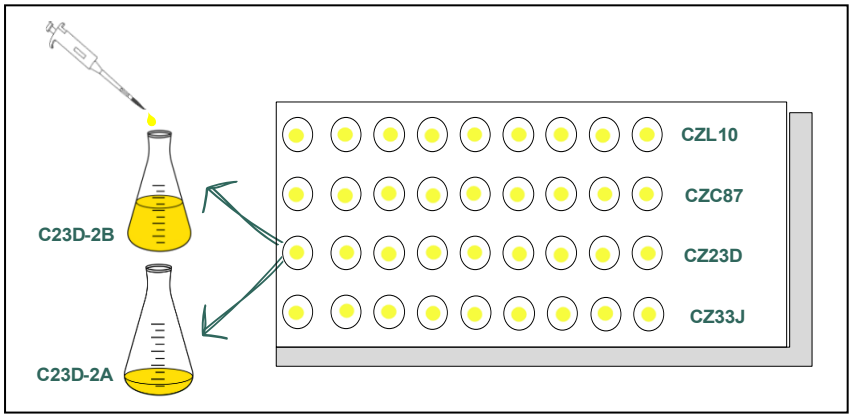
3.3 Analýza píků s odlišnou intenzitou fluorescence

V průběhu FCM měření se u některých kmenů objevoval další pík, který neodpovídal G_1/G_2 fázi standardu či vzorku (obr. 9). Proto byl připraven jednoduchý experiment s cílem zjistit, zda se nejedná o kontaminaci anebo v jaké fázi růstu kultury se tento neobvyklý pík objeví. Pro tento experiment byly vybrány čtyři druhy šupinatých chrysomonád: *Mallomonas alpina* – CZ23D, *M. schwemmlei* – CZ33J, *Synura glabra* – L10 a *S. petersenii* – C87, u kterých

se tento neobvyklý pík v předchozích FCM analýzách objevil. Do kultivačních destiček s objemem jamek 3 ml byly re-izolovány jednotlivé buňky pro vyloučení případné předchozí kontaminace. Po uplynutí tří týdnů bylo z každé jamky pipetou přeneseno 0.5 ml kultury do dvou 50ml Erlenmayerových baněk s WC-chryso médiem (V = 35 ml). Takto bylo založeno 5 kultur „A“ a 5 kultur „B“ od každého kmenu (obr. 10). Jakmile byla kultura dostatečně narostlá a umožňovala FCM analýzu, byly z každé Erlenmayerovy baňky odebrány 2 ml. Do kultury „B“ bylo následně doplněno stejné množství čerstvého média pro zachování konzistentního objemu kultury, za účelem udržení kmene co nejdéle v exponenciální fázi růstu. Měření bylo opakováno 1krát týdně v pravidelných intervalech až do doby, kdy byla veškerá kultura spotřebována, nebo do doby, kdy již nebylo možné vzorek analyzovat vzhledem ke stáří (a špatné kvalitě) kultury. V případech, kdy byl detekován pík s odlišnou intenzitou fluorescence, byla kultura změřena i na DAPI FCM pro zjištění obsahu GC párů bází (viz kapitola 4.2.3). Experiment byl ukončen v bodě, kdy došlo k vyčerpání veškerého média v kultuře „A“.



Obrázek č. 9: Histogram intenzity fluorescence pro kmen CZ23D „B“, tmavě modře znázorněný pík G_1 fáze standardu, růžově pík G_1 fáze *Mallomonas* a světle modře dodatečný pík *Mallomonas*



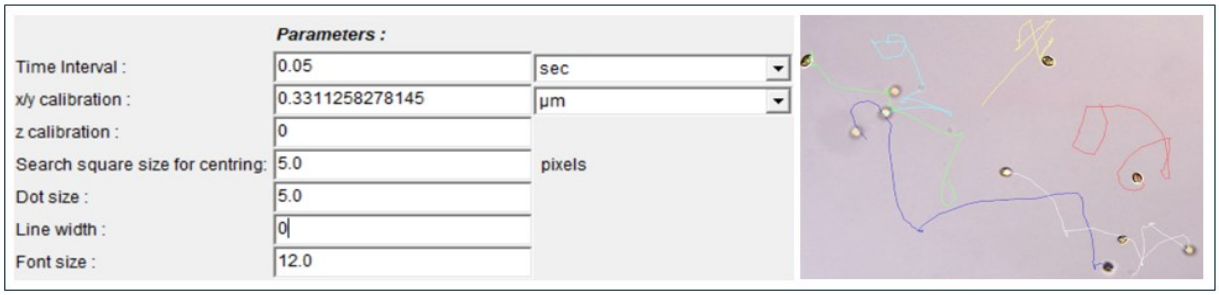
Obrázek č. 10: Grafické znázornění založení kultur pro navržený experiment

3.4 Analýza rychlosti pohybu

Na základě zjištěného množství jaderné DNA bylo pro analýzu rychlosti pohybu vybráno 28 kmenů napříč rodem *Mallomonas* tak, aby byla pokryta co největší škála množství jaderné DNA. Seznam kmenů je uveden v tabulce č. 8 (kapitola 5.5). Kultury byly pěstovány v kultivačních destičkách s objemem jamek 5 ml, obsahujících WC-chryso médium po dobu 3 až 4 týdnů při teplotě 12°C. Po uplynutí této doby byla pro každou kulturu natočena krátká videa. Záznam videí proběhl pomocí programu CamStudio (Kodek InteliYUV), který umožňuje nahrávání obrazovky počítače s obrazem z mikroskopu Olympus DP72 při 40x zvětšení. Pro záznam bylo na podložní sklíčko napipetováno 40 µl kultury.

Natočená videa musela být vzápětí transformována do podoby sekvence po sobě jdoucích fotografií. K úpravě byl použit program VirtualDub (ver. 2). Následně bylo potřeba zajistit jednotnou délku videa pro každý kmen. Pro zjištění nejideálnější délky byla videa transformována do dvou různých časových úseků – pětisekundové a dvousekundové, kdy 5s vyšla jako ta problematičtější. Z tohoto důvodu byla zvolena varianta dvou sekundových videí skládajících se z 50 segmentů, kdy rozdíl mezi každým segmentem byl 0.05 s.

Rychlost pohybu byla analyzována pomocí programu ImageJ (verze 1.54i 03). Nejprve bylo nakalibrováno měřítko. Dále bylo nahráno připravené segmentované video, na které byla použita funkce „*Manual Tracking*“ s nastavením dle parametrů uvedených v obrázku č. 11. Rychlost pro danou buňku byla vypočítána jako průměr rychlostí mezi 50 segmenty fotografií. Pro každý kmen byla měřena rychlost pro 50 buněk (s kontinuálním pohybem; příloha 1) a jako výsledná rychlost byla brána jejich mediánová hodnota. Kromě rychlosti pohybu byla také měřena velikost buněk (šířka, délka) a následně byl udělán průměr z 30 buněk pro každý kmen.

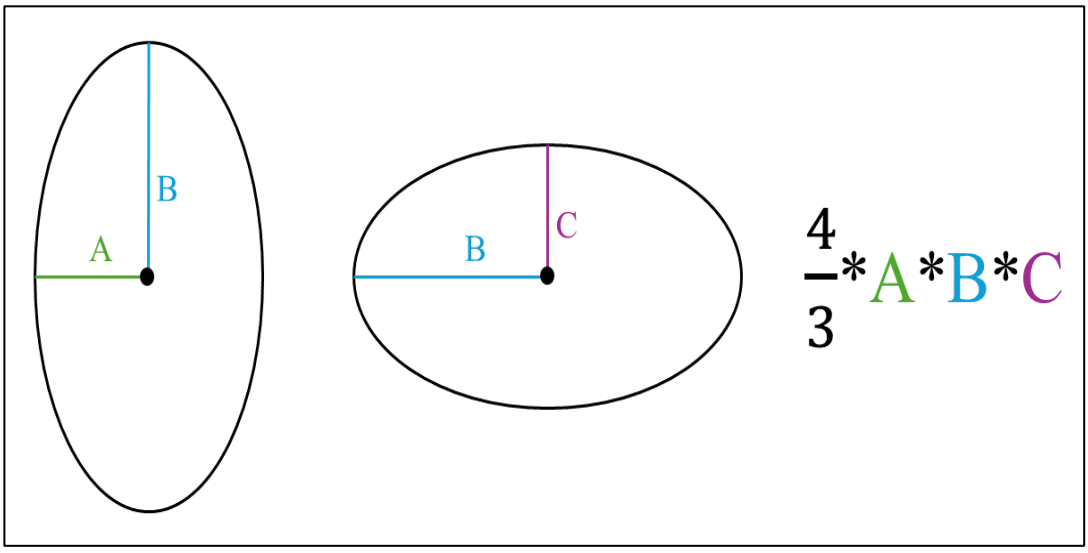


Obrázek č.11: Vlevo – parametry potřebné pro analýzu rychlosti pohybu, vpravo – grafické znázornění dráhy měřených buněk

3.5 Analýza velikosti buňky

Pro analýzu velikosti buňky bylo vybráno 54 druhů rodu *Mallomonas*. Pro jednotlivé druhy byla zvolena průměrná hodnota množství jaderné DNA analyzovaných kmenů. Některé druhy – *M. pillula f. exannulata*, *M. heterospina* nebyly do analýzy zahrnuty z důvodu nedostatečného počtu FCM měření. Z analýzy byly dále vyloučeny druhy s vysokou vnitrodruhovou variabilitou.

Rozměry buněk (šířka a délka) byly dohledány v publikovaných studiích, případně doměřeny (obrazová analýza pomocí ImageJ). Informace o tom, z jakého článku rozměry pocházejí, je uvedeno v tabulce č. 7 (kapitola 5.4). Pro zjednodušení byly buňky tvarově považovány za ideální elipsoid. Jednalo se o nejlepší variantu, jak se s dostupnými daty přiblížit k reálnému tvaru buněk *Mallomonas*. Pro přepočet parametrů na objem buňky byl využit vzoreček pro výpočet objemu obecného elipsoidu (obr. 12). Jako parametr „A“ a „C“ byla použita ½ šířky buňky a jako parametr „B“ ½ délky buňky.



Obrázek č. 12: Základní informace o parametrech potřebných pro výpočet tvaru obecného elipsoidu – převzato z webové stránky: https://shorturl.at/jCHIW

Separátní analýza velikosti buňky byla provedena na parametrech buněk získaných při analýze rychlosti pohybu. Objem buněk byl vypočítán podle stejného uvedeného vzorečku na obr. 12. Ve výsledcích je tento získaný dataset referován jako dataset 2.

3.6 Analýza ekologických proměnných

Pro získání dat ekologických proměnných byly využity 2 databáze – WorldClim a SoilGrid. Zatímco databáze WorldClim poskytovala informace o 19 bioklimatických proměnných, SoilGrid databáze umožnila získat data o 9 půdních parametrech z jednotlivých odběrových lokalit kmenů *Mallomonas*. Protože jsou křemičité šupiny rodu *Mallomonas* druhově specifické, byly do datasetu zahrnuty nejen lokality vlastních měřených kmenů, ale také záznamy o výskytu jednotlivých druhů z online databáze *https://chrysophytes.eu/* (Škaloud, Škaloudová, et al., 2013). Z datasetu byly odstraněny druhy s vysokou vnitrodruhovou variabilitou anebo s nízkým počtem FCM měření. Jako hodnota množství jaderné DNA byla použita průměrná hodnota pro každý druh rodu *Mallomonas*.

Půdní parametry ze SoilGrid databáze byly vygenerovány s nejvyšším prostorovým rozlišením (250 m) pomocí programu R-Studio (ver. 4.3.1) s nainstalovanými knihovnami – *soilDB*, *aqp* podle Hengl, et al. (2017). Z datasetu bylo vyextrahováno 9 půdních parametrů uvedených v tabulce č.4. Pro každý druh byla vypočítána průměrná hodnota jednotlivých půdních parametrů z jednotlivých lokalit.

Tabulka č. 4 vysvětlení jednotlivých půdní parametrů ze SoilGrid databáze

parametr	Význam zkratek půdních parametrů
bdod	objemová hustota jemné frakce zeminy [kg/dm³]
cec	kationtová výměnná kapacita půdy [cmol(c)/kg]
cfvo	objemový podíl hrubých fragmentů (>2 mm) [$cm^3/100cm^3$, (%)]
clay	podíl jílovitých částic (<0.002 mm) v jemné zemině [g/kg]
nitrogen	celkový obsah dusíku [g/kg]
phh2o	pH půdy
sand	podíl částic písku (>0.05 mm) v jemné zemině [g/100kg, (%)]
silt	podíl jílovitých částic (≥0.002 mm a ≤0.05 mm) v jemné zemině [g/100g,(%)]
soc	obsah organického uhlíku v jemné zemině [g/kg]

Program R-Studio byl využit pro vyextrahování dat z databáze WorldClim ver. 2 (http://worldclim.org/) v nejvyšším dostupném rozlišení (30 úhlových vteřin za sekundu ≈ 1 km2; Fick, et al. (2017)). Pro extrakci dat bylo potřeba nainstalovat tři knihovny – *raster, tools, sp*. Celkem bylo sledováno 19 bioklimatických proměnných (tab.5) zahrnujících různé aspekty klimatu, včetně ročních trendů, sezónnosti a extrémních podmínek. Pro každý druh byla vypočítána průměrná hodnota jednotlivých bioklimatických parametrů z jednotlivých lokalit.

Tabulka č. 5 vysvětlení jednotlivých bioklimatických parametrů z WorldClim databáze

parametr	Význam zkratek bioklimatických parametrů
BIO1	roční průměrná teplota [°C] - indikace celkového klimatu dané oblasti
BIO2	průměrný denní rozsah teploty [°C] – denní zažívané teplotní fluktuace v dané oblasti
BIO3	isotermalita (BIO2/BIO7) (×100) - rovnoměrnost teploty během roku
BIO4	sezónnost teploty (standardní odchylka ×100) - variaci teploty v různých ročních obdobích v průběhu jednoho roku, indikující stupeň teplotních fluktuací
BIO5	maximální teplota nejteplejšího měsíce [°C]
BIO6	minimální teplota nejchladnějšího měsíce [°C]
BIO7	roční rozsah teploty (BIO5-BIO6 [°C] - odráží celkovou teplotní variabilitu
BIO8	průměrná teplota nejvlhčího čtvrtletí [°C] - reprezentuje průměrnou teplotu během nejvlhčího tříměsíčního období v roce
BIO9	průměrná teplota nejsuššího čtvrtletí [°C] - odráží teplotní podmínky během období nízkých srážek
BIO10	průměrná teplota nejteplejšího čtvrtletí [°C] - poskytuje informace o letních podmínkách
BIO11	průměrná teplota nejchladnějšího čtvrtletí [°C] - odrážející zimní podmínky
BIO12	roční úhrn srážek [mm] - celkové měřítko vlhkosti
BIO13	úhrn srážek v nejvlhčím měsíci [mm]
BIO14	úhrn srážek v nejsušším měsíci [mm]
BIO15	sezónnost srážek (koeficient variace) - odrážející stupeň fluktuací zažívaných srážek
BIO16	úhrn srážek nejvlhčího čtvrtletí [mm]
BIO17	úhrn srážek nejsuššího čtvrtletí [mm]
BIO18	úhrn srážek nejteplejšího čtvrtletí [mm]
BIO19	úhrn srážek nejchladnějšího čtvrtletí [mm]

Pro některé lokality byly také k dispozici informace o teplotě, konduktivitě a pH vody. Tato data byla buď uvedena ve výše zmíněné databázi *„chrysophytes.cz“* nebo v datasetu právě běžících projektů na Přírodovědecké fakultě. Pro každý druh byla takto vypočítána průměrná hodnota jednotlivých parametrů (příloha č. 3). Z průměrovaných zeměpisných šířek (lat) byl odstraněn jeden bod kvůli své odlehlé hodnotě.

3.6.1 Vytvoření mapy geografického rozšíření

GPS souřadnice lokalit měřených kmenů *Mallomonas* byly nahrány do programu ArcGIS pro sledování geografického rozložení množství jaderné DNA. Ke každé souřadnici byla přiřazena odpovídající hodnota množství jaderné DNA, a dle této hodnoty byly rozděleny do pěti barevně rozlišených kategorií.

3.7 Rekonstrukce evoluce velikosti genomu

V této diplomové práci byl využit převzatý fylogenetický strom vytvořený v rámci probíhajícího projektu GAČR s vedením doc. Mgr. Pavla Škalouda, Ph.D. (příloha č. 5). Rekonstrukce fylogenetického stromu byla provedena pomocí metody maximální věrohodnosti neboli ML (Maximum Likelihood) na základě tří molekulárních markerů – malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA), velké podjednotky RUBISCO (*rbc*L) a interního transkribovaného spaceru (ITS rDNA). Marker ITS byl osekvenován pro každý kmen, SSU a *rbc*L jen pro vybrané kmeny s unikátní ITS sekvencí. Pro některé kmeny se nepodařilo získat ani jeden ze zmíněných markerů. Do rekonstrukce fylogeneze množství jaderné DNA nebyly zahrnuty druhy s velkou vnitrodruhovou variabilitou anebo druhy pouze s jedním FCM měřením. Pokud bylo množství jaderné DNA v rámci druhu spíše nevariabilní, byla vypočítána jejich průměrná hodnota. V případě, kdy pouze jeden kmen varíroval, tak byl z datasetu vyřazen a byly použity jen ty hodnoty, co si velikostí genomu vzájemně odpovídaly.

Pro namapování množství jaderné DNA na fylogenetický strom byl využit program R-Studio ver. 4.2.1 (R Core Team, 2023) s nainstalovanou knihovnou *phytools* (Revell, 2012). Výsledný fylogenetický strom byl následně zobrazen v programu FigTree (verze 1.4.4) a upraven v Adobe Illustrator CS3.

3.8 Statistická analýza dat

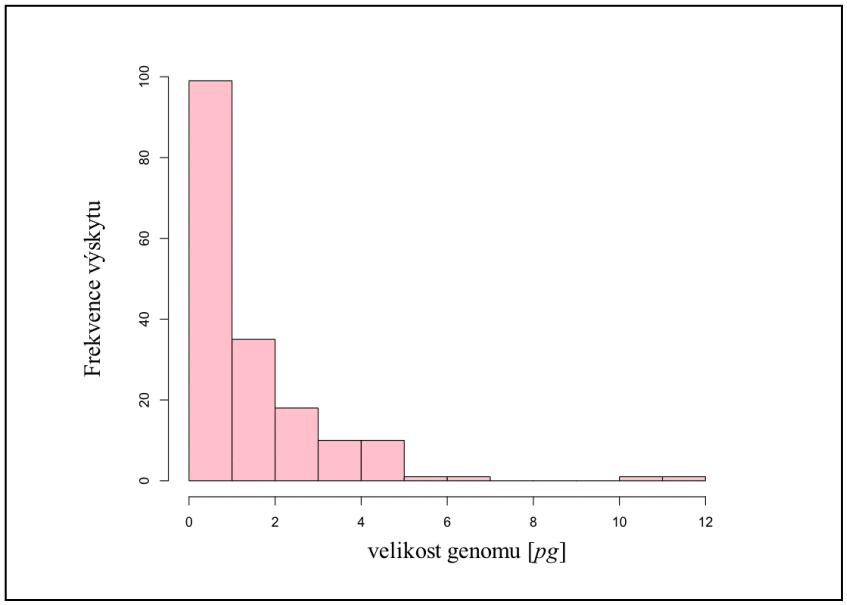
V rámci této diplomové práce byl k analýze dat a provádění statistických výpočtů využit statistický software R-Studio ver. 4.2.1 (R Core Team, 2023). Pro testování vztahů mezi proměnnými byl použit lineární regresní model. Pro každý analyzovaný parametr byla testována normalita rozložení dat, a to pomocí Shapiro-Wilkova testu (Shapiro, et al., 1965). V případě, že data nevyhovovala předpokladům normálního rozložení, byla upravena pomocí logaritmické či odmocninové transformace.

Metodou fylogenetického zobecnění nejmenších čtverců neboli PGLS (Phylogenetic Generalized Least Squares) byly v regresi zohledněny fylogenetické příbuznosti druhů. Model PGLS byl vytvořen ve statistickém softwaru R-Studio s nainstalovanou knihovnou *caper* (Orme, et al., 2013). Metodou ML bylo umožněno získaní škálovacího parametru lambda = λ (Pagel, et al., 2004), který poskytoval informaci o intenzitě fylogenetického signálu na škále od 0-1, kdy hodnoty blížící se nule naznačovaly slabý signál sledovaného znaku (Avaria-Llautureo, et al., 2019).

4 Výsledky

4.1 Variabilita v množství jaderné DNA v rámci rodu *Mallomonas*

Celkem bylo provedeno 702 FCM analýz, na základě kterých bylo odhadnuto absolutní množství jaderné DNA pro 64 druhů rodu *Mallomonas* (165 kmenů; obr. 13). Množství jaderné DNA a jejich směrodatná odchylka jsou uvedeny v příloze č. 6. Mezi druhy s největším množstvím DNA se řadí *M. caudata*, *M. insignis*, *M. flora*, *M. lelymene* a mezi druhy s nejmenším *M. scrobiculata*, *M.heterospina*, *M. tirolensis*, *M. palaestrica* (obr. 13). Celkově bylo nejvíce jaderné DNA stanoveno pro druh *M. caudata* (kmen CZ92A) – 11.3 pg, což je 90krát více než u druhu s nejmenším genomem – *M. scrobiculata* (kmen A12_221; 0.12 pg). Střední – mediánová hodnota množství DNA rodu *Mallomonas* se pohybovala okolo 0.75 pg. Průměrný koeficient variability (CV) měřených vzorků nepřesahoval 3.5 % (medián = 3.4 %), zatímco průměrné CV standardů byla 3.0 % (medián = 2.7 %).



Obrázek č. 13: Histogram znázorňující zastoupení naměřených absolutních velikostí genomů

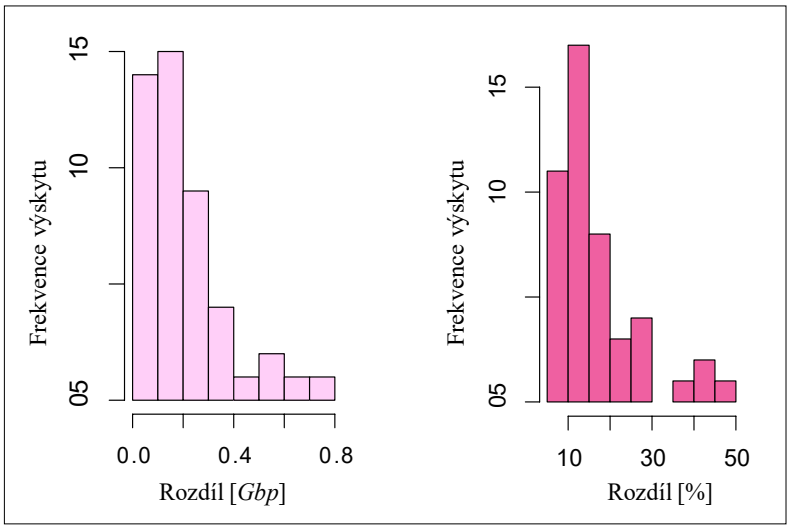
U 14 druhů z 64 byla pozorována výraznější vnitrodruhová variabilita v množství jaderné DNA – *M. adamas, M. alpina, M. annulata, M. corymbosa*, *M crassisquama*, *M. guttata, M. insignis, M. mangofera* f. *foveata, M matvienkoae, M. multiunca, M. multisetigera M. papillosa, M. oviformis, M. striata* var. *striata.* Největší rozptyl v množství jaderné DNA v rámci jednoho druhu byl pozorován u *M. multisetigera*, kde se obsah DNA lišil až pětinásobně (0.42 pg až 4.99 pg). Naopak některé druhy zůstávaly z hlediska množství jaderné DNA spíše

konzervativní, např *M. actinoloma var. maramuresensis M. costata, M. koreana.* To je patrné i na fylogenetickém stromě s namapovanými velikostmi genomu viz obr. 16.

4.2 Analýza píků s odlišnou intenzitou fluorescence

U 5.5 % analyzovaných druhů rodu *Mallomonas* napříč fylogenetickým stromem byla kromě píku jader vzorku v G_1 fázi pozorována přítomnost ještě dalšího píku jader s vyšší/nižší intenzitou fluorescence (ne však násobnou intenzitou fluorescence). Jednalo se o kmeny CZ23D – *M. alpina*, CZ35G – *M. alpina*, CZ30A – *M. lelymene*, CZ93H – *M. oviformis*, Jeongsan 121209J – *M. papillosa*, CZ 33J – *M. schwemmlei*, CZ132E – *M. torquata*, HU04C – *M. tubulosa*. U kmenu CZ183A – *M. akrokomos* byl dokonce detekován výskyt dvou dodatečných píků. Z druhového zastoupení se zdá, že tyto dodatečné píky nejsou druhově specifické. Množství jaderné DNA dodatečného píku bylo většinou oproti G_1 píku *Mallomonas* větší o 44 až 778 Mbp (medián = 193) – procentuálně vyjádřeno o 6 až 46 % (medián = 12 %; obr. 14).

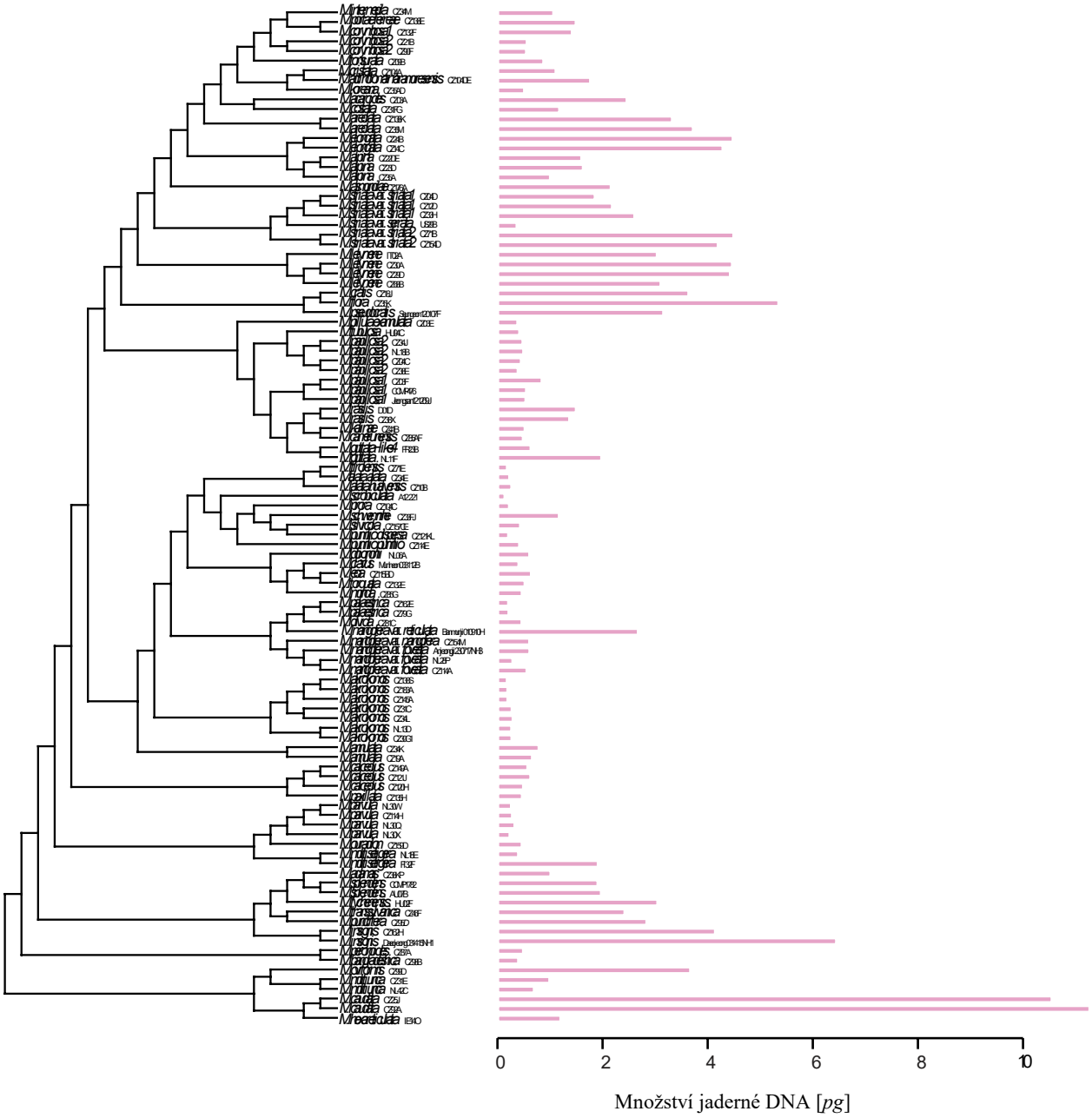
V námi stanoveném experimentu s re-izolovanými buňkami se dodatečný pík objevil pouze u jedné kultury, a to u *M. alpina* CZ23D varianta „B“, do které bylo dodáváno čerstvé médium. Pík se poprvé objevil po 7 týdnech měření, a zůstával přítomen v každé následující FCM analýze až do senescence kultury. Při detekci dodatečného píku byla kultura změřena i na DAPI FCM, což poskytlo informaci o obsahu GC párů bází, který byl pro pík jader v G_1 fázi a dodatečný pík téměř totožný – 44.8 %.



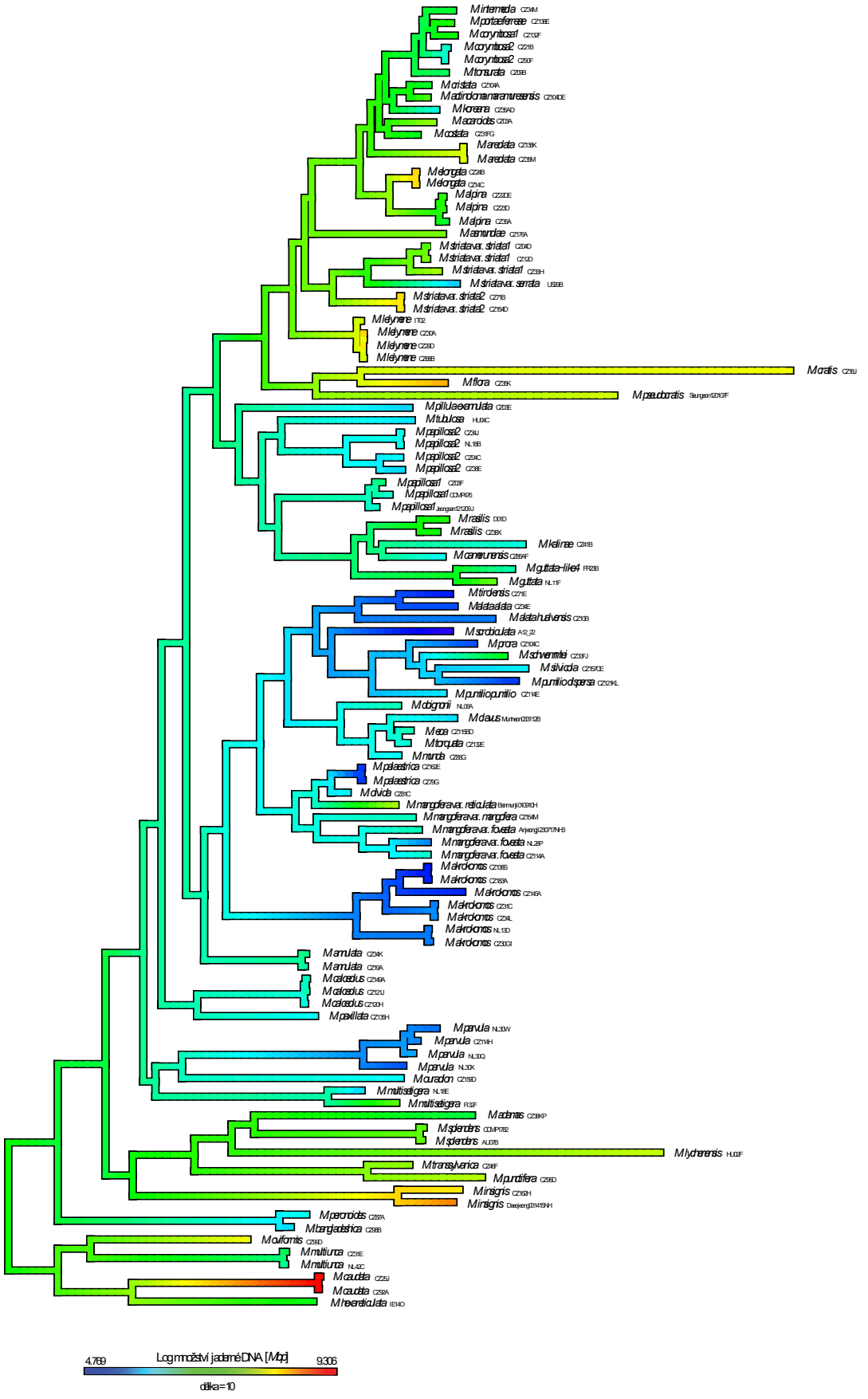
Obrázek č. 14: Levý histogram znázorňuje rozdíl v množství jaderné DNA (Gbp) dodatečného píku od G_1 píku *Mallomonas*. Pravý histogram znázorňuje procentuální rozdíl ve velikosti genomu dodatečného píku od G_1 píku *Mallomonas*

4.3 Rekonstrukce evoluce množství jaderné DNA

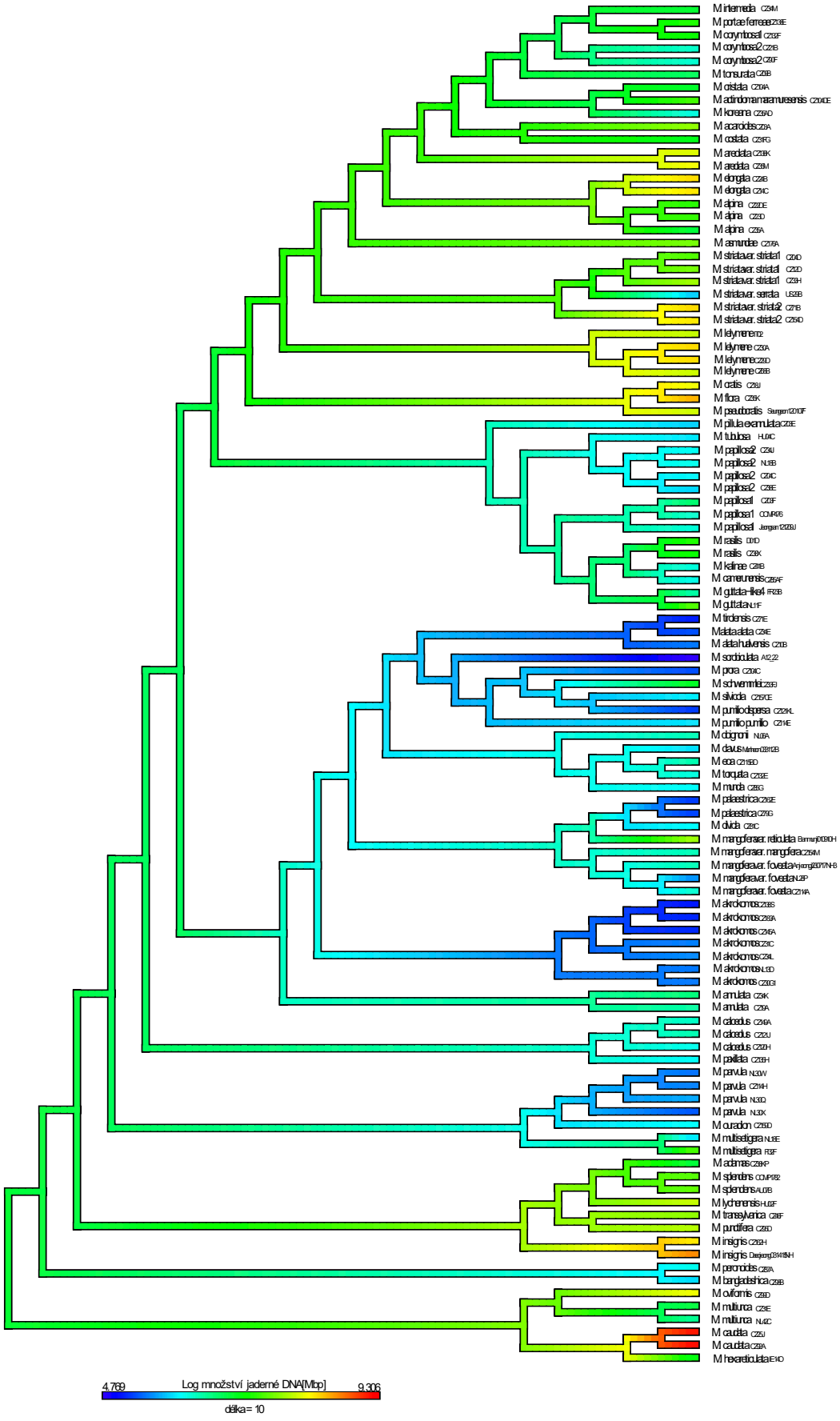
Pro znázornění variability v množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas* byl nejprve vytvořen histogram přiřazený k jednotlivým fylogenetickým větvím měřených kmenů (obr. 15). Následně bylo na tentýž fylogenetický strom vyneseno zlogaritmované množství jaderné DNA pro sledování změn v obsahu DNA u zkoumaných linií (obr. 16). Pro přehlednější vizualizaci byl strom převeden do podoby kladogramu (obr. 17), který ale zanedbává míru substitucí.



Obrázek č. 15: Fylogenetický strom (kladogram) s přiřazeným množstvím jaderné DNA



Obrázek č. 16: Rekonstrukce evoluce množství jaderné DNA *Mallomonas*



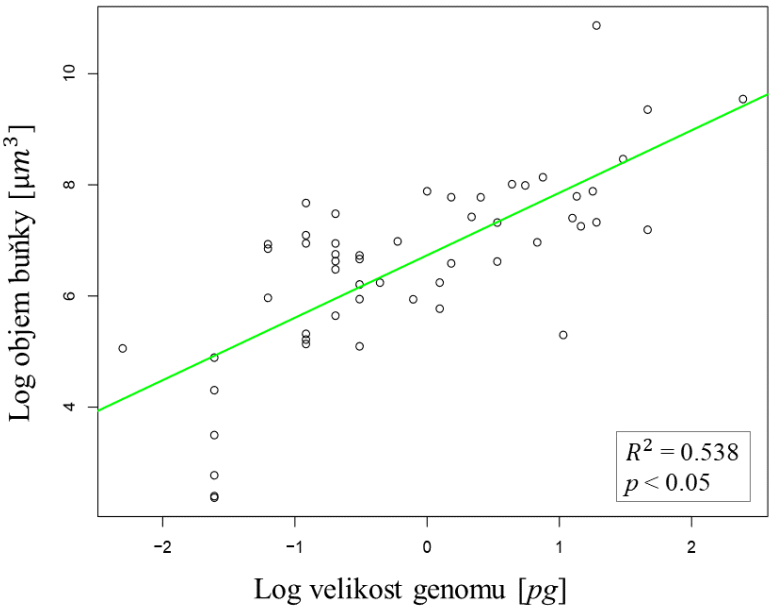
Obrázek č. 17: Kladogram rekonstrukce evoluce množství jaderné DNA rodu *Mallomonas*

Z fylogenetického stromu je patrné, že v průběhu evoluce docházelo spíše k zachování původního množství jaderné DNA anebo k jeho zmenšení např. u *M. akrokomos*, *M. parvula*, *M. palaestrica.* Zatímco u druhů jako např. *M. caudata*, *M. insignis, M. flora*, *M. lelymene* došlo k navýšení množství jaderné DNA. Na základě získané fylogenetického parametru λ = 0.98 (95% konf. interval = 0.95 – 0.99) byl potvrzen silný vliv fylogeneze na množství jaderné DNA ($P < 0.05$).

4.4 Vztah velikosti buňky s množstvím jaderné DNA

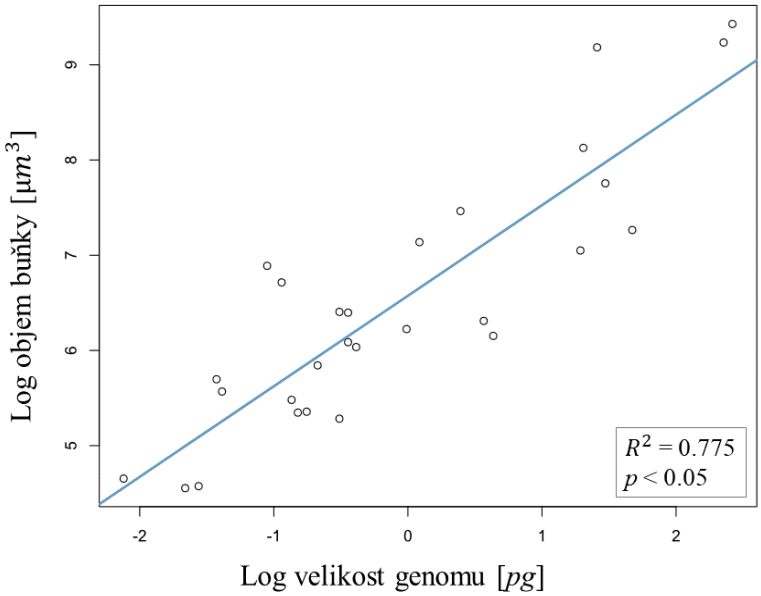
Z 54 druhů rodu *Mallomonas* byl zjištěn nejmenší objem pro *M. alata* f. *huavensis* a *M. tirolensis* – 11 μm^3 a největší pro *M. oviformis* – 52 477 μm^3 a *M. caudata* – 13 957 μm^3 (tab.7). Průměrná hodnota velikosti buňky rodu *Mallomonas* se pohybovala okolo 2 500 μm^3 a mediánová okolo 900 μm^3.

Na základě lineárního regresního modelu byla prokázána signifikantní pozitivní závislost ($P < 0.05$) mezi velikostí buňky 54 druhů rodu *Mallomonas* a množstvím jejich jaderné DNA. Modelem bylo vysvětleno téměř 54 % variability (obr. 18). To znamená, že s rostoucí velikostí buňky dochází k navýšení množství DNA, a naopak. Po zahrnutí vlivu fylogenetické příbuznosti došlo ke snížení vysvětlené variability na 27 %. Škálovací parametr lambda (λ=0.87) poukazoval na silný fylogenetický signál sledovaného znaku. Veškeré výsledky testů jsou uvedeny v tabulce č. 9.



Obrázek č. 18: Pozitivní regresní závislost mezi množstvím jaderné DNA a velikostí buňky pro 54 druhů rodu *Mallomonas*

Z 28 kmenů vybraných pro analýzu rychlosti pohybu (dataset2) byla stanovena největší velikost buňky 12 442 µm^3 pro kmen CZ92A – *M. caudata* a nejmenší 105 µm^3 pro kmen CZ162E – *M. palaestrica* (tab.8). Výsledek lineárního regresního modelu (obr.19) prokázal ještě silnější signifikantní závislost mezi množstvím jaderné DNA a velikostí buňky. Modelem bylo vysvětleno přes 75 % variability. Po zahrnutí fylogenetické korekce zůstávala vysoká míra vysvětlené variability (66 %). Získaná λ se rovnala nule. Veškeré výsledky testů jsou uvedeny v tabulce č. 9.



Obrázek č. 19: Pozitivní regresní závislost mezi množstvím jaderné DNA a velikostí buňky pro kmeny *Mallomonas* vybraných pro analýzu rychlosti pohybu

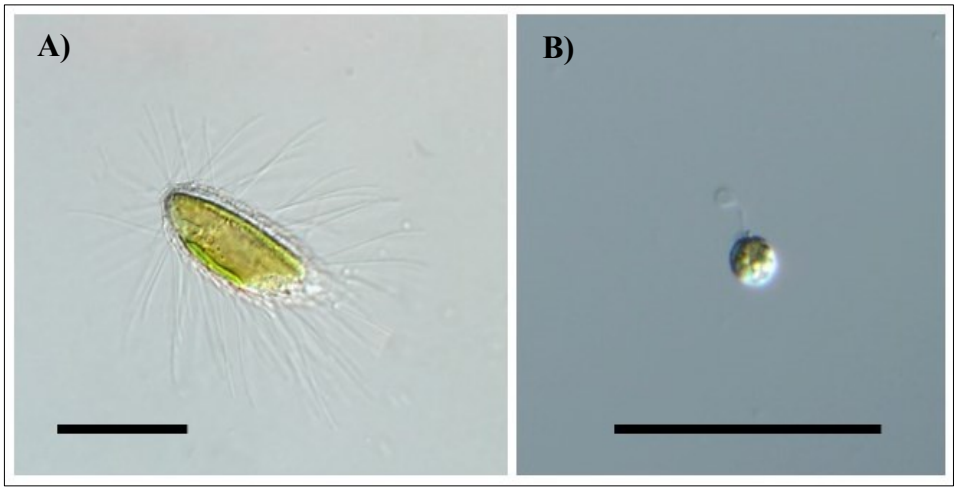
Tabulka č. 7: Výběr druhů rodu *Mallomonas* pro testování závislosti mezi množstvím jaderné DNA a velikostí buňky s uvedenými studiemi, ze kterých pochází informace o rozměrech buňky

druh	**obsah jaderné DNA [*pg*]**	**velikost buňky [μm^3]**	**citace**
M. acaroides	2.4	3416	Siver (1991)
M. actinoloma var. *maramuresensis*	1.7	750	Vlastní měření
M. akrokomos	0.3	390	Siver (1991)
M. alata f. *alata*	0.2	16	Němcová, et al. (2015)
M. alata f. *hualvensis*	0.3	11	Němcová, et al. (2015)
M. alpina	1.4	1674	Siver (1991)
M. annulata	0.7	513	Siver (1991)
M. areolata	3.5	2655	Kristiansen (2002)

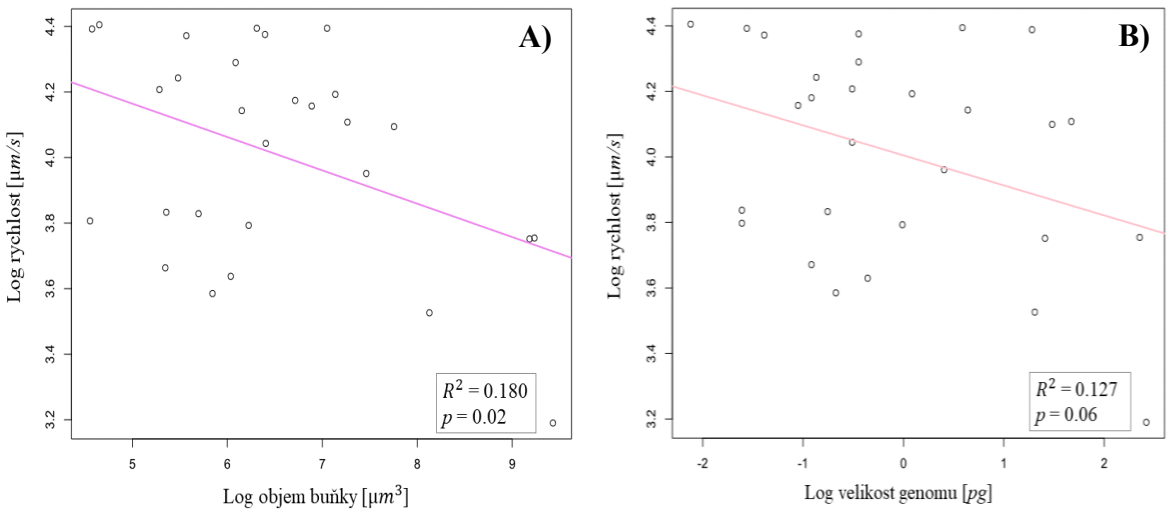
M. asmundiae	2.1	2949	Siver (1991)
M. bangladeshica	0.4	2149	Siver (1991)
M. calceolus	0.6	837	Kristiansen (2002)
M. camerunensis	0.5	854	Piątek, et al. (2016)
M. caudata	10.9	13957	Siver (1991)
M. corymbosa	0.5	1773	Siver (1991)
M. costata	1.2	2386	Kristiansen (2002)
M. crassisquama	1.7	1512	Siver (1991)
M. cratis	3.6	1519	Siver (1991)
M. cristata	1.1	321	Kristiansen (2002)
M. divida	0.4	204	Vlastní měření
M. doignonii	0.6	496	Siver (1991)
M. elongata	4.4	4736	Siver (1991)
M. eoa	0.6	381	Vlastní měření
M. flora	5.3	1328	Kristiansen (2002)
M. hexareticulata	1.2	725	Jeong, et al. (2019)
M. insignis	5.3	11545	Kristiansen (2002)
M. intermedia	1.0	2655	Kristiansen (2002)
M. kalinae	0.5	651	Řezáčová (2006)
M. lelymene	3.2	1414	Kristiansen (2002)
M. lychenensis	3.0	1639	Siver (1991)
M. mangofera f. *foveata*	0.6	785	Dürrschmidt (1983)
M. mangofera f. *mangofera*	0.6	163	Siver (1991)
M. multiunca	0.8	1077	Kristiansen (2002)
M. munda	0.4	184	Vlastní měření
M. ouradion	0.4	1040	Piątek, et al. (2016)
M. oviformis	3.6	52477	Kristiansen (2002)
M. palaestrica	0.2	33	Kristiansen (2002)
M. papillosa	0.5	283	Siver (1991)
M. parvula	0.3	1023	Kristiansen (2002)
M. paxillata	0.5	1039	Kristiansen (2002)
M. portae-ferreae	1.5	2383	Siver (1991)
M. prora	0.2	133	Kristiansen (2002)
M. pseudocratis	3.1	2424	Jeong, et al. (2019)
M. clavus	0.4	170	Kristiansen (2002)
M. pumilio var. *dispersa*	0.2	74	Kristiansen (2002)
M. punctifera	2.8	200	Siver (1991)
M. scrobiculata	0.1	157	Nicholls (1984)
M. schwemmlei	1.1	513	Siver (1991)
M. silvicola	0.4	1204	Harris, et al. (1960)
M. splendens	1.9	3016	Kristiansen (2002)
M. striata var. *serrata*	0.3	945	Jeong, et al. (2019)
M. tirolensis	0.2	11	Němcová, et al. (2015)
M. tonsurata	0.9	380	Siver (1991)
M. torquata	0.5	755	Siver (1991)
M. transsylvanica	2.3	1059	Siver (1991)

4.5 Analýza rychlosti pohybu a její souvislost s množstvím DNA/velikostí buňky

Z 28 kmenů rodu *Mallomonas* byla naměřena největší rychlost pohybu pro druh *M. scrobiculata* – A12_221 (82 *µm/s*) a nejmenší pro *M. caudata* – CZ92A (24 *µm/s*; obr. 20, tab. 8). Průměrná rychlost se pohybovala kolem 60 *µm/s.* Lineárním regresním modelem byla prokázána slabá, ale přesto statisticky signifikantní závislost mezi rychlostí pohybu a velikostí buňky ($P = 0.02$). Tento vztah vysvětlil 18 % variability. V případě množství jaderné DNA a rychlostí pohybu nevyšla žádná statisticky signifikantní závislost (obr. 21). Po zahrnutí fylogenetického signálu nebyla prokázána signifikantní závislost ani v jednom případě stanovených prediktorů. Podrobnější výsledky modelů jsou uvedeny v tabulce č. 9.



Obrázek č. 20: Proporční porovnání velikosti buňky mezi druhy *Mallomonas* A) s největším naměřeným obsahem DNA a nejnižší rychlostí pohybu (*M. caudata*), B) s nejmenším naměřeným obsahem DNA a nejvyšší rychlostí pohybu (*M. scrobiculata*; měřítko 50µm; vlastní fotografie)



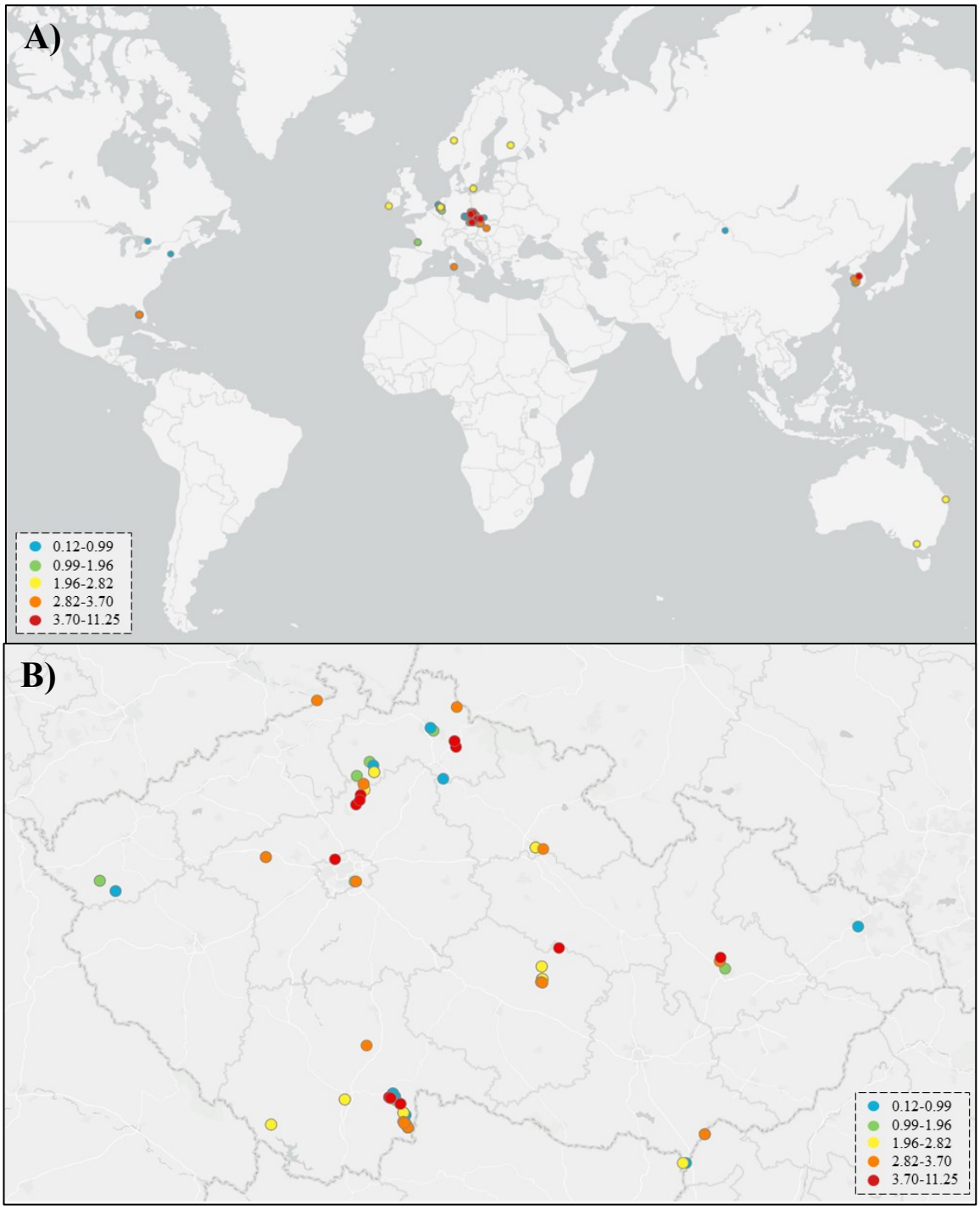
Obrázek č.21: výsledná závislost mezi A) velikostí buňky a rychlostí pohybu, B) množstvím jaderné DNA a rychlostí buňky

Tabulka č. 8: Souhrn kmenů zahrnutých do analýzy rychlosti pohybu s doplněnými informacemi o množstvím jaderné DNA, velikosti buňky a rychlosti pohybu

druh	kmen	velikost genomu [*pg*]	rychlost pohybu [*µm/s*]	velikost buňky [μm^3]
M. scrobiculata	A12_221	0.12	82	105
M. palaestrica	CZ162E	0.19	45	95
M. alata f. *alata*	CZ34E	0.21	81	97
M. parvula	NL30W	0.24	46	298
M. alata f. *hualvensis*	CZ10B	0.25	79.2	262
M. striata var. *serrata*	US29B	0.35	64	981
M. multisetigera	NL18E	0.38	65	824
M. pumilio var. *pumilio*	CZ212W	0.42	70	240
M. divida	CZ81C	0.44	39	210
M. calceolus	CZ120H	0.47	73	212
M. kalinae	CCMP_479	0.51	36	345
M. mangofera f. *mangofera*	CZ154M	0.59	67	197
M. calceolus	CZ121J	0.61	57	605
M. annulata	CZ19A	0.64	79.5	600
M. eoa	CZ115D	0.65	46	440
M. multiunca	NL42C	0.68	38	418
M. adamas	CZ38K	0.99	44	505
M. cristata	CZ104A	1.10	66.2	1258
M. rasilis	D01D	1.48	53	1743
M. actinoloma var. *maramuresensis*	CZ104E	1.76	81	550
M. multisetigera	FI32F	1.89	63	470
M. oviformis	CZ93H	3.26	81	1153
M. areolata	CZ35M	3.70	34.0	3387
M. insignis	CZ162H	4.12	43	9728
M. elongata	CZ24B	4.36	60	2333
M. flora	CZ35K	5.33	61	1429
M. caudata	CZ25J	10.53	43	10239
M. caudata	CZ92A	11.25	24	12442

4.6 Vztah geografického rozšíření, environmentálních proměnných a množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas*

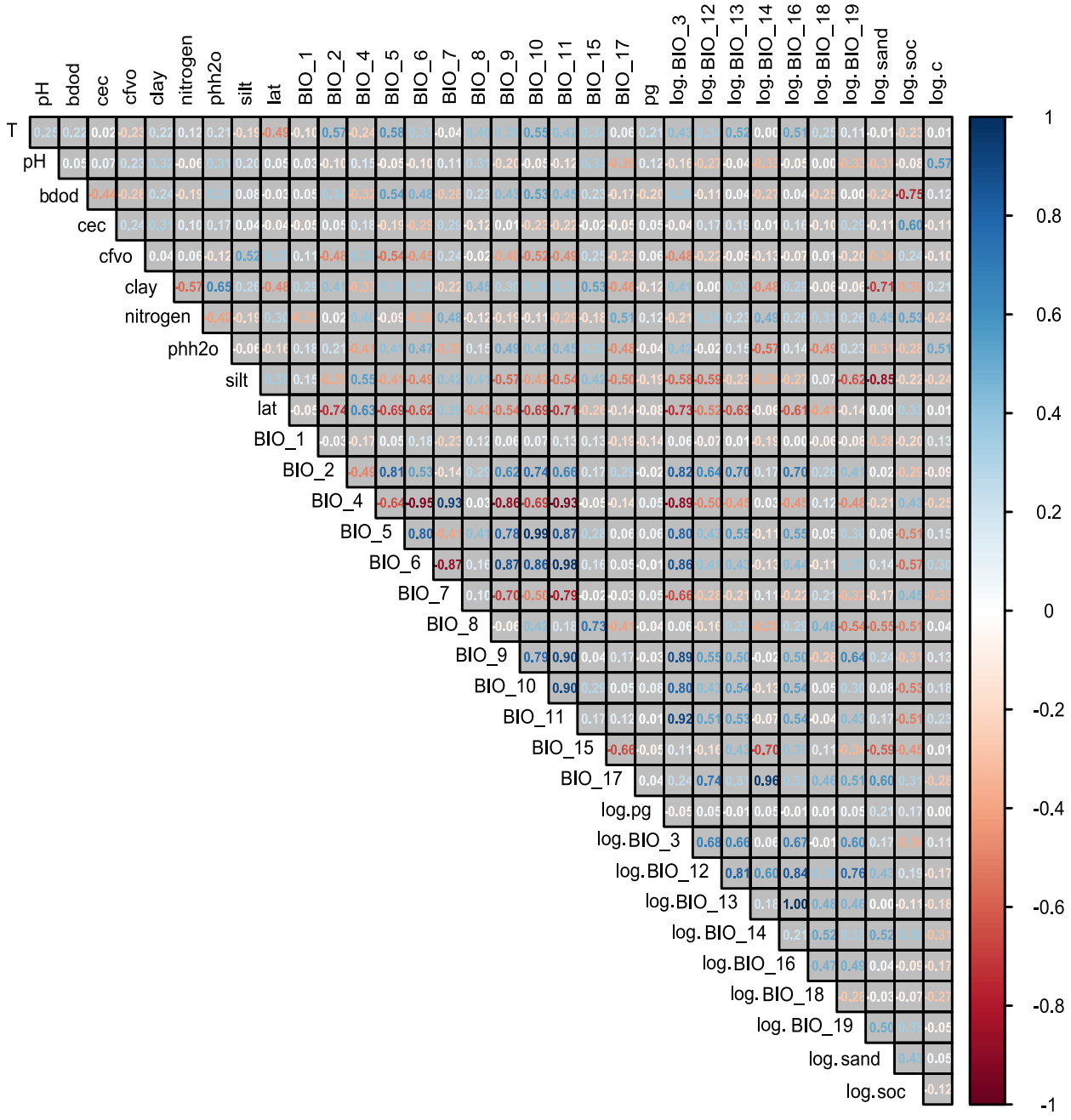
Z vytvořené mapy geografického rozšíření rodu *Mallomonas* s vynesenými hodnotami množství jaderné DNA (obr. 22) nebyl v rámci globální distribuce pozorován žádný trend, podobně tomu bylo i na úrovni České republiky.



Obrázek č. 22: A) světové geografické rozložení analyzovaných kmenů rodu *Mallomonas* s konkrétním množstvím jaderné DNA u jednotlivých kmenů B) distribuce v rámci České republiky

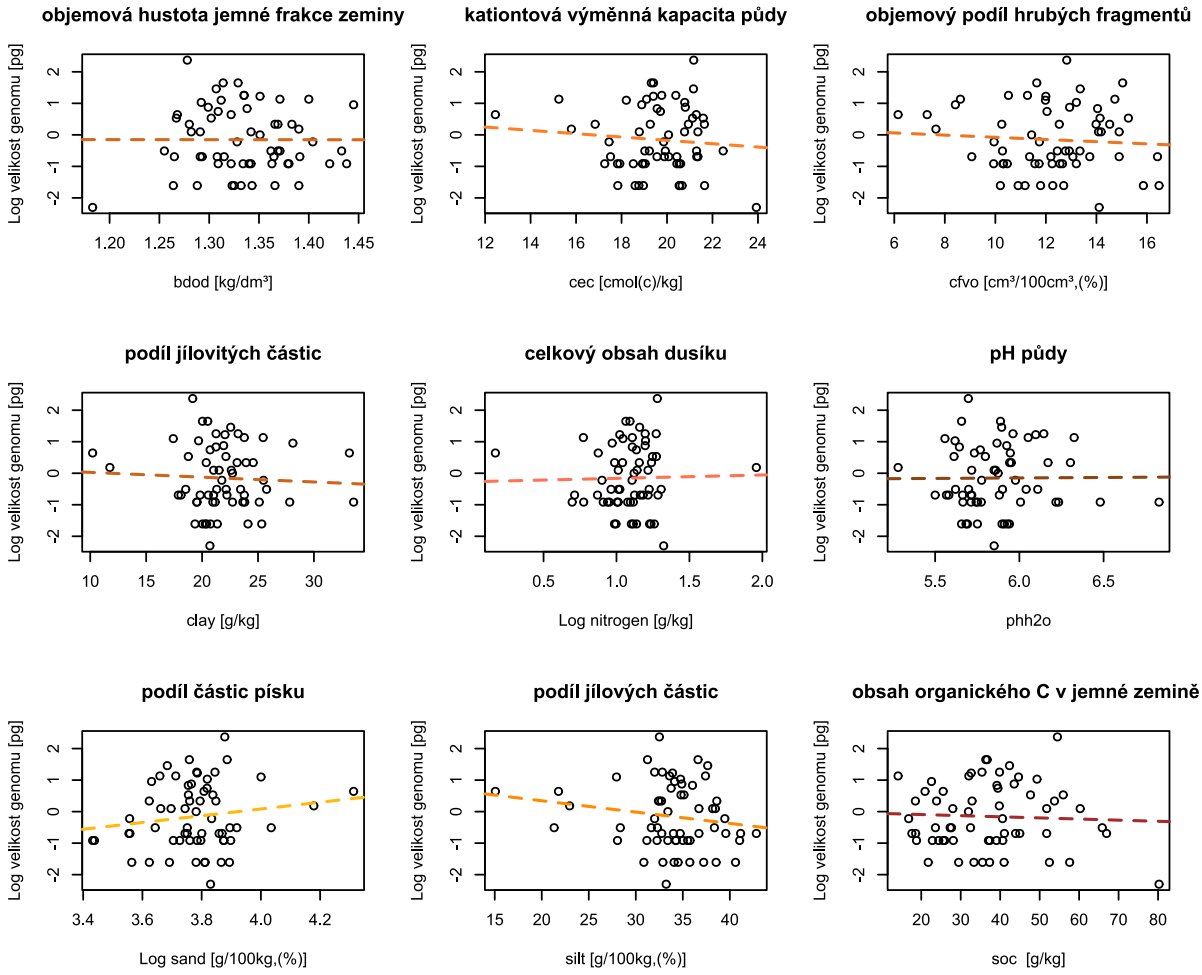
4.6.1 Souvislost s environmentálními proměnnými

Bioklimatická a půdní data k 31 proměnným staženým pro 3 000 lokalit výskytu jednotlivých druhů rodu *Mallomonas* jsou z důvodu své rozsáhlosti uvedeny v elektronické příloze č. 2-3. Pro námi sledované proměnné byla sestavena korelační matice (obr. 23) s uvedenými hodnotami Pearsonova korelačního koeficientu (*r*) měřícího sílu lineární závislosti mezi dvěma proměnnými. Jako silně korelované proměnné byly brány ty s korelačním koeficientem nad hodnotou 0.90 a pod -0.90. Na základě tohoto kritéria byly z datasetu odstraněny následující proměnné – BIO3, BIO4, BIO6, BIO7, BIO9, BIO10, BIO13 a BIO14.

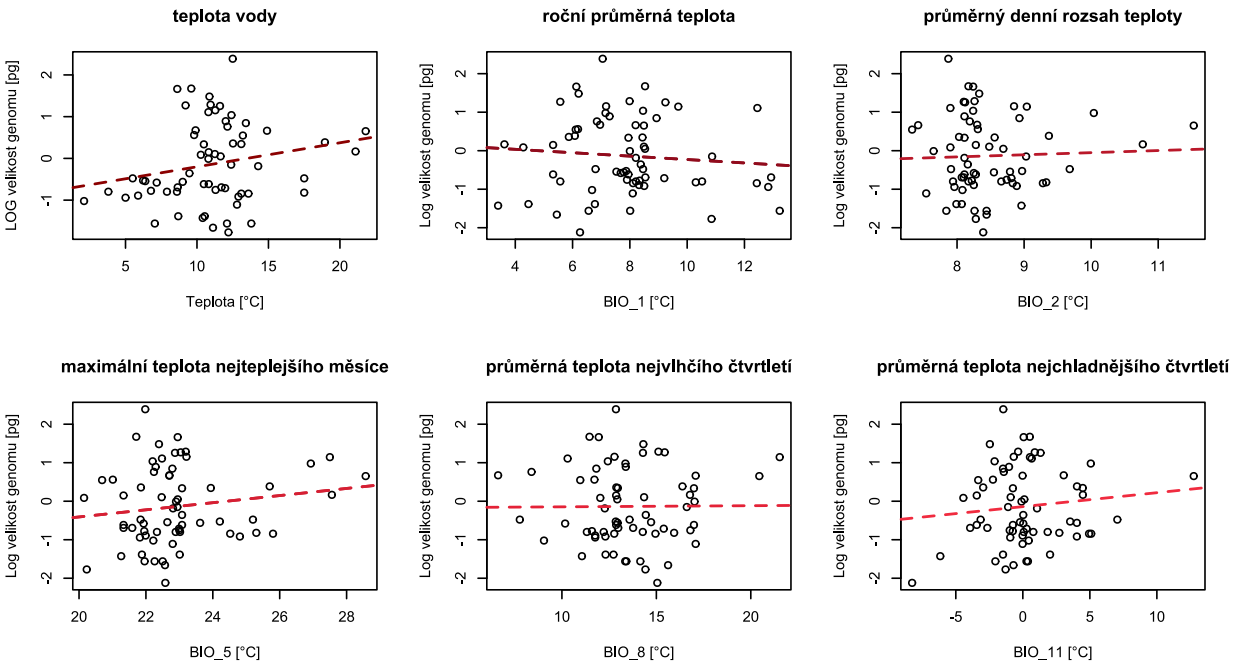


Obrázek č. 23: Sestavená korelační matice pro jednotlivé environmentální proměnné

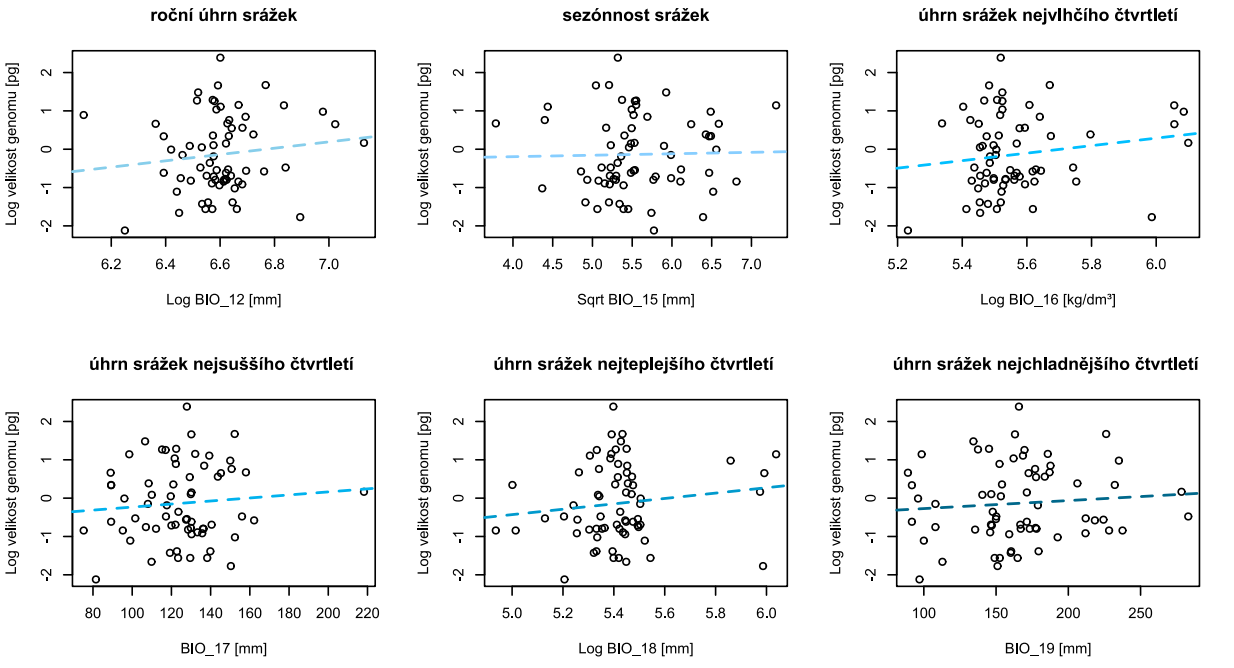
Pro zbývající environmentální proměnné byla provedena lineární a PGLS regrese pro testování souvislosti mezi ekologickými nároky *Mallomonas* a jejich absolutním množstvím jaderné DNA. Pro veškeré půdní (obr. 24), tak bioklimatické (obr. 25 a 26) parametry nebyla pomocí lineární regrese prokázána žádná statisticky signifikantní závislost s množstvím jaderné DNA (obr. 27). Po provedení fylogenetické korekce se výsledky modelu lišily pouze minoritně a ani v tomto případě nebyla prokázána žádná závislost. Výsledky modelů jsou uvedeny v tabulce č. 9.



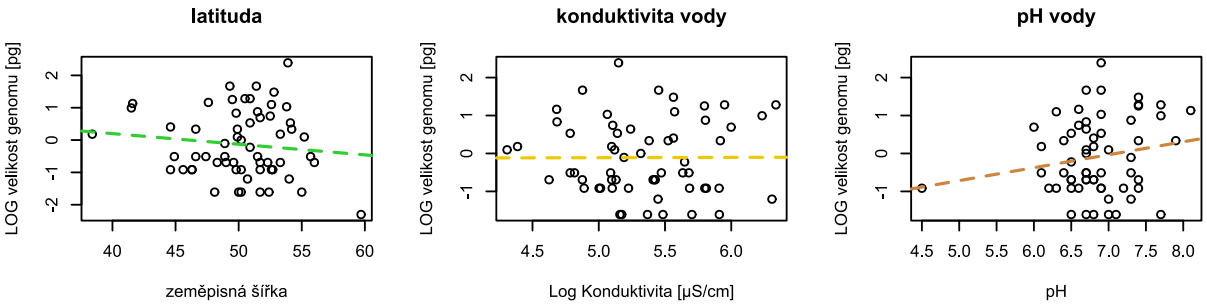
Obrázek č. 24: Výsledky lineární regrese mezi absolutní velikostí genomu a jednotlivými půdními parametry získanými ze SoilGrid databáze



Obrázek č. 25: Výsledky lineární regrese mezi absolutní velikostí genomu a jednotlivými parametry týkajících se teploty získaných z Worldclim databáze. První graf „teplota vody“ je získán z „*chrysophytes.eu*“

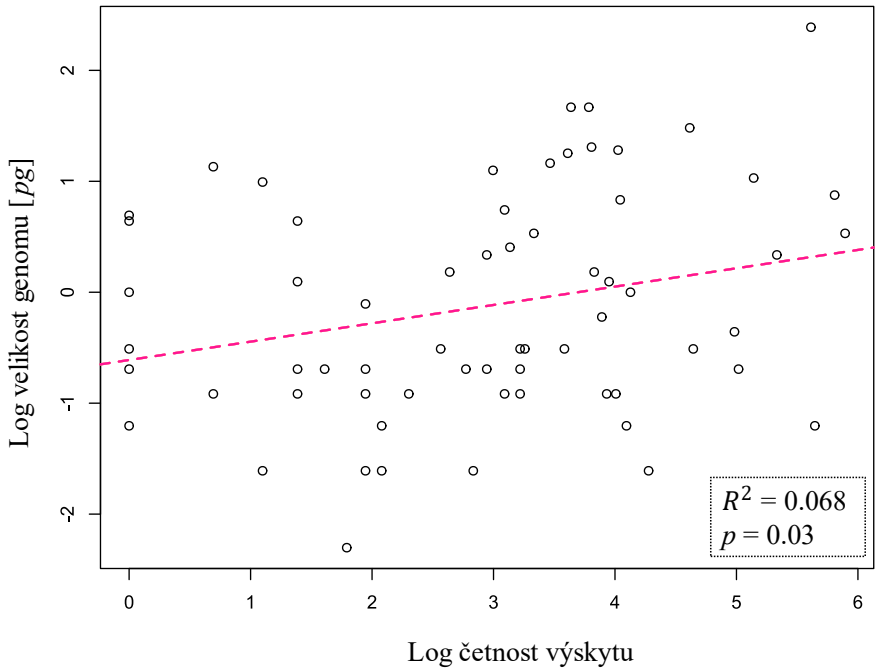


Obrázek č. 26: Výsledky lineární regrese mezi absolutní velikostí genomu a jednotlivými parametry týkajících se srážek získaných z Worldclim databáze



Obrázek č. 27: Výsledky lineární regrese mezi absolutní velikostí genomu a konduktivitou / pH / zeměpisnou šířkou naměřených *in situ* anebo získaných z databáze „*chrysophytes.eu*“

V případě regrese mezi množstvím jaderné DNA a četností výskytu jednotlivých druhů byla pozorována slabá závislost ($P = 0.03$) naznačující vyšší frekvenci výskytu jedinců s větším množstvím jaderné DNA (obr. 28). Mezi druhy s největším počtem lokalit, seřazeno sestupně, patřily – *M. crassisquama* (1.7 pg), *M. acaroides* (2.4 pg), *M. akrokomos* (1.7 pg), *M. caudata* (10.9 pg), *M. alpina* (1.4 pg), *M. punctifera* (2.8 pg), *M. papillosa* (0.5 pg) a mezi druhy s nejmenším počtem lokalit – seřazeno vzestupně – *M. guttata* (2 pg), *M.camerunensis* (0.5 pg), *M. pseudocratis* (3.1 pg), *M. divida* (0.4 pg; příloha č. 4).



Obrázek č. 28: Lineární regrese popisující pozitivní vztah mezi množstvím jaderné DNA a četností výskytu jednotlivých druhů

Tabulka č. 9: Souhrn statistických analýz zaměřených na vysvětlení variability v množství jaderné DNA, případně variability ve velikosti buněk, mezi evolučními liniemi rodu *Mallomonas* pomocí fyziologických a environmentálních prediktorů. Pro účely porovnání byl každý statistický test proveden zvlášť s použitím lineárního regresního modelu a modelu zahrnujícího fylogenetickou korekci = PGLS. Tučně jsou uvedeny signifikantní hodnoty (**α = 0.05**). Hvězdička (*****) označuje regresi provedenou na datasetu 2 – velikosti buněk změřených pro analýzu rychlosti pohybu. VG = velikost genomu, VB = velikost buňky

vysvětlující proměnná	**lineární regresní model**			**PGLS**				
	F-statistika (stupně volnosti)	*P*-hodnota	vysvětlená variabilita [%]	F-statistika (stupně volnosti)	*P*-hodnota	vysvětlená variabilita [%]	lambda (λ)	Konf. interval (95 %)
(log)VB ~ (log)VG	60.69 $_{(1,52)}$	**2.74^{-10}**	53.9	19.54 $_{(1,52)}$	**5.63^{-5}**	27.3	0.87	(0.14 - ?)
***(log)VB ~ (log)VG	90 $_{(1,26)}$	**6.28^{-10}**	77.6	46.52 $_{(1,26)}$	**4.88^{-7}**	65.9	0.0	(? - 0.79)
(log)rychlost pohybu ~ (log)VG	3.78 $_{(1,26)}$	0.06	12.7	1.45 $_{(1,26)}$	0.24	5.7	0.87	(0.39 - ?)
(log)rychlost pohybu ~ (log)VB	5.72 $_{(1,26)}$	**0.02**	18.0	1.07 $_{(1,26)}$	0.31	4.3	0.95	(0.47 - ?)
teplota vody ~ (log)VG	2.94 $_{(1,61)}$	0.09	5.0	0.04 $_{(1,57)}$	0.83	0.1	0.91	(0.67 - 0.98)
pH vody ~ (log)VG	1.17 $_{(1,59)}$	0.28	2.0	3.80 $_{(1,59)}$	0.06	6.1	0.95	(0.77 - ?)
(log)konduktivita vody ~ (log)VG	0.002 $_{(1,58)}$	0.96	0.0	1.21 $_{(1,58)}$	0.28	2.0	0.89	(0.59 - 0.98)
zeměpisná šířka ~ (log)VG	1.06 $_{(1,60)}$	0.31	2.0	0.33 $_{(1,60)}$	0.57	0.5	0.88	(0.60 - 0.98)
objemová hustota (bdod) ~ (log)VG	8.15^{-5} $_{(1,60)}$	0.99	0.0	0.20 $_{(1,60)}$	0.65	0.3	0.87	(0.58 - 0.98)
kationtová výměnná kapacita půdy (cec) ~ (log)VG	0.56 $_{(1,60)}$	0.46	1.0	0.47 $_{(1,60)}$	0.49	0.8	0.90	(0.61 - 0.99)
objemový podíl hrubých fragmentů (cfvo) ~ (log)VG	0.10 $_{(1,60)}$	0.75	0.0	0.80 $_{(1,60)}$	0.38	1.3	0.90	(0.62 - ?)
podíl jílovitých částic (clay) ~ (log)VG	0.16 $_{(1,60)}$	0.69	0.0	0.02 $_{(1,60)}$	0.88	0.0	0.88	(0.59 - 0.98)

(log)obsah dusíku (nitrogen) ~ (log)VG	0.02 $_{(1,60)}$	0.90	0.0	0.10 $_{(1,60)}$	0.75	0.2	0.87	(0.57 - 0.98)
pH půdy (phh2o) ~ (log)VG	0.002 $_{(1,60)}$	0.96	0.0	0.10 $_{(1,60)}$	0.75	0.2	0.87	(0.59 - 0.98)
(log)podíl částic písku (Sandgren) ~ (log)VG	1.32 $_{(1,60)}$	0.26	2.0	1.29 $_{(1,60)}$	0.26	2.1	0.86	(0.55 - 0.97)
podíl jílovitých částic (silt) ~ (log)VG	1.62 $_{(1,60)}$	0.21	3.0	2.06 $_{(1,60)}$	0.16	3.3	0.86	(0.57 - 0.97)
obsah organického uhlíku(soc) ~ (log)VG	$5.30^{-5}{}_{(1,60)}$	0.99	0.0	0.01 $_{(1,60)}$	0.93	0.0	0.88	(0.59 - 0.98)
průměrná roční teplota (bio1) ~ (log)VG	0.54 $_{(1,60)}$	0.46	1.0	0.10 $_{(1,60)}$	0.75	0.2	0.88	(0.59 - 0.98)
průměrný denní rozsah teploty (bio2) ~ (log)VG	0.08 $_{(1,60)}$	0.77	0.0	0.004 $_{(1,60)}$	0.95	0.0	0.88	(0.59 - 0.98)
maximální teplota nejteplejšího měsíce (bio5) ~ (log)VG	1.65 $_{(1,60)}$	0.20	3.0	0.84 $_{(1,60)}$	0.36	1.4	0.88	(0.60 - 0.98)
průměrná teplota nejvlhčího čtvrtletí (bio8) ~ (log)VG	0.08 $_{(1,60)}$	0.78	0.0	0.54 $_{(1,60)}$	0.46	0.9	0.87	(0.60 - 0.97)
průměrná teplota nejchladnějšího čtvrtletí (bio11) ~ (log)VG	0.89 $_{(1,60)}$	0.35	1.0.	1.44 $_{(1,60)}$	0.23	2.4	0.89	(0.62 - 0.98)
(log)roční úhrn srážek (bio12) ~ (log)VG	2.10 $_{(1,60)}$	0.15	3.0	2.04 $_{(1,60)}$	0.16	3.3	0.86	(0.57 - 0.97)
(sqrt)sezónnost srážek (bio15) ~ (log)VG	0.13 $_{(1,60)}$	0.72	0.0	0.10 $_{(1,60)}$	0.75	0.4	0.89	(0.60 - 0.99)
(log)srážky nejvlhčího čtvrtletí (bio16) ~ (log)VG	1.64 $_{(1,60)}$	0.21	3.0	1.56 $_{(1,60)}$	0.22	2.5	0.87	(0.60 - 0.97)
srážky nejsuššího čtvrtletí (bio17) ~ (log)VG	0.36 $_{(1,60)}$	0.55	1.0	0.24 $_{(1,60)}$	0.62	0.4	0.87	(0.58 - 0.98)
(log)srážky nejteplejšího čtvrtletí (bio18) ~ (log)VG	1.39 $_{(1,60)}$	0.24	2.0	0.33 $_{(1,60)}$	0.61	0.4	0.88	(0.59 - 0.98)
srážky nejchladnějšího čtvrtletí (bio19) ~ (log)VG	0.29 $_{(1,60)}$	0.59	0.0	1.41 $_{(1,60)}$	0.24	2.3	0.86	(0.59 - 0.97)
(log)četnost výskytu ~ (log)VG	4.53 $_{(1,62)}$	**0.03**	7.0	-	-	-	-	-

5 Diskuze

5.1 Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie je v posledních letech velmi hojně využívanou metodou pro stanovení absolutní velikosti genomu. U řas byla FCM použita už v 90. letech 20. století (Boucher, et al., 1991; Medlin, et al., 1996; Veldhuis, et al., 1997), avšak teprve nyní začíná nabývat na své popularitě (Čertnerová & Galbraith, 2021). Řasy jako skupina jsou velmi heterogenní a neexistuje pro ně jednotný FCM přístup, což často vyžaduje úpravy metodických protokolů (Čertnerová, 2022). V této diplomové práci se pracovalo s rodem *Mallomonas* podle protokolu Čertnerová & Škaloud (2020). Jako referenční standard byl použit rostlinný materiál i přesto, že byl poměrně nedávno zaveden jako referenční standard fylogeneticky příbuzný rod *Synura sphagnicola* (kmen LO234K-E*;* 2C = 0.4 pg; Olefeld, et al. (2018)). Ovšem Čertnerová, et al. (2022) doporučila vyřazení tohoto rodu ze seznamu zavedených standardů z důvodu později odhaleného haploid-diploidního životního cyklu. Příprava vzorku a standardu pro FCM analýzu vyžadovala trochu odlišný postup pro izolaci jader. Použita byla forma tzv. (pseudo-)interní standardizace, která je u řas často využívaná i v dalších studiích (např. Čertnerová & Galbraith (2021); Olefeld, et al. (2018)). Dle Čertnerová & Galbraith (2021) je ale častým problémem nejednotná terminologie popisující získané množství DNA, zejména u protistních organismů. Ty byly dlouhou dobu považovány za haploidní jedince, a tak se myslelo, že naměřené množství DNA odpovídá 1C hodnotě. Dnes se ovšem ví, že protista nebudou v tomto ohledu tak jednoduchá, jak se doposud zdálo, a budou dosahovat i vyšších úrovní ploidie (např. Majda, et al. (2021); Nicholls (1980); Schoenfelder, et al. (2015)). Tento fakt může vést v odlišných studiích k rozdílným získaným hodnotám absolutního množství DNA pro stejný druh. Proto je potřeba při porovnávání hodnot brát v potaz, jak autoři s terminologií pracují.

V průběhu diplomové práce nastávaly u FCM analýz především problémy spojené s nastavením cytometru, dosažením požadované CV hodnoty a kvalitou analýz. Na bočním rozptylu světla byl u některých kmenů (např. CZ12D, CZ32J, CZ33J, NL06A, NO01F) pozorován „šmír“. Tento artefakt se vyskytuje např. u organismů produkujících sekundární metabolity – fenolické látky, taniny (Čertnerová & Galbraith, 2021; Loureiro, et al., 2023). Vyšší obsah fenolických látek byl detekován u řas rodu *Zygnema* (Pichrtová, Remias, et al., 2013) anebo *Trentepohlia* (Kharkongor, et al., 2022) ve spojitosti se stresem z vysychání a

ozáření. Ovšem o přítomnosti sekundárních metabolitů u rodu *Mallomonas* se toho ví velmi málo. Na tvorbu „šmíru“ by tak mohlo mít vliv stáří kultury, kdy v pozdějších fázích dochází k vyšší akumulaci zásobních látek, anebo je možné, že byl způsoben zbytkem rozpadlých buněk. Tento problém byl ale ve většině případů odstraněn pomocí ohraničení píků (tzv. gating) při následném zpracování dat.

5.2 Možný původ detekovaných píků s odlišnou intenzitou fluorescence

V některých případech se při FCM analýze vzorku *Mallomonas* vyskytovaly až čtyři píky. Kromě píku G_1 fáze vzorku a referenčního standardu se objevovaly i G_2 fáze vzorku/standardu. U 5.5 % *Mallomonas* a 8 % *Synura* (Čertnerová et. al, in prep.) se objevovaly ale i další píky, které ale neodpovídaly jádrům v G_2 fázi buněčného cyklu, protože neměly násobně vyšší intenzitu fluorescence jader G_1 fáze vzorku. V první řadě bylo potřeba vyloučit, zdali se nejedná o případnou kontaminaci jiným druhem, který časem v kultuře narostl. To vyloučil experiment s re-izolovanými buňkami, kde se píky s odlišnou intenzitou fluorescence znovu objevily u kultury druhu *Mallomonas alpina* (CZ23D) a dvou kmenů *Synura petersenii* – W81, E51 (Čertnerová et al., in prep.) narostlých z jediné buňky.

Množství DNA dodatečného píku se od hlavního lišilo pouze o pár procent, což by mohlo naznačovat přítomnost pohlavního chromozomu (Temsch, et al., 2022). Například u CRBC se liší 1C hodnota pro samce a samičky o 2.7 % (Nakamura, et al., 1990). U zelené řasy *Ostreococcus tauri* byl také detekován pohlavní chromozom, který se ale lišil od ostatních chromozomů vyšším zastoupením AT párů bází (Derelle, et al., 2006; Palenik, et al., 2007). Právě oblasti s vyšším zastoupením AT párů bází jsou dávány do souvislosti s mating-type geny. To bylo pozorováno jak u zástupců hub (Haber, 2012), tak u některých protist, jako je například *Tetrahymena* (Yan, et al., 2021). Avšak v našem případě bylo pro kmen CZ23D zastoupení AT ku GC párů bází téměř identické – 44.8 %, což spíše neukazuje na přítomnost pohlavního chromosomu.

U mnohobuněčných organismů je diferenciace buněk v průběhu embryogeneze řízena i rostoucím počtem somatických buněk. Při dosažení určitého počtu dojde k signalizaci a spouštění drah regulujících změnu v obsahu jaderné DNA – programovaná eliminace DNA (Drotos, et al., 2022). Otázkou je, zdali by se podobná regulace nemohla vyskytovat i u mikroskopických organismů. Nemohla by rostoucí populační hustota v kultuře figurovat jako determinační faktor ke spouštění drah vedoucích ke změně množství jaderné DNA? Jenže dodatečný pík *Mallomonas* se při experimentu objevil ve variantě, kam se přidávalo čerstvé médium, a navíc píky měly spíše více DNA, než aby docházelo k její eliminaci. Zdá se tedy, že

prostorové omezení v kultuře z důvodu vyšší koncentrace buněk, nebude problémem stojícím za výskytem dodatečného píku.

Dalším možným vysvětlením je, že došlo k částečné endoreduplikaci, tedy znásobení jen určité části genomu. Časté případy částečné endoreduplikace byly pozorovány u orchidejí (Trávníček, et al., 2015), kde podobně jako samotná endoreduplikace (zdvojení celé jaderné DNA) doprovází diferenciaci rostlinných orgánů jako jsou plody, endosperm, dusík fixující kořeny, anebo rezistenci k patogenům či herbivorii (Barow & Meister, 2003; Scholes & Paige, 2015). Jenže tělo *Mallomonas* se skládá z jedné buňky. Je tedy velice zvláštní, aby k této buněčné diferenciaci se změnami v množství jaderné DNA, docházelo právě u jednobuněčných organismů. Protože částečná endoreduplikace umožnuje znásobení kódující části DNA, aniž by docházelo k namnožení nekódující DNA, je tedy možné, že se jedná o způsob, jak zůstávat pod limitující horní hranicí velikosti genomu (Hidalgo, et al., 2017; Malerba, et al., 2020; Trávníček, et al., 2015). Zdvojení celého genomu je totiž náročné z hlediska energie a dostupnosti limitujících prvků (dusík, fosfor). Zároveň by tímto způsobem mohla být regulována velikost buněk, protože buňky, které prodělaly částečnou endoreduplikaci, mají méně DNA než ty s klasickou endoreduplikací a jsou proto i menší. Nicméně data o výskytu částečné endoreduplikace u jednobuněčných organismů nebyly doposud nikdy publikovány. Částečné endoreduplikace není zcela probádána ani u vyšších rostlin a živočichů a mechanismy vzniku tohoto fenoménu jsou stále velmi nejasné (Hřibová, et al., 2016).

Pro budoucí studium těchto dodatečných píků by bylo potřeba provést znovu experiment s re-izolovanými buňkami a zařadit do něj více kmenů rodu *Synura* a *Mallomonas*. Dodatečný pík se totiž neobjevoval vždy, ale jen v určité fázi růstu kultury, a je tedy možné, že by se píky mohly objevovat ve více kulturách, než bylo doposud pozorováno. Dále by bylo na místě po detekci píku využít průtokový cytometr na roztřídění jader („*sorter*“) a jádra s odlišnou intenzitou fluorescence rozdělit a následně osekvenovat. Prozatím ale u rodů *Mallomonas* a *Synura* není dostupný ani referenční genom, na základě kterého by bylo možné obě sorty jader jednoduše namapovat a navzájem porovnat.

5.3 Srovnání množství jaderné DNA u modelového rodu *Mallomonas*

Výraznou variabilitu v obsahu jaderné DNA se podařilo poměrně nedávno detekovat i v rámci celé třídy Chrysophyceae, a to až 300násobnou (Čertnerová & Škaloud, 2020; Majda, et al., 2021; Olefeld, et al., 2018). Množství jaderné DNA rodu *Mallomonas* bylo poprvé změřeno ve studii Olefeld, et al. (2018), která zde zahrnula 5 druhů tohoto rodu. Tato práce rozšířila měření o dalších 59 druhů a poskytla tak informaci o množství jaderné DNA pro

zhruba 25 % celkové diverzity rodu *Mallomonas* (Guiry, 2024). U samotného rodu *Mallomonas* tak byla zaznamenána až 100násobná variabilita v obsahu jaderné DNA. Nejvyšší obsah DNA – 11.4 pg byl stanoven pro druh *M. caudata*. Tento výsledek je v souladu se studií Olefeld, et al. (2018), která také uvádí největší velikost pro tento druh – 24.84 pg. Dvojnásobný rozdíl v hodnotách by mohl být způsoben například měřením odlišných fází životního cyklu – haploidní vs. diploidní. Rod *Mallomonas* je zřejmě rodem s vůbec největším naměřeným genomem v rámci třídy Chrysophyceae. Ve spodní hranici mu konkuruje pouze heterotrofní rod *Segregatospumella* – 0.09 pg (Olefeld, et al., 2018). Avšak o přesnosti naměřené hodnoty by se dalo spekulovat, protože jako referenční standard byl použit právě druh *Synura sphagnicola* s nejasnou fází životního cyklu (Čertnerová, et al., 2022). Ve stejné studii naměřili u rodu *Mallomonas* nejmenší množství jaderné DNA pro druh *M. kalinae* – 0.59 pg. Podobnou hodnotu (0.5 pg) pro tento druh se podařilo naměřit i v této diplomové práci. Nicméně absolutně nejmenší množství jaderné DNA bylo zaznamenáno u druhu *M. scrobiculata* – 0.120 pg, což může představovat potenciální spodní hranici velikosti genomu tohoto rodu.

Jelikož byl výběr kmenů pro analýzu množství jaderné DNA náhodný, mohl být odražen přirozený výskyt velikostí genomu rodu *Mallomonas*. Průměrné množství jaderné DNA se pohybovalo okolo 0.75 pg a pod velikostí 2.0 pg se vyskytovalo přes 80 % případů *Mallomonas*. To potvrzuje teorii dle Hidalgo, et al. (2017), která naznačuje, že výskyt malých genomů je častější, něž těch velkých.

5.3.1 Vnitrodruhová variabilita v množství DNA u rodu *Mallomonas* a polyploidizace jako možný významný mechanismus jejího vzniku

Na základě rekonstrukce evoluce množství jaderné DNA se podařilo prokázat, že některé druhy rodu *Mallomonas,* jsou v množství jaderné DNA velmi konzervativní. U kmenů druhu *M. munda* činil rozdíl v naměřeném množství DNA pouhých 0.22 % a u *M. costata* necelá 4 %. Totožné množství jaderné DNA měly i kmeny druhu *M. actilonoma* var. *maramuresensis* s identickou sekvencí ITS rDNA, SSU rDNA a *rbc*L (CZ104D, CZ104E). V tomto případě se nejspíš jednalo o klonální jedince. Podezřelá byla pak až 20násobná variabilita v rámci druhu *M. matvienkoae*. Původ této variability je nejasný a nedá se tak stoprocentně zamítnout případná kontaminace. Tento druh je tak jedním z příkladů, který byl vyřazen z datasetu pro námi sledované regrese.

Dále se pomocí rekonstrukce fylogeneze podařily odhalit i vzájemné vztahy mezi jednotlivými liniemi. U druhu *M. guttata*, který byl považován jako jeden ze zástupců s vnitrodruhovou variabilitou, se po vynesení množství DNA na fylogenetický strom ukázalo,

že se rozděluje do dvou nezávislých linií. To samé platí i pro druh *M. insignis* anebo *M. lelymene*, kde se kmen IT02 odděluje od ostatních zástupců tohoto druhu. U těchto linií je tedy možné, že rozdíl v množství jaderné DNA značí neprobíhající genový tok mezi populacemi a počáteční vznik nových druhů.

V rámci vnitrodruhové variability v množství jaderné DNA je také mnoho případů, ve kterých se kmeny jednoho druhu liší jejím násobným množstvím. Například u druhu *M. crassisquama* se vyskytují kmeny s velikostí 1.6 pg a jiné s velikostí 0.8 pg, což je téměř přesný dvojnásobný rozdíl naznačující případný proces polyploidizace. Tyto kmeny byly definované identickou sekvencí ITS rDNA, SSU rDNA i rbcL, tudíž u nich prozatím nedošlo k žádné výrazné molekulární diferenciaci. Dokonce trojnásobný rozdíl v obsahu DNA byl pozorován u druhu *M. adamas* (z 0.3 pg na 0.9 pg). Zajímavá je také změna mezi *M. kalinae* (0.5 pg), *M. camerunensis* (0.5 pg) a *M. rasilis* (1.5 pg). Zde také došlo k trojnásobnému navýšení množství DNA. Na základě těchto pozorování se zdá, že polyploidizace bude zřejmě velmi častou cestou nárůstu množství jaderné DNA. Ovšem je potřeba brát na vědomí, že ne každá násobná změna v množství jaderné DNA, je důsledkem procesu polyploidizace. Dvojnásobné rozdíly v hodnotách mohou být způsobeny změřením kmenů v různých stádiích haploid-diploidního životního cyklu. Avšak případné vícenásobné rozdíly v množství DNA se změnou životního cyklu vysvětlit nedají.

Zvláštně vysokou absolutní velikost genomu má druh *M. schwemmlei* (1.1 pg), který se na fylogenetickém stromě nachází mezi druhy s malým obsahem DNA – *M. prora* (0.2 pg), *M. pumilio dispersa* (0.2 pg) a *M. silvicola* (0.4 pg). Je však nutné zmínit, že podpora oddělení *M. schwemmlei* je relativně nízká (42). Možná se nejdříve oddělila *M. schwemmlei* a u zbylých taxonů došlo k následné razantní miniaturizaci genomu, s následnou polyploidizací u *M. silvicola* z 0.2 pg na 0.4 pg. Tento scénář by naznačoval schopnost *Mallomonas* provádět značné redukce genomu.

Data z této diplomové práce nejsou prvním podezřením na výskyt polyploidizace u zástupců třídy Chrysophyceae. Již dříve byly popsány tetraploidní zástupci u druhů *Poteriospumella lacustris* a *Chlorochromonas danica* (Majda, et al., 2021) nebo u druhů *Synura glabra* a *S. heteropora* (Čertnerová et al. 2022). Zmíněné případy polyploidie byly popsány na základě sekvenačních dat anebo srovnáním množství naměřené jaderné DNA, avšak nebyly potvrzeny počítáním chromozomů. Bohužel se zdá, že zástupci třídy Chrysophyceae, mají velmi malé chromosomy jejichž vizualizace a počítání je značně komplikované (McIntyre, 2012). Proto ani v této diplomové práci nebyla vizualizace a počítání chromozomů plánována.

Obecně existuje pouze malý počet studií zabývajících se výskytem polyploidie u řas (Suda, 2009). Mimo zmíněné příklady chrysomonád existuje pouze několik výjimek, kdy se podařilo polyploidii zaznamenat. To platí např. pro rod *Micrasterias* (Mazalová, et al., 2011; Poulíčková, et al., 2014) anebo rod *Spirogyra* (Wang, et al., 1986).

5.4 Vztah velikosti buňky a množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas*

Velikost buněk je jedním z aspektů, který je mnohdy dáván do souvislosti s velikostí genomu (Cavalier-Smith, 1982). Pro účely této diplomové práce byly objemy buněk vypočítány jako objem tělesa tvaru obecného elipsoidu podobně jako ve studii Olefeld, et al. (2018). Pro ověření, zdali je možné tento vzorec použít, byly naše výsledky porovnány s naměřenými objemy v knize „*The Biology of Mallomonas*“ od Petera Sivera (1991), který pro svůj výpočet použil rotační geometrii. Ve většině případů se výsledky lišily jen marginálně. Například pro druh *M. lychenensis* se zjištěné hodnoty lišily o necelá 3 %. Avšak našly se i druhy s více odlišnými hodnotami. Rozdíly ve velikosti buněk nastávaly v případech, kdy buňky tvarově neodpovídaly obecnému elipsoidu. Jednalo se tak například o druh *M. caudata*, který je na posteriorní straně zúžený a tvarově připomíná spíše kapku. Dle Sivera dosahovala velikost buňky 12 228 μm^3 a po našem přepočtu 13 957 μm^3, což je o 14 % více. Tento fakt by mohl vést k nepřesnostem výsledné regrese mezi množstvím jaderné DNA a velikostí buňky. Ale i přes zmíněné nedostatky byla u 54 druhů rodu *Mallomonas* prokázána silná signifikantní závislost mezi těmito proměnnými. Tento výsledek ještě potvrdila závislost mezi velikostí buňky a množstvím jaderné DNA u 28 kmenů vybraných na analýzu rychlosti pohybu. V předchozím případě se pracovalo s průměrnými hodnotami množství jaderné DNA a převzatou velikostí buňky, zatímco v tomto případě bylo změřeno množství jaderné DNA a velikost buňky přímo pro daný kmen. Na základě lineárního regresního modelu se tak podařilo vysvětlit přes 76 % variability. Výsledky regrese byly porovnány se studií Olefeld, et al. (2018). Autoři se domnívají, že velikost buňky, a s tím spojený obsah DNA, úzce souvisí s typem výživy organismu. Pro heterotrofní chrysomonády (*Spumella*, *Epipyxis*, *Poterioochromonas*) vyšel koeficient variace kolem 56 %, zatímco pro mixotrofní chrysomonády (*Dinobryon*) nebyla nalezena žádná závislost. Téměř 100% koeficient variace byl pozorován u fotoautotrofních organismů, kam byl kromě rodu *Synura* zahrnut i rod *Mallomonas*. U rodu *Mallomonas* se ale poslední dobou spekuluje, zdali se také nejedná o mixotrofní organismus, a tak je možné, že by i u mixotrofních jedinců mohla být detekována závislost mezi velikostí buňky a množstvím jaderné DNA. Ovšem ve studii autoři sami uvádí, že jejich výsledky by mohly být ovlivněny nedostatečným počtem zahrnutých vzorků.

Podobný vztah velikosti buňky a velikosti genomu byl pozorován i u příbuzného rodu *Synura,* kde bylo vysvětleno pouhých 29 % variability (Čertnerová et al., in prep). Nižší koeficient variability by mohl být zapříčiněn koloniálním způsobem života, zatímco *Mallomonas* je solitérní rod. Zajímavý aspekt z hlediska porovnání rodu *Synura* a *Mallomonas* je samotná variabilita ve velikosti buňky. U rodu *Synura* bylo zjištěno, že velikost buňky je mnohem konzervativnější nežli velikost genomu. U rodu *Mallomonas* byla pozorována naopak mnohem větší variabilita ve velikosti buňky nežli v množství jaderné DNA. To by se dalo opět vysvětlit solitérním způsobem života, protože změna velikosti buňky v rámci kolonie, by mohla být regulovanější, nežli u samostatně žijících jedinců (Amodeo, et al., 2016).

Kovariance mezi velikostí genomu a velikostí buňky byla prokázána i u dalších skupin řas. Ve studii Connolly, et al. (2008) zjistili, že je velikost genomu pozitivně spjata s objemem buněk u některých druhů rozsivek (Bacillariophyceae; R^2=0.68). U skupiny Dinophyceae byla tato závislost sledována u obrněnky rodu *Symbiodinium*, u kterého bylo vysvětleno až 84 % variability (LaJeunesse, et al., 2005). Pozitivní vztah byl nalezen i u zelené řasy *Dunaliella tertiolecta* (Malerba, et al., 2020). Tyto příklady tak společně s našimi výsledky potvrzují nukleoskeletární teorii podle Cavalier-Smith (1978), která naznačuje pozitivní vztah mezi velikostí genomu a velikostí buňky.

5.5 Vztah rychlosti pohybu a množství jaderné DNA u rodu *Mallomonas*

Existuje mnoho fyziologických aspektů organismu, které mohou být ovlivněné velikostí genomu anebo velikostí buňky. Rychlost pohybu by mohla být jedním z nich, s předpokladem, že se malé buňky budou pohybovat rychleji nežli ty velké (Cox, et al., 1984; Togashi, et al., 2004). Měření rychlosti u jednobuněčných řas je unikátní záležitostí. V této diplomové práci se podařilo u modelového rodu *Mallomonas* prokázat slabou negativní závislost mezi velikostí buňky a rychlostí pohybu. Tento výsledek je v souladu se studií Liu, et al. (2020), kteří taktéž stanovili největší rychlost (až 104 um/s) pro nejmenší buňku, ale na gametách modelového organismu *Chlamydomonas reinthardtii* (Chlorophyceae). V jedné z mála studií byl ovšem naměřen rychlejší pohyb pro *Chlamydomonas* s většími buňkami, čímž byl vyloučen běžně předpokládaný negativní vztah mezi velikostí buňky a rychlostí pohybu (Seed, et al., 2018). *Chlamydomonas* je doposud jediným zástupcem ze skupin řas, s kterým by se naše naměřené hodnoty daly porovnávat. Je ale potřeba brát na vědomí, že tyto rody patří do jiných superskupin, mají jiné uspořádání bičíků a tím pádem i mechanismus pohybu (Brown & Sorhannus, 2010; Buchheim, et al., 1990; Inouye, 1993). Rod *Mallomonas* nemá na rozdíl od *Chlamydomonas* buněčnou stěnu a dokáže tak rychle reagovat na měnící se podmínky prostředí,

a to například právě změnou velikosti buňky. Pod mikroskopem byly buňky přímo vystaveny vysoké intenzitě světla, což pro *Mallomonas* představovalo značný stres. V reakci na stres docházelo k akumulaci zásobních látek, což potencionálně mohlo vést k jejich zvýšené hmotnosti. To platí např. pro kmen NL30W – *M. parvula*, u kterého by se vzhledem k malému množství jaderné DNA a velikosti buňky očekával rychlý pohyb, avšak výsledek byl opačný. Řadil se mezi zástupce vůbec s nejpomalejším pohybem.

Rychlost pohybu by mohla být ovlivněna i mírou silicifikace šupin jednotlivých druhů. Například druh *M. adamas* má na sobě těžké tlustostěnné šupiny s vysokým obsahem křemíku (Lavau, et al., 1994), což se zřejmě projevilo i na jeho pomalejší rychlosti, přestože se jedná o relativně malou buňku. Naopak druh *M. divida* má velmi „lehké“ šupiny (Němcová, et al., 2013) obsahuje malé množství DNA a dorůstá malých velikostí. U tohoto druhu by se naopak očekávalo, že bude dosahovat těch nejrychlejších rychlostí. Avšak výsledek byl srovnatelný s rychlostmi těch nejpomalejších buněk. Přítomnost samotných ostnů na šupinách by také mohla hrát roli v rychlosti pohybu *Mallomonas*. Například druh *M. caudata* má dlouhé ostny (Siver, 1991), na které se nachytávaly nečistoty z média (zbytky dekoktu, rozpadlých buněk), což by mohlo buňkám znesnadňovat pohyb. Výsledná rychlost *M. caudata* byla porovnána s druhem *M. insignis,* který obsahuje o polovinu méně DNA, má menší buňku, méně ostnů (Penard, 1919) a tudíž by měl být rychlejším jedincem. Avšak výsledky ukazují, že oba tyto druhy mají podobnou rychlost pohybu. Zdá se tedy, že rychlost pohybu nelze přisuzovat pouze šupinám, zároveň není možné prokázat, že se jedná o zcela zanedbatelný faktor.

Dalším fyziologickým aspektem, který nebyl v této diplomové práci zahrnut, je rychlost růstu. Například Čertnerová & Škaloud (2020) prokázali negativní vztah mezi množstvím jaderné DNA a rychlostí růstu u příbuzného rodu *Synura*, a tak je možné, že tento podobný trend by mohl následovat i námi sledovaný rod *Mallomonas*.

5.6 Environmentální nároky a geografické rozšíření ve vztahu s obsahem DNA

Nejvíce studií zabývajících se vztahem mezi velikostí genomu a ekologickými nároky bylo provedeno na rostlinách. U mikroskopických organismů existuje pouze zlomek studií, které by se touto problematikou zabývaly (Cavalier-Smith, 1980; Čertnerová & Škaloud, 2020; Lukeš, 2023; Taylor, 1978). Mikroskopické organismy mají krátkou generační dobu, která jim umožnuje rychle reagovat na měnící se podmínky prostředí (Foissner, 2007). Zároveň jsou jednobuněčné a nemohou akumulovat DNA na úrovni tkání/orgánů anebo kompenzovat velikost těla větším počtem buněk tak, jako to dělají někteří živočichové (Jeffery, et al., 2016).

Právě proto by se mohlo jednat o zajímavou modelovou skupinu pro hledání přímých vztahů mezi obsahem jaderné DNA a ekologií organismů.

U krytosemenných rostlin byl pozorován trend v distribuci jedinců s vyšším obsahem jaderné DNA se zvyšující se zeměpisnou šířkou (Bureš, et al., 2024). Pro námi měřené kmeny rodu *Mallomonas* byla taktéž vytvořena mapa s geografickým rozšířením kmenů s odlišným obsahem jaderné DNA. Zdá se, že na velikost genomu u rodu *Mallomonas* nemá geografické rozšíření žádný vliv. Téhož výsledku dospěla i Čertnerová & Škaloud (2020) u studovaného rodu *Synura.*

Rozdělení organismů podle konceptu r/K strategie je poměrně známým aspektem u mnohobuněčných organismů (MacArthur, et al., 1967). Organismy s r-strategií jsou většinou doprovázené malou velikostí buňky/genomu, rychlým růstem a rychlou generační dobou. S K-strategií se naopak pojí znaky jako velká velikost těla/genomu, delší životnost a pomalá reprodukce (Cavalier-Smith, 2005). Konečná (2022) se například zabývala konceptem r/K strategie u lišejníků, kde pozorovala u K-strategických lišejníků s velkými sporami přítomnost větších genomů. Pohled na protistní organismy z hlediska r/K strategie navrhl již Cavalier-Smith (1980), který předpokládal, že organismy budou reagovat na selekci vůči r/K strategii změnou velikostí buňky a rychlostí růstu. Otázkou je, zdali by se variabilita v obsahu jaderné DNA mohla promítnout i na ekogeografickém rozšíření kmenů *Mallomonas*. Na základě nalezených druhově specifických šupin a námi provedené lineární regrese (obr. 28) by mohlo platit, že se zástupci rodu *Mallomonas* s větším obsahem DNA nachází na více lokalitách, a tudíž by mohly být lepšími kolonizátory. Avšak podle scénáře Cavalier-Smith (1980) by měly být druhy s větším množstvím DNA horšími kolonizátory, případně by jim na stávajících lokalitách měly konkurovat kmeny s malým obsahem DNA, jelikož se dokáží rychleji dělit. Protože informace o četnosti výskytu pocházely z nálezů šupin, je možné, že počet nalezených druhů mohl být ovlivněn časem odběru. Rod *Mallomonas* je ve svém výskytu velmi dynamický a dokáže své druhové zastoupení měnit během několika dnů. Pro druhy vyskytujících se v průběhu celého roku (*M. caudata*, *M. crassisquama;* Siver (1991)) je větší pravděpodobnost nálezu šupin nežli pro druhy, co mají jen jeden sezonní pík anebo druhy, které jsou vzácné (*M. guttata*, *M. tirolensis*; Pichrtová, Němcová, et al. (2013)).

Použití dat z bioklimatických či půdních databází pro ekologické korelace je poměrně hojně využívaným přístupem u mnohobuněčných organismů (Jeschke, et al., 2008). V této diplomové práci se nepodařilo ze získaných dat prokázat signifikantní závislost mezi ekologickými nároky a množstvím jaderné DNA u zástupců rodu *Mallomonas*. Avšak pro

příbuzný rod *Synura* byl tímto přístupem zjištěn potenciální vliv úhrnu srážek na výskyt jedinců s odlišnými velikostmi genomu (Čertnerová et. al, in prep.). Slabou korelaci s úhrnem srážek prokázal i Lukeš (2023) u rodu *Zygnema*. Vyšší procento srážek je doprovázeno splavem živin z okolního prostředí (Baek, et al., 2009). V prostředí s vyšší dostupností živin by měly prosperovat především organismy s velkými genomy, protože je DNA tvořena velkým množstvím dusíku a fosforu (Šmarda, et al., 2013). Avšak obě práce jsou v rozporu s tímto tvrzením, kdy se v prostředí s vysokým úhrnem srážek nacházely organismy s malou velikostí genomu. U rodu *Synura* byla navíc prokázána závislost mezi vyššími koncentracemi dusíku a malým množstvím DNA (Čertnerová et. al, in prep.). Rod *Mallomonas* nevykazoval žádnou spojitost s úhrnem srážek ani dostupností živin. Na rozdíl od rodu *Synura* se ale nejspíše jedná o mixotrofní organismus. Podle Jansson, et al. (1996) se zdá, že mixotrofní organismy budou kromě dostupností dusíku limitovány i dostupností fosforu. Avšak SoilGrid databáze nám poskytla informaci pouze o množství dusíku. Je tedy možné, že pro velikost genomu rodu *Mallomonas* existuje závislost s dostupností živin, avšak ne s dusíkem samotným.

Lineární regrese znázorňující vztah mezi množstvím jaderné DNA a teplotou vody u rodu *Mallomonas* neprokázala signifikantní závislost. Z grafu (obr. 25) je patrné, že v teplotě vody okolo 12 °C, která je pro většinu zástupců rodu *Mallomonas* ideální, se vyskytovaly buňky jak s velkými, tak malými genomy. Avšak při bližším pohledu je patrné, že v chladnějších vodách převládaly druhy s menším množstvím jaderné DNA, a v teplejších s větším množstvím DNA, což je naopak, než bychom očekávali. Podle teplotního pravidla stanoveného dle Atkinson, et al. (2003) by se měla velikost protist s rostoucí teplotou lineárně zmenšovat. To je také v souladu s Hessen, et al. (2013), který předpovídá výskyt větších jedinců s větším množstvím DNA v chladnějším prostředí. Vztah mezi množstvím DNA a teplotou u rodu *Mallomonas* tak zůstává stále nejasný.

Zdá se tedy, že pro lepší pochopení vztahu mezi množstvím jaderné DNA a ekologickými nároky mikroorganismů, by bylo vhodné provést experimenty v kontrolovaných laboratorních podmínkách, například s upravenými koncentracemi živin či teplotou. Je totiž možné, že rod *Mallomonas,* dokáže velmi rychle měnit své množství jaderné DNA, čemuž nasvědčuje i detekovaná variabilita ve velikosti genomu. Ke korelacím s environmentálními proměnnými tak může docházet pouze na mikroškále, nikoliv v tak širokém globálním měřítku, jaké bylo zvoleno pro tuto diplomovou práci.

6 Závěr

Cílem diplomové práce bylo stanovit absolutní množství jaderné DNA pro co nejvíce kmenů rodu *Mallomonas*. Pomocí metody průtokové cytometrie se podařilo odhadnout množství jaderné DNA pro celkových 165 kmenů náležících k 64 druhům, čímž byla odhalena diverzita v množství jaderné DNA pro téměř 1/4 celosvětově uznávané diverzity tohoto rodu. Na základě získaných dat byla zjištěna až 100násobná variabilita v množství jaderné DNA – 0.120 pg – 11.4 pg. V této práci se dále podařilo detekovat vysokou vnitrodruhovou variabilitu v množství jaderné DNA, a to konkrétně u 14 druhů. Násobné rozdíly v obsahu DNA mezi příbuznými liniemi nasvědčují o výskytu procesu polyploidizace a diploidizace, které se zdají být hlavními mechanismy zapříčiňujícími masivní změny v obsahu jaderné DNA. Z rozložení velikostí genomů na rekonstruovaném fylogenetickém stromě je patrné, že fylogeneze má silný vliv na množství DNA. Zatímco u některých linií docházelo k zachování původního obsahu DNA, u jiných se naopak objevily změny v nárůstu či jejím zmenšením.

Jako jeden z fyziologických aspektů, testovaných v této diplomové práci, byla velikost buňky. Stejně jako u některých zástupců protist (obrněnky, rozsivky) se i v případě *Mallomonas* podařilo prokázat signifikantní závislost mezi množstvím jaderné DNA a velikostí buňky. Pouze slabá závislost byla nalezena mezi velikostí buňky a rychlostí pohybu. Avšak v oblasti vztahu mezi množstvím jaderné DNA a rychlostí pohybu nebyla detekována žádná závislost. V této práci bylo dále testováno, zdali mají druhy s rozdílným množstvím jaderné DNA odlišné ekologické nároky. Zajímavá pozitivní závislost byla nalezena ve vztahu s četností výskytu, naznačující, že organismy s vyšším množstvím jaderné DNA, jsou schopné obývat více lokalit, a zdá se, že by tak mohly být lepšími kolonizátory.

Při porovnání výsledků se studiemi zabývajícími se množstvím jaderné DNA u koloniálně žijícího příbuzného rodu *Synura* se podařilo nalézt značné rozdíly, a to jak v samotném rozmezí obsahu DNA, tak ve vztahu s velikostí buňky a ekologickými nároky. Navíc se zdá, že množství jaderné DNA u rodu *Synura,* nebude ovlivněno fylogenetickou příbuzností v takové míře, jako u námi sledovaného rodu *Mallomonas*.

Tato diplomová práce je zároveň první prací spekulující o možném výskytu částečné endoreduplikace u jednobuněčných organismů a poskytuje tak vhodný model pro budoucí studium tohoto fenoménu v rámci protist.

7 Zdroje

Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology, 8*(2), 135-141.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow Cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology, 37*(2), 163-176.

Amodeo, A. A., & Skotheim, J. M. (2016). Cell-Size control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8*(4).

Amparo, L., & Silva Francisco, J. (2013). The size of the genome and the complexity of living beings. *Metode, 32*.

Andersen, R. A., & Mulkey, T. J. (1983). The occurrence of chlorophylls c1 and c2 In the Chlorophyceae. *Journal of Phycology, 19*(3), 289-294.

Arimoto, A., Nishitsuji, K., Higa, Y., Arakaki, N., Hisata, K., Shinzato, C., et al. (2019). A siphonous macroalgal genome suggests convergent functions of homeobox genes in algae and land plants. *DNA Research, 26*(2), 183-192.

Asmund, B., & Kristiansen, J. (1986). *The genus' Mallomonas' ('Chrysophyceae'): A taxonomic survey based on the ultrastruc- ture of silica scales and bristle* (Vol. 85): – Opera Bot.

Atkinson, D., Ciotti, B. J., & Montagnes, D. J. S. (2003). Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% C− 1. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270*(1533), 2605-2611.

Avaria-Llautureo, J., Hernández, C. E., Rodríguez-Serrano, E., & Venditti, C. (2019). The decoupled nature of basal metabolic rate and body temperature in endotherm evolution. *Nature, 572*(771), 651-654.

Baek, S. H., Shimode, S., Kim, H.-C., Han, M.-S., & Kikuchi, T. (2009). Strong bottom–up effects on phytoplankton community caused by a rainfall during spring and summer in Sagami Bay, Japan. *Journal of marine systems, 75*(1-2), 253-264.

Barow, M., & Meister, A. (2003). Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell & Environment, 26*(4), 571-584.

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

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.

Bock, C., Olefeld, J. L., Vogt, J. C., Albach, D. C., & Boenigk, J. (2022). Phylogenetic and functional diversity of Chrysophyceae in inland waters. *Organisms Diversity & Evolution, 22*(2), 327-341.

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.

Brandham, P. E. (1965). Some new chromosome counts in the desmids. *British Phycological Bulletin, 2*(6), 451-455.

Brochmann, C., Brysting, A. K., Alsos, I. G., Borgen, L., Grundt, H. H., Scheen, A.-C., et al. (2004). Polyploidy in arctic plants. *Biological journal of the Linnean society, 82*(4), 521-536.

Brown, J. W., & Sorhannus, U. (2010). A Molecular Genetic timescale for the diversification of autotrophic Stramenopiles (Ochrophyta): Substantive Underestimation of Putative Fossil Ages. *PloS one, 5*(9).

Buchheim, M. A., Turmel, M., Zimmer, E. A., & Chapman, R. L. (1990). Phylogeny of *Chlamydomonas* (Chlorophyta) based on cladistic analysis of nuclear 18S rRNA sequence data. *Journal of Phycology, 26*(4), 689-699.

Bureš, P., Elliott, T. L., Veselý, P., Šmarda, P., Forest, F., Leitch, I. J., et al. (2024). The global distribution of angiosperm genome size is shaped by climate. *New Phytol, 242*(2), 744-759.

Carta, A., Mattana, E., Dickie, J., & Vandelook, F. (2022). Correlated evolution of seed mass and genome size varies among life forms in flowering plants. *Seed Science Research, 32*(1), 46-52.

Cavalier-Smith, T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of Cell Science, 34*, 247-278.

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, T. (1982). Skeletal DNA and the evolution of genome size. *Annual review of biophysics bioengineering, 11*(1), 273-302.

Cavalier-Smith, T. (2005). Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Annals of Botany, 95*(1), 147-175.

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.

Cox, P. A., & Sethian, J. A. (1984). Search, encounter rates, and the evolution of anisogamy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 81*(19), 6078-6079.

Čertner, M., Lučanová, M., Sliwinska, E., Kolář, F., & Loureiro, J. (2022). Plant material selection, collection, preservation, and storage for nuclear DNA content estimation. *Cytometry, 101*(9), 737-748.

Čertnerová, D. (2021). Nuclei isolation protocols for flow cytometry allowing nuclear DNA content estimation in problematic microalgal groups. *Journal of Applied Phycology, 33*(4), 2057-2067.

Čertnerová, D. (2022). *Genome size variation in microalgae and its evolutionary consequences.* (Dizertační práce), Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.

Čertnerová, D., Čertner, M., & Škaloud, P. (2022). Alternating nuclear DNA content in chrysophytes provides evidence of their isomorphic haploid-diploid life cycle. *Algal Research, 64*.

Čertnerová, D., & Galbraith, D. W. (2021). Best practices in the flow cytometry of microalgae. *Cytometry Part A, 99*(4), 359-364.

Čertnerová, D., & Škaloud, P. (2020). Substantial intraspecific genome size variation in golden-brown algae and its phenotypic consequences. *Annals of Botany, 126*(6), 1077-1087.

de Castro, F., Gaedke, U., & Boenigk, J. (2009). Reverse evolution: driving forces behind the loss of acquired photosynthetic traits. *PloS one, 4*(12).

Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A. Z., Robbens, S., et al. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103*(31), 11647-11652.

Devos, K. M., Brown, J. K. M., & Bennetzen, J. L. (2002). Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome research, 12*(7), 1075-1079.

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

Doležel, J., Binarová, P., & Lcretti, S. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia plantarum, 31*(2), 113-120.
Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*: John Wiley & Sons.
Drotos, K. H. I., Zagoskin, M. V., Kess, T., Gregory, T. R., & Wyngaard, G. A. (2022). Throwing away DNA: programmed downsizing in somatic nuclei. *Trends in Genetics, 38*(5), 483-500.
Dürrschmidt, M. (1983). A taxonomic study of the *Mallomonas mangofera* group (Mallomonadaceae, Chrysophyceae), including the description of four new taxa. *Plant systematics evolution, 143*, 175-196.
Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International journal of climatology, 37*(12), 4302-4315.
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), 301-307.
Fleischmann, A., Michael, T. P., Rivadavia, F., Sousa, A., Wang, W., Temsch, E. M., et al. (2014). Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Annals of Botany, 114*(8), 1651-1663.
Foissner, W. (2007). Protist diversity and distribution: some basic considerations. In W. Foissner & D. L. Hawksworth (Eds.), *Protist Diversity and Geographical Distribution* (pp. 1-8). Dordrecht: Springer Netherlands.
Foy, C. D., Chaney, R. L., & White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual review of plant physiology, 29*(1), 511-566.
Friz, C. T. (1968). The biochemical composition of the free-living Amoebae *Chaos chaos*, *Amoeba dubia* and *Amoeba proteus*. *Comparative biochemistry physiology, 26*(1), 81-90.
Galbraith, D., Loureiro, J., Antoniadi, I., Bainard, J., Bureš, P., Cápal, P., et al. (2021). Best practices in plant cytometry. *Cytometry Part A, 99*(4), 311-317.
Gall, E. A., Asensi, A., Marie, D., & Kloareg, B. (1996). Parthenogenesis and apospory in the Laminariales: a flow cytometry analysis. *European Journal of Phycology, 31*(4), 369-380.
Goldberg, I. H., & Friedman, P. A. (1971). Inhibitors of polymerase function. *Annual Review of Biochemistry., 40*, 797-797.
Green, W. R., & Hufhines, B. (2017). A rare *Uroglena* bloom in Beaver Lake, Arkansas, spring 2015. *Lake and Reservoir Management, 33*(1), 8-13.
Gregory, T. R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological reviews, 76*(1), 65-101.
Gregory, T. R. (2004). Macroevolution, hierarchy theory, and the C-value enigma. *Paleobiology, 30*(2), 179-202.
Gregory, T. R. (2005a). The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of Botany, 95*(1), 133-146.
Gregory, T. R. (2005b). CHAPTER 1 - Genome Size Evolution in Animals. In T. R. Gregory (Ed.), *The Evolution of the Genome* (pp. 3-87). Burlington: Academic Press.
Gregory, T. R. (2005c). Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nature Reviews Genetics, 6*(9), 699-708.
Gregory, T. R., & Hebert, P. D. N. (1999). The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome research, 9*(4), 317-324.
Greilhuber, J., Temsch, E. M., & Loureiro, J. C. M. (2007). Nuclear DNA content measurement. *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes, genomes*, 67-101.

Guillard, R. R. L., & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology, 8*(1).
Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2024). AlgaeBase. World-wide electronic publication. https://www.algaebase.org.
Gusev, E., Tran, H., Shkurina, N., & Martynenko, N. (2023). *Mallomonas rimosa* sp. nov.(Synurales, Chrysophyceae)—a rare tropical species from Vietnam. *Phytotaxa, 630(4)*, 295-300.
Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics, 191*(1), 33-64.
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. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 50*(6), 735-749.
Harris, K., & Bradley, D. E. (1960). A taxonomic study of *Mallomonas*. *Microbiology, 22*(3), 750-777.
Hayward, A., & Gilbert, C. (2022). Transposable elements. *Current Biology, 32*(17), 904-909.
Hengl, T., Mendes de Jesus, J., Heuvelink, G. B. M., Ruiperez G., M., Kilibarda, M., Blagotić, A., et al. (2017). SoilGrids250m: Global gridded soil information based on machine learning. *PloS one, 12*(2).
Hessen, D. O., Daufresne, M., & Leinaas, H. P. (2013). Temperature-size relations from the cellular-genomic perspective. *Biological reviews, 88*(2), 476-489.
Hidalgo, O., Pellicer, J., Christenhusz, M., Schneider, H., Leitch, A. R., & Leitch, I. J. (2017). Is there an upper limit to genome size? *Trends in Plant Science, 22*(7), 567-573.
Hoffmann, L., & Wille, E. (1992). Occurrence of a metalimnetic summer peak of *Mallomonas caudata* (Synurophyceae). *Nordic Journal of Botany, 12*(4), 465-469.
Hřibová, E., Holušová, K., Trávníček, P., Petrovska, B., Ponert, J., Šimková, H., et al. (2016). The enigma of progressively partial endoreplication: new insights provided by flow cytometry and next-generation sequencing. *Genome Biology and Evolution, 8*(6), 1996-2005.
Chen, G., Rubinstein, B., & Li, R. (2012). Whole chromosome aneuploidy: Big mutations drive adaptation by phenotypic leap. *Bioessays, 34*(10), 893-900.
Ignatenko, M. E., & Yatsenko-Stepanova, T. N. (2022). Diversity of Chrysophycean Stomatocysts in the Steppe Zone of the South Urals. *Doklady Biological Sciences, 506*(1), 184-190.
Inouye, I. (1993). Flagella and flagellar apparatuses of algae. *Ultrastructure of microalgae*, *99*, 133.
Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G., & Schwarzenberger, K. (2012). Flow cytometry. *The Journal of investigative dermatology, 132*(10).
Jansson, M., Blomqvist, P., Jonsson, A., & BergstrÖm, A.-K. (1996). Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örträsket. *Limnology and Oceanography, 41*(7), 1552-1559.
Jeffery, N. W., Hultgren, k., Solomon, T. C. C., Gregory, T. R., & Dustin, R. R. (2016). Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome, 59*(6), 393-402.
Jeong, M., Kim, J. I., Jo, B. Y., Kim, H. S., Siver, P. A., & Shin, W. (2019). Surviving the marine environment: two new species of *Mallomonas* (Synurophyceae). *Phycologia, 58*(3), 276-286.
Jeschke, J. M., & Strayer, D. L. (2008). Usefulness of Bioclimatic Models for Studying Climate Change and Invasive Species. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1134*(1), 1-24.

Jo, B. Y., Shin, W., Kim, H. S., Siver, P. A., & Andersen, R. A. (2013). Phylogeny of the genus *Mallomonas* (Synurophyceae) and descriptions of five new species on the basis of morphological evidence. *Phycologia, 52*(3), 266-278.

Kapustin, D. A., Gusev, E. S., Lilitskaya, G. G., & Kulikovskiy, M. S. (2020). Silica-scaled chrysophytes from the Ukrainian Polissia. *Cryptogamie, Algologie, 41*(12), 121-135.

Kawaguchi, Y. W., Tsuchikane, Y., Tanaka, K., Taji, T., Suzuki, Y., Toyoda, A., et al. (2023). Extensive Copy Number Variation Explains Genome Size Variation in the Unicellular Zygnematophycean Alga, *Closterium peracerosum–strigosum–*littorale Complex. *Genome Biology and Evolution, 15*(8).

Keeling, P. J. (2007). *Ostreococcus tauri:* seeing through the genes to the genome. *Trends in Genetics, 23*(4), 151-154.

Keeling, P. J., Corradi, N., Morrison, H. G., Haag, K. L., Ebert, D., Weiss, L. M., et al. (2010). The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biology and Evolution, 2*, 304-309.

Kharkongor, D., & Ramanujam, P. (2022). Determination of Antioxidant Activities in Four Dominant Species of *Trentepohlia* (Trentepohliales, Chlorophyta) from East Khasi Hills, Meghalaya, India. In *Current Aspects in Pharmaceutical Research and Development* (Vol. 8, pp. 1-12): Book Publisher International.

Konečná, E. (2022). *Vztah velikosti genomu mykobionta s ekologickou strategií lišejníků.* (Magisterská práce), Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.

Kraaijeveld, K. (2010). Genome size and species diversification. *Evolutionary biology, 37*, 227-233.

Kraus, D., Chi, J., Boenigk, J., Beisser, D., Graupner, N., & Dunthorn, M. (2019). Putatively asexual chrysophytes have meiotic genes: evidence from transcriptomic data. *PeerJ, 6*.

Kristiansen, J. (1985a). Occurrence of silica-scaled Chrysophyceae (Mallomonadaceae) in a eutrophic Danish lake. *Journal of limnology, 22*, 2826-2829.

Kristiansen, J. (1986). Silica-scale bearing chrysophytes as environmental indicators. *British phycological journal, 21*(4), 425-436.

Kristiansen, J. (2001). Biogeography of silica-scaled chrysophytes. *Nova Hedwigia Beiheft, 122*, 23-40.

Kristiansen, J. (2002). *The genus Mallomonas (Synurophyceae): A taxonomic survey based on the ultrastructure of silica scales and bristles*: Council for Nordic Publ.

Kristiansen, J., & Preisig, H. R. (2007). Süsswasserflora von Mitteleuropa, vol 1, part 2, Synurophyceae. *Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg*.

Kristiansen, J., & Škaloud, P. (2017). Chrysophyta. In J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, & S. C.H. (Eds.), *Handbook of the Protists, Second Edition* (pp. 331-366): Springer International Publishing.

LaJeunesse, T. C., Lambert, G., Andersen, R. A., Coffroth, M. A., & Galbraith, D. W. (2005). Symbiodinium (Pyrphophyta) genome size (DNA content) are smallest among Dinoflagellates 1. *Journal of Phycology, 41*(4), 880-886.

Larsen, T. A., Goodsell, D. S., Cascio, D., Grzeskowiak, K., & Dickerson, R. E. (1989). The structure of DAPI bound to DNA. *Journal of biomolecular structure dynamics, 7*(3), 477-491.

Lavau, S., & Wetherbee, R. (1994). Structure and development of the scale case of *Mallomonas adamas* (Synurophyceae). In R. Wetherbee, J. D. Pickett-Heaps, & R. A. Andersen (Eds.), *The Protistan Cell Surface* (pp. 259-268). Vienna: Springer Vienna.

Lawrence, J. G. (1999). Gene transfer and minimal genome size. In *National Academy of Sciences* (pp. 32-38).

Leers, M. P. G., Schutte, B., Theunissen, P. H. M. H., Ramaekers, F. C. S., & Nap, M. (1999). Heat pretreatment increases resolution in DNA Flow Cytometry of paraffin-embedded

tumor tissue. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 35*(3), 260-266.
Leitch, I. J., & Dodsworth, S. (2017). Endopolyploidy in plants. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1-10).
Lemaire, S. D., Hours, M., Gerard-Hirne, C., Trouabal, A., Roche, O., & Jacquot, J.-P. (1999). Analysis of light/dark synchronization of cell-wall-less *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) cells by Flow Cytometry. *European Journal of Phycology, 34*(3), 279-286.
Leroy, S., Bouamer, S., Morand, S., & Fargette, M. (2007). Genome size of plant-parasitic nematodes. *Nematology, 9*(3), 449.
Liu, F., Wu, Y., & Zeng, L. (2020). Swimming Characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Coastal Research, 104*(SI), 455-464.
Loureiro, J., Čertner, M., Lučanová, M., Sliwinska, E., Kolář, F., Doležel, J., et al. (2023). The use of Flow Cytometry for estimating genome sizes and DNA ploidy levels in plants. In *Plant Cytogenetics and Cytogenomics: Methods and Protocols* (pp. 25-64): Springer.
Lukeš, J. (2023). *Evoluce velikosti genomu u streptofytních řas rodu Zygnema a souvislosti s ekologií jednotlivých druhů.* (Magisterská práce), Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.
Mable, B. K., & Otto, S. P. (1998). The evolution of life cycles with haploid and diploid phases. *Bioessays, 20*(6), 453-462.
MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1967). *The theory of island biogeography*: Princeton University Press.
Majda, S., Beisser, D., & Boenigk, J. (2021). Nutrient-driven genome evolution revealed by comparative genomics of chrysomonad flagellates. *Communications biology, 4*(1), 328.
Malerba, M. E., Ghedini, G., & Marshall, D. (2020). Genome size affects fitness in the eukaryotic alga *Dunaliella tertiolecta*. *Current biology, 30*(17), 3450-3456.
Mandáková, T., & Lysak, M. A. (2018). Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Current opinion in plant biology, 42*, 55-65.
Mayrose, I., Zhan, S. H., Rothfels, C. J., Magnuson-Ford, K., Barker, M. S., Rieseberg, L. H., et al. (2011). Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science, 333*(6047), 1257-1257.
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.
McIntyre, P. J. (2012). Cytogeography and genome size variation in the *Claytonia perfoliata* (Portulacaceae) polyploid complex. *Annals of Botany, 110*(6), 1195–1203.
McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An overview. *Current protocols in immunology, 120*(1).
Medlin, L. K., Barker, G. L., Campbell, L., Green, J. C., Hayes, P. K., Marie, D., et al. (1996). Genetic characterisation of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). *Journal of marine systems, 9*(12), 13-31.
Mohanta, T. K., & Bae, H. (2015). The diversity of fungal genome. *Biol Proced Online, 17*, 8.
Moore, G. P. (1984). The C-Value Paradox. *BioScience, 34*(7), 425-429.
Mueller, R. L. (2015). Genome biology and the evolution of cell-size diversity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7*(11).
Nakamura, D., Tiersch, T. R., Douglass, M., & Chandler, R. W. (1990). Rapid identification of sex in birds by Flow Cytometry. *Cytogenetic Genome Research, 53*(4), 201-205.
Naville, M., Henriet, S., Warren, I., Sumic, S., Reeve, M., Volff, J.-N., et al. (2019). Massive changes of genome size driven by expansions of non-autonomous transposable elements. *Current Biology, 29*(7), 1161-1168.

Němcová, Y., & Kreidlová, J. (2013). Two new species of *Mallomonas* (Chrysophyceae: Synurales): *Mallomonas temonis* and *Mallomonas divida*. *Phytotaxa, 87*, 11-18.

Němcová, Y., Pichrtová, M., & Zeisek, V. (2015). *Mallomonas alpestrina* sp. nov.(Synurales, Chrysophyceae, Stramenopiles) and its spineless relatives—*Mallomonas alata* group. *Phytotaxa, 222*(2), 111–120.

Nicholls, H. W. (1980). Polyploidy in algae. In W. H. Lewis (Ed.), *Polyploidy: Biological Relevance* (pp. 151-161). Boston, MA: Springer US.

Nicholls, K. H. (1984). Four new *Mallomonas* species of the Torquatae series (Chrysophyceae). *Canadian journal of botany, 62*(8), 1583-1591.

Nicholls, K. H., & Wujek, D. E. (2015). Chapter 12 - Chrysophyceae and Phaeothamniophyceae. In J. D. Wehr, R. G. Sheath, & J. P. Kociolek (Eds.), *Freshwater Algae of North America (Second Edition)* (pp. 537-586). Boston: Academic Press.

Noirot, M., Barre, P., Duperray, C., Hamon, S., & De Kochko, A. (2005). Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. *Annals of Botany, 95*(1), 111-118.

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 & Evolution, 18*(2), 163-173.

Orme, D., Freckleton, R., Thomas, G., Petzoldt, T., Fritz, S., Isaac, N., et al. (2013). caper: Comparative analyses of phylogenetics and evolution in R. 2013. R package version 0.5. 2. *Available at R-Forge. R-project. org/projects/caper/. Accessed December, 4*.

Otto, S. P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell, 131*(3), 452-462.

Pagel, M., Meade, A., & Barker, D. (2004). Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Systematic biology, 53*(5), 673-684.

Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., et al. (2007). The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *PNAS, 104*(18), 7705-7710.

Palmer, M. J., & Black, W. C. (1997). Determination of insect genome size and complexity by reassociation kinetics. In J. M. Crampton, C. B. Beard, & C. Louis (Eds.), *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual* (pp. 172-194). Dordrecht: Springer Netherlands.

Pedersen, R. A. (1971). DNA content, ribosomal gene multiplicity, and cell size in fish. *Journal of Experimental Zoology, 177*(1), 65-78.

Pellicer, J., Fay, M. F., & Leitch, I. J. (2010). The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society, 164*(1), 10-15.

Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S., & Leitch, I. J. (2018). Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes, 9*(2).

Penard, E. (1919). *Mallomonas insignis* spec. nov. *Bulletin de la Société Botanique Genève, 2*(11), 122-128.

Petrov, D. A. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics, 17*(1), 23-28.

Peyretaillade, E., El Alaoui, H., Diogon, M., Polonais, V., Parisot, N., Biron, D. G., et al. (2011). Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Research in Microbiology, 162*(6), 598-606.

Pfenninger, M., Schönnenbeck, P., & Schell, T. (2021). Precise estimation of genome size from NGS data. *BioRxiv*.

Phillips, N., Kapraun, D. F., Gómez Garreta, A., Ribera Siguan, M. A., Rull, J. L., Salvador Soler, N., et al. (2011). Estimates of nuclear DNA content in 98 species of brown algae (Phaeophyta). *AoB Plants, 2011*.

Piątek, J., & Łukaszek, M. (2016). *Mallomonas cronbergiae* (Chrysophyceae, Stramenopiles), a new species from the Guineo-Congolian rainforest in Cameroon. *Pol. Bot. J, 61*, 199-204.

Pichrtová, M., Němcová, Y., Škaloud, P., & Rott, E. (2013). Silica-scaled chrysophytes from North Tyrol (Austria) including a description of *Mallomonas tirolensis* sp. nov. *Nova Hedwigia Beiheft, 142*, 69-85.

Pichrtová, M., Remias, D., Lewis, L. A., & Holzinger, A. (2013). Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio. *Microbial ecology, 65*, 68-83.

Pombert, J.-F., Blouin, N. A., Lane, C., Boucias, D., & Keeling, P. J. (2014). A lack of parasitic teduction in the obligate parasitic green alga *Helicosporidium*. *PLOS Genetics, 10*(5).

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).

Preston, R. D. (1974). *The physical biology of plant cell walls*.

Pyšek, P., & Richardson, D. M. (2007). Traits associated with invasiveness in alien plants: where do we stand? *Biological invasions*, 97-125.

Raven, J. A., Ball, L. A., Beardall, J., Giordano, M., & Maberly, S. C. (2005). Algae lacking carbon-concentrating mechanisms. *Canadian journal of botany, 83*(7), 879-890.

Rejmánek, M. (1996). A theory of seed plant invasiveness: The first sketch. *Biological Conservation, 78*(1), 171-181.

Revell, L. J. (2012). phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in ecology and evolution*(2), 217-223.

Řezáčová, M. (2006). *Mallomonas kalinae* (Synurophyceae), a new species of alga: from northern Bohemia, Czech Republic. *Preslia, 78*(3), 353-358.

Sandgren, C. D. (1991). Chrysophyte reproduction and resting cysts: a paleolimnologist's primer. *Journal of Paleolimnology, 5*, 1-9.

Sanmiguel, P., & Bennetzen, J. L. (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany, 82*, 37-44.

Sclavi, B., & Herrick, J. (2019). Genome size variation and species diversity in salamanders. *Journal of Evolutionary Biology, 32*(3), 278-286.

Seed, C. E., & Tomkins, J. L. (2018). Positive size–speed relationships in gametes and vegetative cells of *Chlamydomonas reinhardtii*; implications for the evolution of sperm. *Evolution, 72*(3), 440-452.

Sessions, S. K. (2013). Genome Size. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 301-305). San Diego: Academic Press.

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika, 52*(3-4), 591-611.

Schoenfelder, K. P., & Fox, D. T. (2015). The expanding implications of polyploidy. *Journal of Cell Biology, 209*(4), 485-491.

Scholes, D. R., & Paige, K. N. (2015). Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends in Plant Science, 20*(3), 165-175.

Schrader, L., & Schmitz, J. (2019). The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Molecular Ecology, 28*(6), 1537-1549.

Siver, P. A. (1989). The distribution of scaled chrysophytes along a pH gradient. *Canadian journal of botany, 67*(7), 2120-2130.

Siver, P. A. (1991). *The biology of Mallomonas: morphology, taxonomy and ecology* (Vol. 63): Springer Science & Business Media.

Siver, P. A., & Hamer, J. S. (1989). Multivariate statistical analysis of the factors controlling the distribution of scaled chrysophytes. *Limnology and Oceanography, 34*(2), 368-381.
Siver, P. A., Jo, B. Y., Kim, J. I., Shin, W., Lott, A. M., & Wolfe, A. P. (2015). Assessing the evolutionary history of the class Synurophyceae (Heterokonta) using molecular, morphometric, and paleobiological approaches. *American Journal of Botany, 102*(6), 921-941.
Sliwinska, E., Loureiro, J., Leitch, I. J., Šmarda, P., Bainard, J., Bureš, P., et al. (2022). Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry. *Cytometry Part A, 101*(9), 749-781.
Smol, J. P., Charles, D. F., & Whitehead, D. R. (1984). Mallomonadacean microfossils provide evidence of recent lake acidification. *Nature, 307*(5952), 628-630.
Soltis, P. S. (2013). Hybridization in plants. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (pp. 166-176). Waltham: Academic Press.
Stace, C. A. (1989). *Plant taxonomy and biosystematics*: Cambridge University Press.
Standeren, E. (2018). *Cell-and genome size responses to different temperatures in haptophytes.* (Master's thesis).
Stelzer, C.-P., Pichler, M., & Hatheuer, A. (2021). Linking genome size variation to population phenotypic variation within the rotifer, *Brachionus asplanchnoidis*. *Communications Biology, 4*(1), 596.
Strassburger, E. (1893). Ûber die Wirkungssphäre der kerne und die zellgrösse. *Histol Beitr, 5*, 97-124.
Suda, J. (2009). Darwinova "odporná záhada" po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin. *Živa, 5*, 204-208.
Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., & Takata, K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 45*(1), 49-53.
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.
Škaloud, P., Kristiansen, J., & Škaloudová, M. (2013). Developments in the taxonomy of silica-scaled chrysophytes–from morphological and ultrastructural to molecular approaches. *Nordic Journal of Botany, 31*(4), 385-402.
Škaloud, P., Škaloudová, M., Pichrtová, M., Němcová, Y., Kreidlová, J., & Pusztai, M. (2013). www. chrysophytes. eu–a database on distribution and ecology of silica-scaled chrysophytes in Europe. *Nova Hedwigia, 142*, 141-146.
Šmarda, P., & Bureš, P. (2010). Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia, 82*(1), 41-61.
Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Foggi, B., & Rossi, G. (2008). Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany, 101*(3), 421-433.
Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Leitch, I. J., Mucina, L., Pacini, E., et al. (2014). Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111*(39), 96-102.
Šmarda, P., Hejcman, M., Březinová, A., Horová, L., Steigerová, H., Zedek, F., et al. (2013). Effect of phosphorus availability on the selection of species with different ploidy levels and genome sizes in a long-term grassland fertilization experiment. *New Phytologist, 200*(3), 911-921.
Takahashi, E. (1978). *Electron microscopical studies of the Synuraceae (Chrysophyceae) in Japan: taxonomy and ecology*: Tokai University Press.

Taylor, W. D. (1978). Maximum growth rate, size and commonness in a community of bactivorous ciliates. *Oecologia, 36*(3), 263-272.

Temsch, E. M., Koutecký, P., Urfus, T., Šmarda, P., & Doležel, J. (2022). Reference standards for flow cytometric estimation of absolute nuclear DNA content in plants. *Cytometry Part A, 101*(9), 710-724.

Togashi, T., & Cox, P. A. (2004). Phototaxis and the evolution of isogamy and 'slight anisogamy'in marine green algae: insights from laboratory observations and numerical experiments. *Botanical Journal of the Linnean Society, 144*(3), 321-327.

Trávníček, P., Ponert, J., Urfus, T., Jersáková, J., Vrána, J., Hřibová, E., et al. (2015). Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication. *Cytometry Part A, 87*(10), 958-966.

Van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics, 18*(7), 411-424.

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.

Veselý, P., Bureš, P., Šmarda, P., & Pavlíček, T. (2012). Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Annals of Botany, 109*(1), 65-75.

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. *The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 3*(5), 328-331.

Vinogradov, A. E. (2003). Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant red list. *Trends in Genetics, 19*(11), 609-614.

Wang, J. C., Hoshaw, R. W., & McCourt, R. M. (1986). A polyploid species complex of *Spirogyra* communis (Chlorophyta) occurring in nature *Journal of Phycology, 22*(1), 102-107.

Warrington, J. A. (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiological genomic, 2*, 143-147.

Whiteley, A. S., Burkill, P. H., & Sleigh, M. A. (1993). Rapid method for cell cycle analysis in a predatory marine dinoflagellate. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 14*(8), 909-915.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., et al. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics, 8*(12), 973-982.

Wilhelm, J., & Hahn, M. (2004). Measuring genome sizes by absolute quantification. In C. Wittwer, M. Hahn, & K. Kaul (Eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR — Methods and Applications: Quantification* (pp. 31-41). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Wong, W. Y., Simakov, O., Bridge, D. M., Cartwright, P., Bellantuono, A. J., Kuhn, A., et al. (2019). Expansion of a single transposable element family is associated with genome-size increase and radiation in the genus *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 116*(46), 22915-22917.

Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., & Rieseberg, L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,, 106*(33).

Yan, G., Yang, W., Han, X., Chen, K., Xiong, J., Hamilton, E. P., et al. (2021). Evolution of the mating type gene pair and multiple sexes in *Tetrahymena*. *Science, 24*(1), 101-950.

Zacharias, H., Hennig, W., & Leoncipi, O. (1982). Microspectrophotometric comparison of the genome sizes of *Drosophila hydei* and some related species. *Genetica, 58*(2), 153-157.

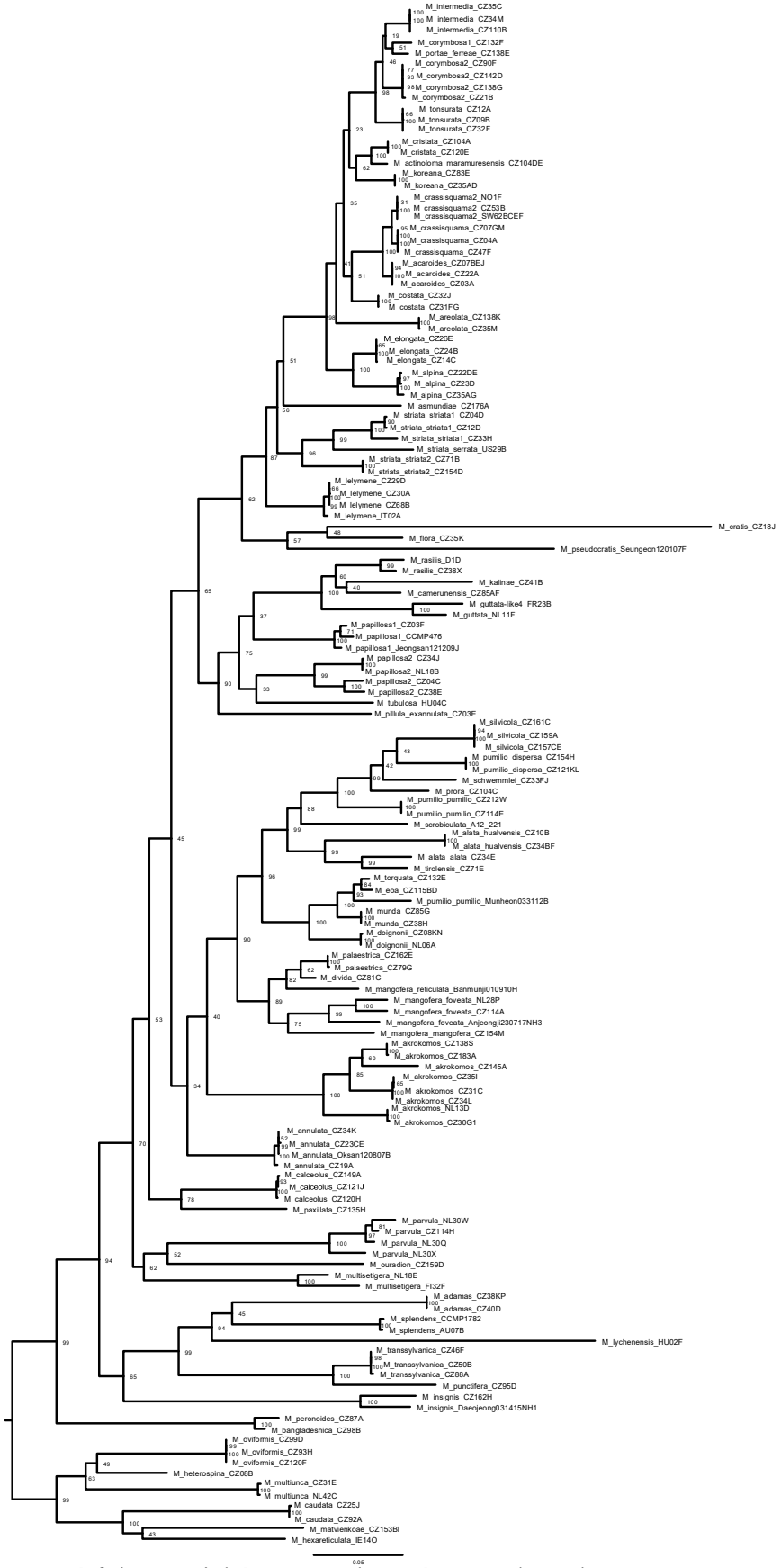
8 Přílohy

Příloha1 – elektronická: Jednotlivé naměřené rychlosti pohybu: (měření_rychlosti pohybu.pdf)

Příloha2 – elektronická: Výsledné hodnoty stažené ze Soilgrid a Worldclim databáze s přidanými hodnotami pH, konduktivitou a teplotou vody získaných z „*chrysophytes.eu"* a doplněnými GPS souřadnicemi: (SoilGrid_WorldClim_chrysophytes.eu.pdf)

Příloha3 – elektronická: Zprůměrované výsledky ze Soilgrid, Worldclim a „*chrysophytes.eu"* použité pro environmentální regrese: (Environmentální_proměnné_průměry.pdf)

Příloha4 – elektronická: Tabulka s četnostmi výskytu pro jednotlivé druhy rodu *Mallomonas* (četnost_výskytu.pdf)



Příloha5: Převzatý fylogenetický strom založený na markerech ITS rDNA, SSU rDNA a rbcL s doplněnou bootstrapovou podporou pro zhodnocení spolehlivosti fylogenetických větví. Měřítko odkazuje na míru substitucí na pár bází.

druh	kmen	Jednotlivá měření [*pg*]					Velikost genomu [*pg*]	Velikost genomu [*Gbp*]	poznámka	CV vzorek průměr [*%*]	CV vzorek medián [*%*]	standard	CV standard průměr [*%*]
		1	2	3	4	5							
M. acaroides	CZ07E	2.49	2.51	2.49	-	-	2.5 ± 0.01	2.4	-	2.1	1.9	C	2.3
	CZ07B	2.41	-	-	-	-	2.4	2.4	-	2.2	2.2	C	3.0
	CZ07J	2.48	-	-	-	-	2.5	2.4	-	3.2	3.2	C	3.0
	CZ03A	2.47	2.42	-	-	-	2.5 ± 0.03	2.4	-	2.3	2.3	C	3.8
	CZ22A	2.41	2.35	2.43	-	-	2.4 ± 0.04	2.3	-	3.3	3.7	C	4.5
M. actinoloma var. *maramuresensis*	CZ104D	1.71	1.77	1.77	1.68	-	1.7 ± 0.04	1.7	-	2.9	3.0	C	3.0
	CZ104E	1.79	1.71	1.78	-	-	1.8 ± 0.04	1.7	-	3.3	2.9	C	3.0
M. adamas	CZ38K	0.98	0.98	1.01	-	-	1.0 ± 0.01	1.0	-	2.4	1.7	C	2.7
	CZ40D	0.36	0.34	0.31	0.31	-	0.3 ± 0.02	0.3	-	3.5	3.2	C	3.0
	CZ38P	0.98	1.12	1.00	1.01	-	1.0 ± 0.06	1.0	-	3.4	3.4	S	2.6
M. akrokomos	CZ31C	0.26	0.25	0.26	-	-	0.3 ± 0.01	0.2	-	3.5	4.6	C	2.1
	CZ34L	0.27	0.29	0.28	0.26	-	0.3 ± 0.01	0.3	-	6.5	6.5	C	2.9
	CZ35I	0.26	0.26	0.26	-	-	0.3 ± 0.00	0.3	-	2.3	2.4	C	1.7
	CZ30G1	0.25	-	-	-	-	0.3	0.2	-	4.0	4.0	C	1.9
	NL13D	0.25	0.25	0.25	-	-	0.3 ± 0.00	0.2	-	4.6	2.1	C	2.8
	CZ145A	0.18	0.18	0.17	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	4.7	4.7	C	1.9
	CZ138S	0.16	0.16	0.17	-	-	0.2 ± 0.01	0.2	-	4.0	3.8	C	1.9
	CZ183A	0.18	0.17	0.17	0.17	-	0.2 ± 0.00	0.2	pík1	2.4	2.4	C	1.9
	CZ183A	0.20	0.21	-	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	pík2	4.0	4.0	C	2.1
	CZ183A	0.27	0.27	-	-	-	0.3 ± 0.00	0.3	pík2	2.0	2.0	C	1.8
M. alata f. *hualvensis*	CZ10B	0.25	0.25	0.25	-	-	0.3 ± 0.00	0.2	-	3.8	3.7	C	2.0
	CZ34F	0.25	0.25	0.25	-	-	0.3 ± 0.00	0.2	-	3.4	3.8	C	3.1
	CZ34B	0.25	0.26	0.25	-	-	0.3 ± 0.01	0.2	-	3.1	3.1	C	1.7
M. alata f. *alata*	CZ34E	0.21	0.21	0.20	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	3.2	3.0	C	2.6
M. alpina	CZ22D	1.55	1.58	1.54	1.50	-	1.5 ± 0.03	1.5	-	3.8	3.6	C	3.9

	CZ23D	1.53	1.69	-	-	-	1.6 ± 0.11	1.6	pík2	3.9	3.9	C	3.3
	CZ23D	1.17	1.31	1.24	-	-	1.2 ± 0.07	1.2	pík1	2.8	2.7	C	3.3
	CZ22E	1.62	1.62	-	-	-	1.6 ± 0.00	1.6	-	5.4	5.4	C	3.3
	CZ35A	1.05	1.04	1.01	-	-	1.0 ± 0.02	1.0	-	3.0	2.6	C	2.9
	CZ35G	1.29	1.29	1.26	-	-	1.3 ± 0.01	1.3	pík2	2.4	2.4	C	2.2
	CZ35G	0.93	0.96	0.93	-	-	0.9 ± 0.01	0.9	pík1	2.3	2.4	C	1.5
M. annulata	Oksan 120807B	0.79	0.78	0.79	-	-	0.8 ± 0.00	0.8	-	3.5	2.6	S	1.4
	CZ19A	0.67	0.68	0.63	0.61	0.62	0.6 ± 0.03	0.6	-	6.3	5.8	S	2.9
	CZ23C	0.52	0.52	0.51	-	-	0.5 ± 0.00	0.5	-	4.9	5.1	S	3.1
	CZ34K	0.75	0.75	-	-	-	0.8 ± 0.00	0.7	-	5.5	5.1	S	4.8
	CZ23E	0.74	0.75	0.75	-	-	0.8 ± 0.01	0.7	-	3.8	3.9	S	4.5
M. areolata	CZ35M	3.68	3.70	3.74	-	-	3.7 ± 0.03	3.6	-	2.9	3.0	S	3.6
	CZ138K	3.29	3.43	3.34	3.17	-	3.3 ± 0.11	3.2	-	4.2	4.3	S	4.6
M. asmundiae	CZ176A	2.32	2.11	2.11	2.02	-	2.1 ± 0.13	2.1	-	3.8	3.5	C	3.6
M. bangladeshica	CZ98B	0.38	0.37	0.38	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.1	4.5	C	1.6
M. calceolus	CZ149A	0.56	0.54	0.56	-	-	0.6 ± 0.01	0.5	-	3.9	3.5	C	3.1
	CZ120H	0.48	0.46	0.49	0.46	-	0.5 ± 0.02	0.5	-	3.1	3.2	C	2.0
	CZ121J	0.63	0.60	0.61	-	-	0.6 ± 0.02	0.6	-	4.9	3.7	S	4.1
M. camerunensis	CZ85A	0.44	0.43	0.45	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	2.1	1.6	C	2.1
	CZ85F	0.49	0.50	0.50	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	3.1	3.0	S	2.2
M. caudata	CZ25J	10.90	10.22	10.46	-	-	10.5 ± 0.34	10.3	-	3.7	3.4	P	4.0
	CZ92A	10.86	11.47	11.41	-	-	11.3 ± 0.34	11.0	-	3.5	3.6	P	3.6
M. corymbosa	CZ21B	0.55	0.54	0.54	-	-	0.5 ± 0.00	0.5	-	4.5	4.3	C	5.7
	CZ132F	1.44	1.37	1.39	-	-	1.4 ± 0.04	1.4	-	3.1	3.1	C	3.2
	CZ90F	0.52	0.53	0.54	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	3.5	3.7	C	3.6
	CZ142D	0.48	0.50	0.50	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	2.6	2.0	C	2.5
	CZ138G	0.57	0.56	0.57	-	-	0.6 ± 0.01	0.6	-	3.5	3.3	C	3.0
M. costata	CZ31G	1.18	1.20	1.20	-	-	1.2 ± 0.01	1.2	-	6.2	6.1	S	4.0
	CZ31F	1.13	1.17	1.14	-	-	1.2 ± 0.01	1.1	-	3.7	3.9	S	2.8

	CZ32J	1.14	1.15		-	-	1.1 ± 0.01	1.1	-	4.3	4.3	S	2.9
M. crassisquama	CZ04A	1.77	1.77	1.72	1.67	-	1.7 ± 0.05	1.7	-	2.6	2.8	S	2.1
	CZ07G	1.77	1.73	1.74	-	-	1.8 ± 0.02	1.7	-	2.5	2.5	S	2.3
	CZ07M	1.69	1.58	1.66	1.65	-	1.6 ± 0.05	1.6	-	3.7	3.6	S	2.2
	NO01F	1.28	1.24	1.24	-	-	1.3 ± 0.02	1.2	-	2.1	2.1	S	3.0
	CZ53B	3.13	3.20	3.12	-	-	3.2 ± 0.04	3.1	-	3.4	3.4	S	3.8
	SW62B	2.13	-	-	-	-	2.1	2.1	-	4.3	4.3	C	3.3
	SW62C	2.12	-	-	-	-	2.1	2.1	-	4.5	4.5	C	5.2
	SW62E	2.23	-	-	-	-	2.2	2.2	-	3.1	3.1	C	5.4
	SW62F	2.06	-	-	-	-	2.1	2.0	-	3.9	3.9	C	5.5
	CZ47F	0.83	-	-	-	-	0.8	0.8	-	1.4	1.4	S	2.9
M. cratis	CZ18J	3.64	3.60	-	-	-	3.6 ± 0.03	3.5	-	2.6	3.6	S	3.6
M. cristata	CZ104A	1.10	1.08	1.11	-	-	1.1 ± 0.01	1.1	-	3.2	3.1	S	3.1
	CZ120E	1.15	1.01	1.08	1.11	-	1.1 ± 0.06	1.1	-	3.8	3.8	S	3.2
M. divida	CZ81C	0.45	0.45	0.43	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.5	4.5	C	2.3
M. doignonii	CZ08K	0.55	0.55	0.54	-	-	0.6 ± 0.00	0.5	-	2.3	2.2	C	1.7
	CZO8N	0.58	0.58	0.59	-	-	0.6 ± 0.01	0.6	-	3.3	3.7	S	2.9
	NL06A	0.59	0.60	0.59	-	-	0.6 ± 0.00	0.6	-	3.5	3.5	S	2.7
M. elongata	CZ24B	4.37	4.37	4.33	-	-	4.4 ± 0.03	4.3	-	3.5	3.0	S	5.2
	CZ14C	4.21	4.28	4.31	-	-	4.3± 0.05	4.2	-	3.9	4.1	S	3.1
	CZ26E	4.51	4.62	4.57	-	-	4.6 ± 0.06	4.5	-	2.5	2.7	S	3.7
M. eoa	CZ115D	0.67	0.65	0.63	0.63	-	0.7 ± 0.02	0.6	-	5.4	5.4	S	3.6
	CZ115B	0.62	0.61	0.58	-	-	0.6 ± 0.02	0.6	-	5.4	5.1	S	2.0
M. flora	CZ35K	5.45	5.25	5.29	-	-	5.3 ± 0.11	5.2	-	2.9	2.8	P	2.8
M. guttata	NL11F	1.96	1.83	1.87	-	-	2.0 ± 0.01	1.9	-	4.2	3.5	C	3.7
	FR23B	0.61	0.61	0.64	-	-	0.6 ± 0.02	0.6	-	2.7	2.7	S	2.5
M. heterospina	CZ08B	0.15	-	-	-	-	0.2	0.1	-	4.9	4.9	C	1.5
M. hexareticulata	IE14O	2.34	1.21	1.18	-	-	1.2 ± 0.66	1.2	-	3.1	2.9	C	3.5

M. insignis	Daeojeong 031415NH 1	6.35	6.48	6.46	-	-	6.4 ± 0.07	6.3	-	3.9	3.9	P	2.1
	CZ162H	4.18	4.08	4.11	-	-	4.1 ± 0.05	4.0	-	5.2	3.9	P	3.9
M. intermedia	CZ34M	1.18	1.13	1.16	-	-	1.2 ± 0.01	1.1	-	3.8	3.6	S	2.8
	CZ35C	1.05	1.02	1.03	-	-	1.0 ± 0.01	1.0	-	3.3	2.7	S	3.2
	CZ110B	1.06	1.06	1.02	-	-	1.0 ± 0.02	1.0	-	5.7	6.0	S	2.6
M. kalinae	CZ41B	0.50	0.51	0.50	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	1.6	1.9	C	2.1
M. koreana	CZ35AD	0.52	0.49	0.50	0.47	-	0.5 ± 0.02	0.5	-	2.0	2.0	C	2.2
	CZ83E	0.50	0.50	0.41	-	-	0.5 ± 0.05	0.5	-	2.3	2.5	C	2.0
M. lelymene	Silso 012611J	3.24	3.13	3.14	-	-	3.2 ± 0.06	3.1	-	3.4	2.9	P	1.7
	CZ30A	4.45	4.38	4.52	-	-	4.4 ± 0.07	4.4	pík1	4.4	4.3	S	4.4
	CZ30A	5.08	4.94	5.14	-	-	5.1 ± 0.10	4.9	pík2	4.9	5.0	S	2.0
	CZ29D	4.51	4.37	4.35	-	-	4.4 ± 0.08	4.3	-	2.8	3.0	P	2.6
	CZ68B	3.16	3.01	3.07	3.11	-	3.1 ± 0.06	3.0	-	2.8	2.9	P	3.1
	IT02A	3.24	2.85	3.08	2.90	-	3.0 ± 0.18	3.0	-	2.6	2.6	P	3.0
M. lychenensis	HU02F	3.08	3.01	2.99	-	-	3.0 ± 0.04	3.0	-	2.8	2.9	C	9.4
M. mangofera f. *foveata*	NL28P	0.27	0.27	0.27	-	-	0.3 ± 0.00	0.3	-	3.2	3.3	C	2.3
	DMJMMA FO	0.50	0.49	0.50	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	2.2	2.0	C	1.8
	CZ114A	0.53	0.54	0.54	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	3.3	3.5	C	2.6
	Anjeongji 230717N H3	0.61	0.59	0.58	-	-	0.6 ± 0.01	0.6	-	4.0	4.1	S	1.6
M. mangofera f. *mangofera*	CZ154M	0.59	0.57	0.50	-	-	0.6 ± 0.00	0.6	-	4.1	4.1	C	2.5
M. mangofera f. *reticulata*	Banmunji 010910H	2.62	2.71	2.64	-	-	2.7 ± 0.05	2.6	-	3.6	3.3	C	4.1
M. matvienkoae	CZ153B	0.42	0.42	0.41	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.1	4.3	C	2.1
	CZ153I	4.93	4.95	5.13	4.96	-	5.0 ± 0.09	4.9	-	3.1	2.5	S	4.0

	FI32F	1.89	1.90	1.89	-	-	1.9 ± 0.01	1.9	-	2.4	2.2	S	3.0
	NL18E	0.38	0.39	0.36	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	2.9	2.7	C	2.0
M. multiunca	CZ31E	0.96	0.98	0.98	-	-	1.0 ± 0.01	1.0	-	2.9	2.7	S	3.6
	NL42C	0.70	0.66	0.68	-	-	0.7 ± 0.02	0.7	-	3.2	3.0	S	2.6
M. munda	CZ85G	0.45	0.44	0.45	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.0	4.1	C	3.3
	CZ38H	0.45	0.44	0.45	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	3.4	3.2	C	1.6
M. ouradion	CZ159D	0.44	0.45	0.45	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	3.7	3.7	C	2.1
M. oviformis	CZ99D	3.71	3.71	3.62	-	-	3.7 ± 0.05	3.6	-	3.8	3.9	S	3.5
	CZ120F	1.47	1.48	1.42	-	-	1.5 ± 0.03	1.4	-	4.4	3.5	S	3.0
	CZ93H	3.29	3.28	3.20	-	-	3.3 ± 0.05	3.2	pík1	3.6	3.9	S	4.1
	CZ93H	3.68	3.57	3.63	-	-	3.6 ± 0.06	3.5	pík2	3.0	3.1	S	3.5
M. palaestrica	CZ79G	0.19	0.19	0.20	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	3.6	3.0	C	1.7
	CZ162E	0.18	0.20	0.20	0.18	-	0.2 ± 0.01	0.2	-	4.6	4.6	C	3.3
M. papillosa	CCMP 479	0.52	0.51	0.51	0.50	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	2.4	2.9	C	2.4
	Jeongsan 121209J	0.46	0.46	0.45	-	-	0.5 ± 0.01	0.4	pík1	2.1	2.3	C	2.4
	Jeongsan 121209J	0.52	0.52	-	-	-	0.5 ± 0.00	0.5	pík2	2.2	2.2	C	1.7
	DMJMpa2	0.49	0.48	0.49	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	2.2	2.0	C	1.8
	CZ03F	0.83	0.84	0.80	-	-	0.8 ± 0.02	0.8	-	5.3	5.6	S	2.3
	CZ04C	0.53	0.51	0.52	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.6	4.6	C	3.5
	CZ34J	0.46	0.47	0.46	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	3.4	3.4	C	3.4
	CZ38E	0.37	0.38	0.36	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	5.3	5.5	C	2.4
	NL18B	0.47	0.48	0.48	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	5.6	4.8	C	2.6
	CCMP476	1.88	1.91	1.88	-	-	0.5 ± 0.02	0.5	-	4.0	3.2	C	3.2
M. parvula	CZ114H	0.26	0.26	0.26	-	-	0.3 ± 0.00	0.3	-	4.1	3.9	C	2.2
	NL30Q	0.31	0.31	0.31	-	-	0.3 ± 0.00	0.3	-	3.5	3.1	C	3.5
	NL30W	0.25	0.26	0.24	0.23	-	0.2 ± 0.01	0.2	-	3.0	3.1	C	1.8
	NL30X	0.22	0.21	0.22	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	4.4	4.3	C	2.7
M. paxillata	CZ135H	0.45	0.45	0.46	-	-	0.5 ± 0.01	0.4	-	3.7	3.8	C	2.6

M. peronoides	CZ87A	0.48	0.47	0.47	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	-	5.2	5.3	S	4.3
M. pillula f. *exannulata*	CZ03E	0.36	0.36	0.38	0.35	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	3.0	2.7	C	2.0
M. portae-ferreae	CZ138E	1.59	1.45	1.46	1.39	-	1.5 ± 0.08	1.4	-	4.8	4.9	S	3.7
M. prora	CZ104C	0.21	0.20	0.21	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	1.8	1.8	C	1.6
M. pseudocratis	Seungeon 120107F	3.12	3.14	3.15	-	-	3.1 ± 0.01	3.1	-	2.7	2.2	P	1.6
M. clavus	Munheon 033112B	0.39	0.38	0.37	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.0	4.1	C	2.2
	CZ114E	0.38	0.38	0.38	-	-	0.4 ± 0.00	0.4	-	4.1	4.4	C	2.0
	CZ212W	0.41	0.42	0.42	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	2.4	2.2	C	2.7
M. pumilio var. *dispersa*	CZ121K	0.22	0.22	0.22	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	5.4	5.0	C	1.9
	CZ154H	0.15	0.15	0.15	-	-	0.2 ± 0.00	0.1	-	5.4	5.8	C	2.0
	CZ121L	0.19	0.21	0.20	0.20	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	4.1	4.0	C	2.3
	CZ120G	0.22	0.22	0.23	-	-	0.2 ± 0.01	0.2	-	4.6	4.3	C	2.0
M. punctifera	CZ95D	2.85	2.78	2.84	-	-	2.8 ± 0.04	2.8	-	2.7	2.6	C	3.8
M. rasilis	CZ38X	1.35	-	-	-	-	1.4	1.3	-	3.0	3.0	S	2.9
	D01D	1.46	1.52	1.45	-	-	1.5 ± 0.03	1.4	-	2.7	2.6	S	2.7
M. scrobiculata	A12_221	0.12	0.12	0.12	-	-	0.1 ± 0.00	0.1	-	4.9	4.1	C	2.3
M. schwemmlei	CZ33F	1.12	1.11	-	-	-	1.1 ± 0.01	1.1	-	3.2	3.2	S	3.4
	CZ33J	1.03	1.01	-	-	-	1.0 ± 0.01	1.0	pík1	3.3	3.3	S	2.7
	CZ33J	1.19	1.19	-	-	-	1.2 ± 0.00	1.2	pík2	2.9	2.9	S	2.7
M. silvicola	CZ157C	0.41	0.42	0.40	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	4.1	4.1	C	2.3
	CZ157E	0.42	0.43	0.41	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	-	3.6	3.8	C	2.3
	CZ159A	0.42	-	-	-	-	0.4	0.4	-	1.7	1.7	C	2.4
	CZ161C	0.40	0.40	0.40	-	-	0.4 ± 0.00	0.4	-	2.7	2.2	C	1.9
M. splendens	CCMP1782	1.88	1.91	1.88	-	-	1.9 ± 0.02	1.8	-	1.7	1.8	C	2.4
	AU07B	1.95	1.96	1.98	-	-	2.0 ± 0.02	1.9	-	2.5	2.5	C	2.2
M. striata var. *serrata*	CA03B	0.34	0.34	0.34	-	-	0.3 ± 0.00	0.3	-	3.2	3.6	C	2.2

	US29B	0.35	0.35	0.35	0.34	-	0.3 ± 0.01	0.3	-	2.3	2.2	C	2.4
M. striata var. *striata*	CZ12D	2.18	2.16	2.15	-	-	2.2 ± 0.01	2.1	-	3.3	3.4	C	4.5
	CZ04D	1.84	1.83	-	-	-	1.8 ± 0.00	1.8	-	2.2	2.6	C	2.8
	CZ33H	2.59	2.61	2.57	-	-	2.6 ± 0.02	2.5	-	2.4	2.4	C	3.5
	CZ71B	4.43	4.58	4.42	-	-	4.5 ± 0.09	4.4	-	3.2	3.3	P	3.3
	CZ154D	4.09	4.26	-	-	-	4.2 ± 0.12	4.1	-	5.5	5.5	P	4.8
M. tirolensis	CZ71E	0.17	0.17	0.16	-	-	0.2 ± 0.00	0.2	-	3.9	3.9	C	1.4
M. tonsurata	CZ12A	0.87	0.85	0.85	-	-	0.9 ± 0.01	0.8	-	2.3	2.4	S	1.8
	CZ09B	0.93	0.94	0.92	-	-	0.9 ± 0.01	0.9	-	3.1	3.4	S	2.7
	CZ32F	0.83	0.86	0.87	-	-	0.9 ± 0.02	0.8	-	3.7	3.6	S	3.6
M. torquata	CZ132E	0.51	0.51	0.49	-	-	0.5 ± 0.01	0.5	pík1	2.8	2.8	C	1.4
	CZ132E	0.74	0.74	0.80	-	-	0.8 ± 0.04	0.7	pík2	2.8	2.9	C	2.7
M. transsylvanica	CZ46F	2.38	2.23	2.32	2.41	-	2.3 ± 0.08	2.3	-	2.2	2.1	C	3.1
	CZ50B	1.75	1.59	1.73	1.58	-	1.7 ± 0.09	1.6	-	3.4	3.2	S	2.9
	CZ88A	2.57	2.58	2.33	2.40	-	2.5 ± 0.13	2.4	-	2.6	2.7	C	2.7
M. tubulosa	HU04C	0.41	0.40	0.39	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	pík1	1.8	1.8	C	2.4
	HU04C	0.43	0.44	0.42	-	-	0.4 ± 0.01	0.4	pík2	2.0	2.3	C	2.4

Příloha6: Souhrn naměřených velikostí genomů pro 165 kmenů rodu *Mallomonas*. Standardy jsou uvedeny pomocí zkratek „C“ = *Carex acutiformis*, „P“ = *Pisum sativum* cv. Ctirad, „S“ = *Solanum pseudocapsicum.* Jako „pík1“ je označován G_1 *Mallomonas* s nižší intenzitou fluorescence a jako „pík2“ dodatečný pík *Mallomonas* s vyšší intenzitou fluorescence