

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra botaniky



bakalářská práce

# Diverzita a biogeografie protistních organismů

David Ryšánek

Praha 2010

školitel:  
Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

---

## **ABSTRAKT**

Předložená bakalářská práce sestává ze dvou částí. První částí je literární rešerše, druhou částí je pak praktická kapitola, která obsahuje výsledky mého vlastního výzkumu.

V první části mé bakalářské práce se věnuji literární rešerši, ve které se zabývám dvěma současnými názory na biodiverzitu a biogeografii protist. První hypotézou je model ubikvitního rozšíření, který popisuji v několika bodech a ilustruji několika příklady. Podobně jsem představil i druhou teorii umírněného ubikvitního modelu. V závěru oba modely srovnávám a poukazuji na výhody a nevýhody jednotlivých teorií.

Ve druhé části své bakalářské práce stručně charakterizuji rod *Klebsormidium* a následně popisuji optimalizaci molekulárních metod, které mi umožní studium biodiverzity a biogeografie tohoto rodu v rámci mé diplomové práce.

**Klíčová slova:** abundance, biogeografie, diverzita, *Klebsormidium*, protista

## **ABSTRACT**

My bachelor thesis consists of two parts. The first part is a literature review, the second part is a practical one, which contains the results of my own research.

The first part of my thesis is devoted to the literature review, dealing with two current views on biodiversity and biogeography of protists. The first theory, model of protist ubiquity is described in a few points and illustrated by several examples. Likewise is presented the second hypothesis of moderate endemism model. In conclusion, both models are compared and advantages and disadvantages of each theory are pointed out.

In the second part of this thesis I briefly describe the genus *Klebsormidium*, which is followed by an optimization of molecular methods to study biodiversity and biogeography of this genus.

**Keywords:** abundance, biogeography, diversity, *Klebsormidium*, protists

## Obsah

I.	Úvod.....	5
II.	Literární rešerše.....	5
1.	Protista.....	5
2.	Ubikvitní model.....	6
2.1.	Historie .....	6
2.2.	Teorie ubikvitního rozšíření mikroorganismů .....	7
2.2.1.	Abundance.....	7
2.2.2.	Velikost .....	8
2.2.3.	Náhodné roširování .....	9
2.2.4.	Lokální/globální diverzita .....	9
2.2.5.	Úsilí při hledání a kultivace .....	10
2.2.6.	Vzácnost a undersampling .....	11
2.2.7.	Specialisti a generalisti.....	11
2.3.	Příklady.....	12
3.	Umírněný ubikvitní model .....	14
3.1.	„Undersampling“ .....	14
3.2.	Lidská introdukce .....	15
3.3.	Vlajkové druhy: hlavní důkaz endemismu .....	15
3.4.	Lokální vs. globální diverzity .....	16
3.5.	Cysty jako hlavní prvek umožňující rozširování .....	16
3.6.	Hlavní vady ubikvitního modelu .....	17
3.7.	Příklady.....	19
4.	Shrnutí .....	22
III.	Praktická část.....	24
1.	Úvod .....	24
2.	Charakteristika rodu Klebsormidium .....	24
3.	Optimalizace metod.....	25
3.1.	Úvod do metodiky .....	25
3.2.	Materiál a metody.....	25
3.2.1.	Použité přístroje a materiál.....	25
3.2.2.	Získání vzorků, izolace, kultivace.....	26
3.2.3.	Kmeny .....	26

3.2.4.	Izolace DNA.....	27
3.2.5.	Měření koncentrace DNA .....	27
3.2.6.	PCR .....	28
3.2.7.	Příprava gelu, elektroforéza, focení gelu .....	30
3.2.8.	Sekvenace.....	31
3.3.	Výsledky.....	31
3.3.1.	Koncentrace DNA .....	31
3.3.2.	PCR .....	32
4.	Shrnutí .....	34
IV.	Závěr.....	35
V.	Poděkování.....	36
VI.	Literatura.....	37

## I. Úvod

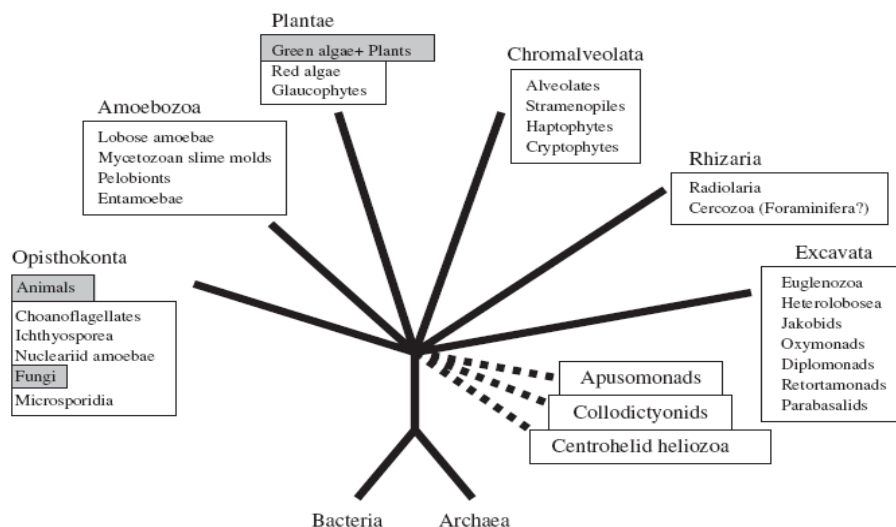
Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky a úvahy o diverzitě a biogeografii protistních organismů. Hlavní část je věnována dvěma rozdílným teoriím. Nejdříve jsem se zaměřil na ubikvitní model, který prosazuje kosmopolitní rozšíření většiny volně žijících protist, a potom na umírněný ubikvitní model, který naopak poukazuje na to, že protista mají biogeografii, a že geografické bariéry měly vliv na jejich rozšíření. V závěru jsem tyto dva modely porovnal a vlastními myšlenkami shrnul danou problematiku.

Součástí bakalářské práce je i praktická část, která by měla posloužit jako základ pro diplomovou práci. Jejím cílem je optimalizace molekulárních metod pro výzkum biodiverzity rodu *Klebsormidium*, zejména pak izolace DNA z kultur a amplifikace genu velké podjednotky RUBISCO (*rbcL*) pomocí PCR.

## II. Literární rešerše

### 1. Protista

Protista, jako říši primitivních forem eukaryot a prokaryot, použil již v roce 1866 Ernst Haeckel ve svém systému tří říší, který obsahoval mimo zmiňovaných protist ještě rostliny a zvířata. Na tento systém navázal Whittaker (1969), který přišel s novým, rozšířeným uspořádáním organismů do pěti říší: Monera, Protista, Plantae, Fungi a Animalia. V tomto systému Protista zahrnovala pouze mikroskopické eukaryotní organismy. Významný zlom v tomto tradičním uspořádání přinesla molekulární fylogenetika. Tento nový přístup přinesl nový pohled, jak na evoluci eukaryotních organismů, tak na uspořádání jednotlivých taxonů uvnitř této diversní skupiny (Adl a kol. 2005), na jejímž základě vznikl současný fylogenetický strom eukaryot (obr. II. 1). V současné době se termín Protista používá k označení nejrozličnějších eukaryotních mikroorganismů, které jsou jednobuněčné nebo mnohobuněčné bez specializovaných tkání.



Obrázek II. 1. Protistní fylogenetický strom

Současné odhady diverzity volně žijících protist se značně liší. Finlay (2002) odhaduje počet všech volně žijících protist v rozsahu od 10 000 do 20 000, zatímco Foissner (1999, 2008) odhaduje počet pouze jedné skupiny nálevníků na 30 000 druhů a celkový počet všech protistních druhů až na 300 tisíc.

## 2. Ubikvitní model

Prosazuje názor, že všechno je všude, a proto většina volně žijících protist má kosmopolitní rozšíření. To je hlavně ovlivněno jejich malou velikostí a velkou abundancí.

### 2.1. Historie

První známou studií, která poukazuje na ubikvitní rozšíření mikroorganismů, je pravděpodobně práce W. H. Maskella (1887), který zjistil, že ciliátní druhy žijící ve sladké vodě na Novém Zélandu jsou značně identické s těmi druhy, které jsou známé z Evropy.

Myšlenku všudypřítomnosti mikroorganismů dále rozšířili M. W. Beijerinck a S. Winogradsky, kteří jsou autory originální teze „všechno je všude“. K tomuto zjištění došli při studiu bakterií, za použití jimi vyvinuté techniky kultivace se specificky obohacenými kultivačními médii, která jim umožnila získat z přírodního vzorku i ty organismy, které se vyskytují v extrémně nízkém počtu. Beijerinck studoval mikrobiální biotu v různých horkých pramenech, které od sebe dělila velká vzdálenost, a zjistil, že na podobném typu lokality se

vyskytovali stejné typy mikroorganismů. To ho vedlo k závěru, že značná část diverzity mikrobů musí být všudypřítomná, a že nemají biogeografii.

Významný dánský mikrobiolog Lourens Baas-Becking pokračoval v rozvíjení teorií o biogeografii mikrobů. Zabýval se výzkumem mikroorganismů ve slaných jezerech, výsledky pak srovnal s jinými jezery z celého světa. Na základě tohoto pozorování zjistil, že určité organismy, které jsou vysoce adaptované na toto prostředí (např. řasa *Dunaliella viridis*) byly nalezeny také v jiných slaných jezerech, a to v poměrně vysoké početnosti. Po srovnání svých objevů s dřívější prací Beijerincka a Winogradského se nakonec v roce 1934 rozhodl definovat dva obecné zákony. První zákon, který byl formulován pouze pro mikroorganismy „všechno je všude“, poukazuje na fakt, že bariéry na lokálním a globálním měřítku nehrají zásadní roli při jejich rozšiřování. Druhý zákon, „limitující je pouze prostředí“, se vztahuje na všechny organismy.

## **2.2. Teorie ubikvitního rozšíření mikroorganismů**

Na předchozí práce navázali především Finlay a Fenchel, kteří dále pokračovali v prosazování názoru „všechno je všude, limitující je pouze prostředí“, Finlay a kol. (1996, 2004) publikovali ubikvitní teorii, která vysvětluje náhodné rozšiřování díky velké absolutní velikosti populace a malé velikosti organismu. S podobnou myšlenkou přišel i Fenchel (1993) poukazující na to, že rozsáhlé rozšiřování všech volně žijících mikroskopických eukaryotních druhů je řízeno stejnými biologickými a fyzickými procesy, protože všechny druhy mají dostatečně velkou abundanci a z toho plynoucí ubikvitní rozšíření. Tyto dva klíčové faktory (tj. velké populace a malá velikost organismů) vysvětlují rozsáhlé rozšíření aktivních populací volně žijících mikroskopických druhů na vhodné habitaty.

### **2.2.1. Abundance**

Velká abundance mikrobiálních druhů je významná a důležitá v tom, že rozšiřování je vzácně omezeno geografickými bariérami (Finlay 2002) a je řízeno nepravděpodobnými událostmi (jako je transport na nohách vodních ptáků, mokré kožešiny zvířat, atd.) (Fenchel a Finlay 2004), a že lokální vymírání je vzácné. Pokles velikosti populace může být způsobeno biotickými interakcemi, jako je např. kompetice, která se v případě protist asymptotně blíží k nule, a eventuální vymírání závisí na náhodných událostech. Proto pokles velikosti populace

vzácně vede k totálnímu vymizení populací, které byly původně značně velké (Fenchel a Finlay 2004).

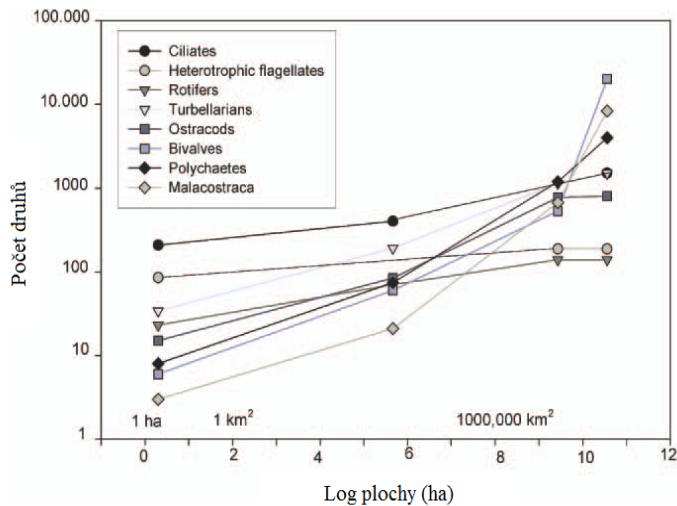
Početnost jednotlivých skupin dokumentují Fenchel a Finlay (2004) v jejich práci, kdy jeden mililitr jezerní vody nebo mořské obsahuje přibližně  $10^6$  bakterií,  $10^3$  protist a možná 10 organismů zooplanktonu. V sedimentu, tento počet může být několikanásobně větší a to dokonce až 100 násobně. Odhadovaný počet organismů v celém rybníku, Priest Pot ve Velké Británii, o rozloze 1 ha a hloubce 10 metrů může být až  $10^{18}$  u bakterií,  $10^{16}$  u protist a  $10^{11}$  u malých zvířat. Tato data potvrzují obecně uznávané pravidlo, že hustota druhů v populaci je opačná k velikosti organismu.

### **2.2.2. Velikost**

Další důsledkem ubikvitního rozšíření protist je jejich malá velikost. Malé organismy, které mají méně než 1 mm, mají tendenci být kosmopolitně rozšířeny (Fenchel a Finlay 2004). K tomuto závěru došli Fenchel a Finlay (2004) na základě intenzivního výzkumu eukaryotních organismů na jednom hektaru rybníku (Priest Pot, Velká Británie) a na dvou hektarech mělkého moře (Niva Bay, Dánsko). Analýza dat ukázala, že většina organismů měřící méně než 1 mm, jak v případě protist, tak metazoi projevovala kosmopolitní rozšíření (Obr. II. 2.). V obou studovaných místech seznam druhů poukazoval na vztah, kdy se zvyšujícím se počtem kosmopolitních druhů se snižuje velikost organismů.

Získaná data ze dvou hektarů Niva Bay mimo jiné porovnali s daty s oblastmi: Kiel Bight ( $4,6 \cdot 10^3$  ha), evropskými moři (zahrnující Středozevní, Baltské, Černé a Barentsovo moře, dohromady s rozlohou okolo  $2,7 \cdot 10^9$  ha) a světovým oceánem ( $3,6 \cdot 10^3$  ha), aby zjistili, jak spolu souvisí velikost plochy s počtem druhů u vybraných skupin. Výsledek závislosti druhů na ploše dokumentuje graf (Obr. II. 2.), kde u mořských skupin organismů se křivka zplošťuje v závislosti na snižující se velikosti těla.





Obrázek II. 2. Graf závislost počtu druhů na ploše

### 2.2.3. Náhodné roširování

Rozširování protistních druhů je řízeno náhodnými procesy, jako jsou hurikány, cirkulace oceánských proudů, migrace ptáků nebo mokrá kožešina zvířat, který jsou ovlivněny velkou abundancí populací a malou velikostí organismů. Všeobecně se předpokládá, že hranice, kdy malá velikost organismu má ještě vliv na náhodné rozširování je v rozmezí 1-10 mm (May 1988; Lawton 1998). Rychlost a míra rozširování je ovlivněna velikostí populace, proto abundantní druhy mají vyšší rychlost rozširování než méně početné populace. Velikost populace v případě protist je tak obrovská, že jen ze statistických důvodů je velmi pravděpodobné, že nějakí jedinci z dané populace se dostanou na jiné místo (Finlay a kol. 2002, 2004).

### 2.2.4. Lokální/globální diverzita

Kosmopolitní rozšíření je typické pro většinu mikrobiálních eukaryot, a proto lze z toho usuzovat, že budou mít relativně nízkou globální druhovou diverzitu. Je to zapříčiněno také tím, že makroorganismy mají vůči protistům endemické druhy, které jsou zodpovědné za velkou globální diverzitu. Naproti tomu protista mají díky ubikvitnímu rozšíření vyšší lokální diverzitu než ostatní eukaryota. Lokální diverzita primárně závisí na imigraci a vymírání druhů v populaci (MacArthur a Wilson 1967), kromě toho taky na mezidruhové interakci, jako je kompetice a predace. Tyto myšlenky jsou podpořeny několika příklady.

V již dříve zmíněné studii Fenchela a Finlaye (2003), kde mimo jiné srovnali lokální a globální diverzitu, autoři zjistili, že počet druhů mořských mlžů a plžů na dvou hektarech

mělkého moře Niva Bay (Dánsko) představuje méně než 0,1 % celkového počtu mořských druhů, zatímco počet ciliátních druhů tady představuje více než 10 % všech mořských druhů. Dalším příkladem je srovnání volně žijících nálevníků s hmyzem. Volně žijící nálevníci s přibližně 3000 druhy (Finlay a kol. 1996), jsou relativně málo početní v porovnání s 5 miliony druhy hmyzu (Gaston 1993). Rozdíl je způsoben tím, že na podobných nikách v geograficky izolovaných regionech světa se nacházejí nejrůznější druhy, které v mnoha případech se vyvinuly právě v té určité oblasti, a proto nejsou nalézány nikde jinde.

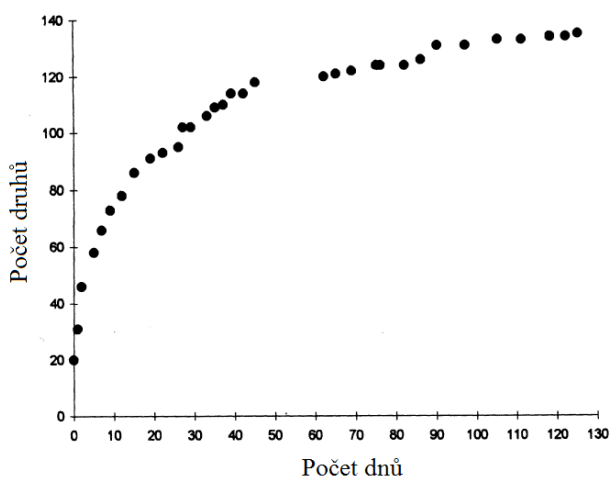
### **2.2.5. Úsilí při hledání a kultivace**

Pro odhalení druhové diverzity určitého místa je zapotřebí provést důkladný odběr dané lokality a následně pomocí mikroskopu intenzivně prozkoumat jednotlivé vzorky a také použít různorodé kultivační metody. Tuto důležitost ilustrují následující příklady.

Fenchel a kol. (1997) studovali počet ciliátů na 1 cm<sup>2</sup> rybničního sedimentu a našli přibližně 1000 jedinců představujících 20 druhů. Další vzorky sedimentu sebrané v blízkosti prvního vzorku byly potom vystaveny rozdílným kultivačním podmínkám (např. přidání rozdílných potenciálních potravních složek, vyschnutí a následující zamokření a další faktory). Během několika týdnů, takto získali dalších 110 druhů. Celkový počet 130 druhů takto zaznamenaných na několika čtverečních centimetrech povrchu sedimentu korespondoval s 50 procenty všech druhů nalezených v rybníku a okolo 8 % všech pojmenovaných sladkovodních ciliátů. Mimo jiné to ukázalo, že semenná banka druhů byla velká. Podobně Person (2002) zaznamenal ve 100 ml sedimentu okolo 25 % všech známých planktonních obrněnek a rozsivek v moři podél západního pobřeží Švédska (Skagerrak a Kattegat).

Na základě těchto dat Fenchel a Finlay (2004) navrhuje, že vysoká rychlost šíření a nízká rychlost vymírání vede k situaci, kdy všechno je všude, a že nalézání druhů na daném habitatu je ovlivněno pouze jeho vlastnostmi, a nikoli historickými faktory.

Velká část z celkového počtu druhů, která může být nalezena na určitém místě, je ovlivněna zejména úsilím při prohlížení jednotlivých vzorků. V jedné z nedávných studií Finlay a Clarke (1999) zkoumali 0,1 cm<sup>2</sup> sedimentu ze sladkovodního rybníka Priest Pot (Velká Británie) více než 700 hodin pomocí elektronového mikroskopu a našli 78 % druhů z celkového počtu všech popsanych v rodu *Paraphysomonas*, jak ilustruje (Obr. II. 3.). Všechny druhy lze jednoduše identifikovat na základě morfologie povrchu jejich šupin.



Obrázek II. 3. Zvyšující se počet druhů v závislosti na délce zkoumání

### 2.2.6. Vzácnost a undersampling

Vzácnost je převážně relativní pojem, který je silně ovlivněn velikostí organismu. Například populace makroorganismů čítající jeden milion jedinců v rybníku o rozloze jednoho hektaru, nebude nikdy považována za vzácný, ale pokud se jedná o protistní populaci o jednom milionu jedinců, nebude pravděpodobně nikdy nalezena na dané lokalitě. To vysvětluje, proč mohou být některé druhy izolovány z habitatů, na kterých nikdy nebyly předtím nalezeny. Undersampling je pro většinu relativně vzácných protistních druhů nevyhnutelný problém, kdy při použití typických odběrových procedur se často stává, že málo početný druh není pokaždé nalezen, což vede k závěru, že daný druh je endemitní (Finlay a kol. 1998).

Problémem je to, že je velmi obtížné detekovat všechny mikrobiální druhy přítomné v nějakém přírodním vzorku. Například, Fenchel a kol. (1997) ukázali, že pouze 15 % druhů nálevníků přítomných ve vzorku sedimentu může být nalezeno pomocí světelného mikroskopu. A také je relativně jednoduché nalézt ty druhy, které jsou zrovna v populačním růstu, problém však nastává, pokud jsou dané podmínky nevyhovující a organismy jsou v dormantním stavu. Díky tomu je možné, že lokální diverzita je daleko vyšší než se předpokládá.

### 2.2.7. Specialisti a generalisti

Organismy se liší ve svém stupni specializace a všechny jsou v nějakém rozsahu omezeny na určité typy habitatů. Některá protista rostou v úzkém rozmezí ekologických

faktorů (tj. například teplota, pH, dostupnost živin), takové organismy se označují jako specialisti. Ty se často vyskytují většinou jen na několika lokalitách v malých populacích, což jednak způsobuje problémy při jejich detekci a taky to vede často k závěru, že mají geograficky omezené rozšíření. Příkladem specialisty je velký sladkovodní nálevník *Neobursaridium gigas*, který roste pouze v teplotním rozsahu od 22 °C do 29 °C, proto se vyskytuje pouze v tropických oblastech Afriky, Jižní Ameriky a jihovýchodní Asii (Dragesco 1968).

Naproti tomu generalisti mají širokou ekologickou toleranci, a tím pádem snadněji nalézají vhodné habitaty, na kterých obvykle dominují. To umožňuje jejich snadné nalezení a potvrzení jejich ubikvitního rozšíření. Proto ty druhy, které jsou lokálně vzácné nebo abundantní jsou pravděpodobně také vzácné nebo ubikvitní globálně (Finlay a kol 2002).

### 2.3. Příklady

Recentní studie na různých skupinách protistních organismů podporují kosmopolitní rozšíření jednotlivých druhů, a tím podporují ubikvitní model.

#### a) Bakterie a sinice

Staley a Gosink (1999) ukázali pouze na rodové úrovni bakterií, že členové rodů se vyskytují jak v Antarktidě, tak v Arktidě.

Garcia-Pichel a kol. (1996) zjistili, že sinice *Microcoleus chthonoplastes* je kosmopolitní druh.

#### b) Bičíkovci

Při studiu „morphospecies“ bičíkovců se prokázalo, že nemají biogeografii (Patterson a Lee 2000), protože společenstva ze sousedních lokalit si nejsou vzájemně podobnější, než když jsou ze vzdálenějších míst. Stejný genotyp bičíkovců byl izolován z mělkého vnitrozemního fjordu v Dánsku a z hydrotermálního průduchu v Pacifiku (Atkins a kol. 2000).

#### c) Foraminifera

Stejně planktonní „morphospecies“ foraminifera jsou běžná, jak ve vodách kolem Arktidy, tak kolem Antarktidy a některá z nich jsou také geneticky identická (Darling 2000).

#### d) Nálevníci

Finlay a Clarke (1999) se zaměřili ve své práci na rod *Paraphysomonas*, kdy v detailním průzkumu 25,2 µl sedimentu z rybníka Priest Pot (Velká Británie) našli a

určili na základě morfologie šupin 32 druhů. Získaná data srovnali s publikacemi obsahující druhy *Paraphysomonas* nalezený v rozdílných geografických oblastech. Celkový počet zaznamenaných druhů byl 41, což znamená, že našli 78 % všech do té doby popsanych druhů tohoto rodu.

Když všech 86 sladkovodních „morphospecies“ nálevníků bylo identifikováno v jezeru v kráteru sopky v Austrálii koncem 90. let 20. století, zjistilo se, že jsou již dávno známy ze Severní Evropy z 30. let 20. století (Finlay a kol. 1999, 2000).

Finlay a kol. (2006) studovali „morphospecies“ *Cyclidium glaucoma*, který se vyskytuje ve sladkovodních, brakických, mořských a hypersalinních habitatech. Použili 54 kmenů z osmi míst světa (tj. Argentina, Peru, Maroko, Rusko, Ukrajina, Dánsko, Austrálie a Španělsko), u kterých osekvenovali geny pro malou ribosomální podjednotku (SSU rRNA) a velkou ribosomální podjednotku (LSU rRNA). Zjistili, že stejné ribotypy se vyskytují na většině lokalit a že různé ribotypy spadají do clusteru, který se vyznačuje stejnými ekologickými nároky.

#### e) **Prasinophyceae**

Jan Šlapeta (2006) izoloval mořskou picoeukaryotní řasu (~2μm), *Micromonas pusilla*, která byla sebrána z celého světa. Nezávislé a kombinované fylogenetické analýzy ukázaly, že tento tradiční jednotný „morphospecies“ aktuálně zahrnuje několik nezávislých linií, které jsou v oceánu ubikvitní. Nicméně zatímco některé linie jsou blízké příbuzné, jiné jsou ze vzdálených clusteru, odhalující existenci kryptických druhů. Výsledky ilustrují, že globální rozšíření picoeukaryot je v oceánu možné, ale neznamená to redukci počtu druhů. Naopak ukazuje, že „morphospecies“ koncept je nevyhovující, protože přehlíží velkou genetickou diverzitu a pravděpodobně vede k nekorektním biologickým představám.

#### f) **Chrysophyceae**

Boenigk a kol. (2005) izolovali 28 linií „Spumella-like“ bičíkovce z různých sladkovodních a půdních habitatů v Rakousku, Číně, Nepálu, Novém Zélandu, Ugandě, Keně, Tanzanii a Havaii. Na základě použití sekvence genu malé ribosomální podjednotky RNA (SSU rRNA), došli k závěru, že „Spumella-like“ bičíkovci jsou velmi diverzifikovanou skupinou, o které se zatím uvažuje, jako o skupině, která není geograficky omezená.

### **g) Obrněnky**

Původně byla obrněnka *Polarella glacialis* zaznamenána pouze z Antarktidy (Montresor a kol. 1999), ale Montresor a kol. (2003) našli tento druh také v Arktidě v Kanadě, což bylo potvrzeno jak na základě morfologie tak molekulárně (SSU rDNA). Což svědčí o jejich bipolárním rozšíření.

## **3. Umírněný ubikvitní model**

Připouští, že velká část protist mají kosmopolitní rozšíření, ale poukazuje hlavně na to, že i mikroskopické organismy mají biogeografii, a že geografické bariéry měly vliv na jejich rozšíření.

Hlavním zastáncem umírněného ubikvitního modelu je Foissner (1999, 2006), který sice souhlasí s tím, že velká část druhů protist je kosmopolitní, ale že se vyskytují i endemické druhy. Významnými důvody, proč se chybně předpokládá, že protista jsou kosmopolitní, jsou „undersamplig“ a vliv člověka.

### **3.1. „Undersampling“**

Hlavní problém, který neumožňuje získat odpovídající data o diverzitě a biogeografii protist, je „undersampling“. Ten je ovlivněn několika faktory: (a) malou velikostí protist, (b) tvorbou dormantních stádií (cysty, spory), (c) kultivací a (d) chybným určením, proto je obvykle nalezena jen malá část protistních organismů.

- (a) Malá velikost komplikuje provedení důkladného výzkumu, jak z fyzických, tak technických důvodů, protože obvykle z dané lokality je sebrána jen malá část (např. jen několik mililitrů vody nebo centimetrů čtverečních sedimentu z rybníka) a při následném prohlédnutí je nezbytné, použít světelný mikroskop a u některých skupin (např. Chrasophyceae) elektronový mikroskop. Tímto způsobem je pravděpodobně nemožné získat a následně zaznamenat všechny mikroorganismy, protože dochází již při odběru k nesebrání méně početných organismů a následně k přehlédnutí vzácnějších druhů.
- (b) Při odběru se často stává, že ani typické organismy pro daný habitat nejsou nalezeny. To je způsobeno tím, že v daném období jsou aktivní jen někteří mikroorganismy, a že většina je v dormantním stádiu. I když se v sedimentu najdou rezistentní cysty, často se stává, že daný organismus nelze určit do druhu.

(c) Ani použití různých kultivačních metod nemusí vést k získání méně početných druhů, protože na určitých médiích rostou jen některé druhy, a taky je pravděpodobné, že velmi abundantní druhy z enviromentálních vzorků budou také početnější v kultivačních médiích, kde zastíní vzácnější druhy. Pomocí kultivace podle Cohan (2002) lze získat méně než 10 % bakterií, z toho plyne, že více než 90 % nelze kultivovat a detailně studovat.

(d) Dalším problémem je chybné určení taxonu, což se stává relativně běžně (Foissner 1987, 1998; Alongi a kol. 2002). Dochází k zanedbávání vzácných a velmi vzácných druhů z důvodu malého počtu jedinců, který často znemožňuje určení do druhu.

Undersamplig je stejně vážný problém i u větších organizmů, jako jsou ryby a savci (Kodric-Brown a Brown 1993).

### 3.2. Lidská introdukce

Foissner (1999, 2006) poukázal na vliv člověka, který způsobil a působí změny v biogeografickém rozšíření jak rostlin a živočichů, tak protist. Hlavními příčinami změn je používání vody jako zátěž lodí, transport zboží a konstrukce kanálů. Hallegraeff a Bolch (1992) a Hülsmann a Galil (2002) předpokládají, že používání zátěžové vody v lodích od poloviny 19. století vedlo k tomu, že mnoho protist má nyní kosmopolitní rozšíření. Zátěžová voda v lodích může být odpovědná za výskyt čtyř euryhalinních psamnobiontických druhů krytének (Arcellinida) ve Velkých jezerech v Kanadě (Nicholls a MacIsaac 2004). Příkladem výskytu mikroorganismů na nepůvodních lokalitách, který byl způsoben transportem zboží, je zavlečení velmi dobře rozpoznatelné řasy *Hydrodictyon* na Nový Zéland, kde tato velmi výrazná řasa nebyla předtím spatřena. Bylo to způsobeno dodáváním ryb a vodních rostlin z východní Asie (Kristiansen 1996). Dalším příkladem je vybudování kanálů, které měly vliv na rozšíření několika tropických a indopacifických druhů foraminifera, které se dostaly do Středozemního moře přes Suezský kanál a pravděpodobně i některé toxické obrněnky (Hallegraeff a Bolch 1992).

### 3.3. Vlajkové druhy: hlavní důkaz endemismu

Druhy s nápadnou velikostí, morfologií nebo barvou jsou nazývány vlajkové taxony. V České republice je vlajkovým druhem například roháč obecný, je to druh, který každý pozná, společnost všeobecně zajímá a často se stává hlavním důvodem ochranných aktivit.

Podobné je to i s mikroorganismy, kdy vlajkový taxon je snadno poznatelný. Vlajkové druhy často umožňují zjištění jejich biogeografie. Tyler (1996) to shrnul úvahou, proč právě vlajkové taxony mají největší pravděpodobnost mít pravý endemismus: „Protože díky tomu, že jsou tak výrazné, je nepravděpodobné, aby takové druhy byly běžně přehlíženy, což umožňuje zjistit jejich rozšíření“.

Mnohem více vlajkových druhů je známo z řas než z heterotrofních protist (Foissner 2006), protože řasy jsou svým zbarvením a tvarem často mnohem nápadnější (např. krásivky) než ostatní protista, a také protože se v minulosti jimi zabývalo mnohem více vědců. Proto je relativně jednoduché najít nové vlajkové druhy mezi nálevníky, hlavně v Africe a Jižní Americe a také v mořských habitatech.

### **3.4. Lokální vs. globální diverzity**

V konzervativní biologii je poměr lokální:globální diverzity tradičním měřítkem druhové bohatosti organismů, ale v případě mikroorganismů může být tento poměr často chybný, protože globální diverzita je zatím málo známa. Tento problém ilustruje následující příklad. Foissner (2000) zaznamenal 270 druhů pouze v Německu, to porovnal s daty z roku 1987, kdy bylo známo globálně 250 druhů půdních nálevníků (Foissner 1987), což by znamenalo, že víc než 100 % globální diversity by se vyskytovalo v Německu. Dnes, kdy je popsáno přibližně 800 druhů půdních nálevníků (Foissner a kol. 2002), se procento snížilo na 34 %. Pokud by se navíc připočítalo dalších 500 nepopsaných druhů, které jsou v záznamech Foissnera (1998), procento by se snížilo až na 23 %. Nakonec, když se použil velmi konzervativní odhad 2000 druhů půdních nálevníků v těchto počtech (Foissner 1997b; Chao a kol. 2006), poměr lokální:globální diversity se nakonec dostal až na hodnotu 14 procent, což už je srovnatelný s vyššími organismy.

### **3.5. Cysty jako hlavní prvek umožňující rozšiřování**

Mnoho mikroorganismů žijící v terestrických a limnických habitatech, často produkuje dormantní stádia nazývaná spory, stomatocysty nebo cysty. Cysty, jak se všeobecně předpokládá, jsou hlavním prvkem umožňující rozšiřování jednobuněčných organismů, protože zůstávají životaschopné po dlouhou dobu, pod vlivem různých nepříznivých podmínek, jako je sucho a chladno (Corliss a Esser 1974; Foissner 1987).



Nicméně cysty mají velmi rozdílné vlastnosti, závislé na oblasti a habitatu, ve kterém vznikly. Nálevníci a bičíkovci tvoří v extrémních habitatech cysty odolné vůči vyschnutí a zmrznutí, které jsou životaschopné po několik let (Foissner 1996, Foissner a kol. 2002), ale většina z nich produkuje v půdě deštného lesa cysty, které jsou životaschopné pouze několik měsíců (Foissner 1997a). Podobně cysty z laboratorních kultur jsou často mnohem méně životaschopné než ty z environmentálních vzorků a druhy často ztrácejí schopnost produkovat cysty při déletrvajících laboratorních kultivacích (Corliss a Esser 1974; Foissner 1987, 1997a). Půda (a samozřejmě laboratorní kultury) ze stálezelených deštných lesů je nepatrně mokrá po většinu času, díky pravidelnému dešti a vysoké vzdušné vlhkosti. Proto většina protist je pravděpodobně permanentně aktivní a není nucena produkovat rezistentní dormantní stádia (Foissner 1997a). Proto tyto druhy mají malou šanci rozšířit životaschopné cysty na velkou vzdálenost. Tento fakt ve spojení s chybějící dobou ledovou může vést k výsledku, že endemitní druhy se častěji vyskytují v tropech než v temperátních oblastech.

Přesto všechny kosmopolitní protista netvoří cysty. Dobře známým příkladem jsou ciliátní komplexy *Paramecium aurelia* a *Tetrahymena pyriformis*, kde některé z příbuzných druhů jeví omezené rozšíření (Elliott 1973, Nanney a McCoy 1976, Sonneborn 1975).

### 3.6. Hlavní vady ubikvitního modelu

Foissner (2008) poukazuje na pět hlavních vad a nedostatků ubiquitní teorie, jako je (a) ignorace mimořádné možnosti protistů speciovat, protože mají krátkou generační dobu a schopnost mnoha mikroorganismů přežít po dlouhá geologická období, (b) velká abundance všech protistních druhů, (c) jejich malá velikost, která je příčinou jejich kosmopolitního rozšíření, (d) opomíjení literárních dat o výskytu druhů s omezeným výskytem, (e) a nakonec ignorace vlivu člověka na rozšíření protist, jak v minulosti, tak v současnosti, která již byla zmíněna v předešlém textu.

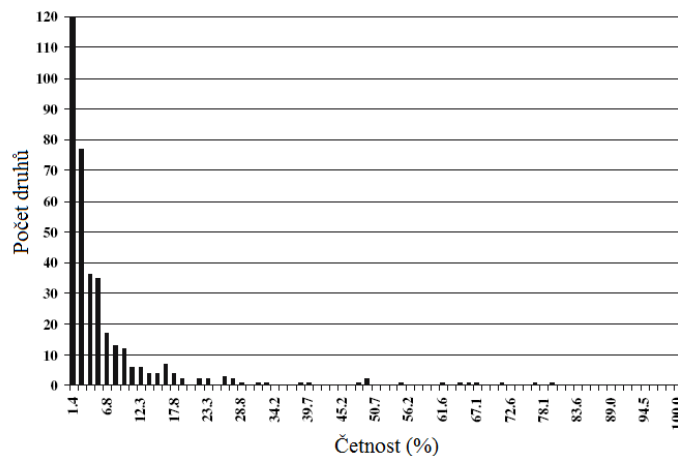
- a) Speciace je proces, který je více či méně stejný pro všechny organismy, to potvrzuje záznam protistních fosilií, který může být jak pomalý ( $10^6$  let), tak rychlý ( $10^3$  let) (Norris 2001).

Protista mají krátkou generační dobu, která podporuje vznik mutací a následnou speciaci, ačkoli genetická izolace je méně striktní než u většiny rostlin a živočichů díky jejich větší distribuci.

Vzhledem k tomu, že rostliny a zvířata mohou speciovat v 10-20 000 letech, například ryby v jezerech (Martens 1997) a rostliny a zvířata v postglaciálních oblastech (Schluter 1998), není tu důvod předpokládat, že by se protista chovala jinak, zejména vzhledem k jejich krátké generační době, proto lokální a regionální endemiti by se měli běžně vyskytovat. Bohužel tyto druhy jsou často buď nenápadné, anebo jsou těžko rozpoznatelné.

Protista mají pravděpodobně větší schopnost přežít velká vymírání v historii země lépe než větší organismy, což je způsobeno jejich menšími habitaty, díky tomu mohou nahromadit velkou diversitu po více než 100 miliónů let. Tato myšlenka není navrhována pouze na základě paleontologických dat, ale také je potvrzována recentními studiemi, poukazujícími na to, že mikroorganismy přežily v chladných refugiích během nepříznivých podmínek (Stoeck a kol. 2007).

- b) Když srovnáme rostliny a velká zvířata s protistními organismy, zjistíme, že jsou skutečně početnější, ale pouze v několika málo druzích, zatímco velká většina (asi 90 %) má malou nebo velmi nízkou abundanci jak ukazuje (Obr. II. 4.), jako je v případě rostlin a zvířat. To je zřejmé ze všech výzkumů, v kterých druhová diverzita a abundance jednotlivých druhů byla studována.



Obrázek II. 4. Četnost 365 druhů nálevníku v 73 vzorcích z terestrického habitatu v Namibii

- c) Kosmopolitní rozšíření protistů je často spojováno s jejich malou velikostí a velkým počtem (Fenchel 1993; Finlay a kol. 1996, 2006) a Wilkinson (2001) navrhl, že je to možné pouze pro organismy, které měří méně než 100  $\mu\text{m}$ . Nicméně je to vypracované na makrohoubách, mechách a kapradinách, přesto mnoho z nich má malé areály navzdory vhodným habitatům a malým sporám (<50  $\mu\text{m}$ ) produkovaných ve velkých počtech. Dále semena vyšších rostlin často mají malou velikost a speciální

morfologické adaptace pro rozšiřování vzduchem, ale nejsou kosmopolitní, i když mnoho z nich dobře roste v našich domácích zahradách, ačkoli se tu běžně nevyskytují. Je pozoruhodné, že morfologické adaptace pro rozšiřování větrem se nevyskytují u cyst a spor mikroorganismů, což vede k závěru, že tento druh rozšiřování nikdy nehrál důležitou roli.

- d) Generace taxonomistů poskytuje přesvědčivé evidence pro omezené rozšíření některých protistů, a to hlavně vlajkových druhů. Podobné důkazy protistního endemismu přináší v dnešní době mnoho vědců, což je dokumentováno několika příklady. Prvním příkladem je *Stentor araucanus*, až 300  $\mu\text{m}$  dlouhý, modro-zelený planktonní nálevník, který je častý v jihoamerických jezerech (Foissner a Wolf 1994). Druhým je *Maristentor dinoferus*, až 1 mm dlouhý, purpurový nálevník, který je běžný na korálových útesech Guam na Marina Islands v Pacifickém oceánu (Lobban a kol. 2002). A nakonec *Heterostentor coeruleus* 200-300  $\mu\text{m}$  dlouhý namodralý nálevník, byl objeven pouze v litorálu Potter Cove, King George Island v Antarktidě (Song a Wilbert 2002).

Ubikvitní model ignoruje všechny tyto evidované vady nebo zamítá data způsobená „undersampling“ a chybným určením taxonů (Mitchell a Meisterfeld 2005).

### 3.7. Příklady

Přehled jednotlivých studií, které podporují umírněný ubikvitní model.

#### a) Bakterie a sinice

Na základě molekulárních metod autoflorescence a multilokusové enzymové elektroforézy se zjistilo, že půdní bakterie, jako jsou *Pseudomonas* a *Rhizobium*, mají geograficky omezené rozšíření (Cho a Tiedje 2000; Souza a kol. 1992).

Whitaker a kol. (2003) studovali hypertermofilní rod *Sulfolobus* v odlišných oblastech světa (tj. Mutnovský vulkán a Uzon/Geyser údolí ve východním Rusku, Národní park Lassen vulkán a Yellowstonský Národní park v Severní Americe, a západní oblast Islandu). Na základě devíti chromosomálních lokusů ze 78 jedinců bylo zjištěno, že jednotlivé populace z různých míst jsou geneticky izolované a mají omezené geografické rozšíření.

Papke a kol. (2003) zkoumali sinice *Synechococcus* v horkých pramenech v Severní Americe, Japonsku, na Novém Zélandu a v Itálii. Na základě 16S rDNA zjistili, že (1) linie sebraná v Severní Americe se vyskytuje jen v této oblasti, (2) jeden „clade“ se

vyskytuje pouze v Japonsku, (3) některé linie jsou shodné jak pro Japonsko, tak Nový Zéland a (4) v Itálii *Synechococcus* nebyl nalezen.

#### **b) Cercozoa**

Bass a kol. (2007) studovali globální rozšíření cercomonád (*Eocercomonas* a *Paracercomonas*) pomocí rychle se vyvíjejícího markeru ITS1 rDNA a pro každou skupinu použili 47-80 celosvětově sebraných vzorků. Zjistili, že některé identické ITS sekvence se vyskytují na všech kontinentech, ale jiné ITS typy měly spíše omezené rozšíření.

#### **c) Rozsivky**

Van de Vijver a kol. (2005) zkoumali rod *Stauroneis* v oblastech Antarktidy a zjistili, že na ostrovech v subantarktické oblasti Indického oceánu je nejdiverzifikovanější složení druhů tohoto rodu a že se značně liší od zbylých oblastí z okolí Antarktidy. Dále se ukázalo, že některé druhy mají omezené rozšíření např. *S. bryocola*, *S. gremmenii* a *S. bertrandii*. Pro zjištění bipolárního rozšíření rodu *Stauroneis* použili data z Arktidy. Po srovnání dat došli k závěru, že pouze pět druhů (*S. gracilis*, *S. subgracilis*, *S. kriegeri*, *S. acuta* a *S. heinii*) z 60 se vyskytuje v obou oblastech. Zároveň všech pět druhů bylo nalezeno i v Evropě, Severní a Jižní Americe, což poukazuje na jejich kosmopolitní rozšíření.

Godhe a kol. (2006) zkoumali biogeografii rozsivky *Skletonema marinoi*, kterou izolovali ze čtyř míst (tj. západní pobřeží Kanady, jihozápadní pobřeží Portugalska, východní a západní pobřeží Švédska), kterou studovali pomocí molekulárních metod RAPD a PCR. Pro PCR byly použity molekulární markery LSU rDNA a ITS (ITS-1, 5.8S, ITS-2). Analýza dat ukázala, že linie ze čtyř geografických míst byla významně oddělena na základě všech tří metod, ale rozdíly mezi evropskými vzorky byly nejlépe prokázány pomocí ITS-2.

Shayler a Siver (2004) objevili několik endemických druhů rozsivek a *Mallomonas* (Chrysophyceae) v rybníku na Floridě, USA. Došli k závěru, že v průběhu několika let se změnilo pH vody z alkalické na velmi kyselou, což mělo vliv na speciaci v této lokalitě.

Dalším příkladem je rod *Actinella*, který v současnosti obsahuje 29 druhů a pouze dva (*A. brasiliensis*, *A. punctata*) jsou kosmopolitní (Sabbe a kol. 2001) a devět druhů rodu *Actinella* je endemická v Austrálii.

#### **d) Chrysophyceae**

Kristiansen (2008) shrnuje poznatky o taxonu Chrysophyceae a poukazuje, že okolo jedné třetiny z celého taxonu jsou endemické druhy, to dokumentuje na příkladu rodu *Mallomonas*, kde ze 172 druhů je 69 endemických.

#### **e) Nálevníci**

Miao a kol. (2004) odebrali v osmi oblastech Číny 19 populací *Carchesium polypinum* a zjistili na základě molekulárního markeru 18S-ITS1-5.8S rDNA, že se oddělily populace se severním a jižním výskytem.

*Tetrahymena pyriformis* komplex v současné době obsahuje 25 druhů. Některé druhy jsou kosmopolitní (např. *T. cosmopolitanis*), zatímco ostatní druhy mají omezené rozšíření. Například *T. thermophila* se vyskytuje pouze na východním pobřeží Severní Ameriky (Nanney a kol. 1998, Nanney 2004).

#### **f) Foraminifera**

Druh *Globorotalia truncatulinoides* byl nalezen v Atlantickém oceánu od 50° jižní až po 50° severní zeměpisnou šířku a také ve Středozemním moři a ve Sargasovém moři. Na základě molekulárních (tj. SSU, ITS-1, 5.8S, ITS-2), morfologických a ekologických dat se zjistilo, že *Globorotalia truncatulinoides* je komplex čtyř druhů. Druhy 1 a 2 obývají subtropickou oblast Atlantiku, druh 3 se vyskytuje mezi 40°-41° jižní šířkou a druh 4 se nalézá v subantarktidě (de Vargas 2001).

#### **g) Krytenky**

*Nebela (Apodera) vas* je díky své charakteristické morfologii dobře rozpoznatelná a je hlavně objevována na jižní polokouli. Chybí v Evropě a Severní Americe, které mají dlouhou tradici ve výzkumu volně žijících protozoa (Smith a Wilkinson 2007).

#### **h) Obrněnky**

John a kol. (2003) studovali obrněnku *Alexandrium tamarense* a zjistili, že se jedná o komplex druhů, který je rozdělen do různých geografických oblastí a to na oblast západní Evropy, Severní Ameriky, temperátní Asii a Středomoří. Přičemž linie ze Severní a temperátní Asie jsou toxické a linie ze západní Evropy a středozeří naopak toxické nejsou.

Gómez (2006) porovnal seznamy obrněnek ze Středozemního moře (Gómez 2003) a záznamy z Černého moře (Gómez a Boicenco 2004) s těmi celosvětovými a zjistil, že z 673 obrněnek ocitovaných v záznamech ze Středozemního moře jich 87 % bylo

zaznamenáno v Atlantickém oceánu, pouze 6 % (40 taxonů) bylo považováno za Indo-Pacifické druhy a 7 % (48 taxonů) se vyskytovalo pouze ve Středozemním moři.

Velmi běžný kosmopolitní druh *Ceratium hirundinella* chybí v Indonésii (Vyverman 1996), ve Venezuele, amazonské pánvi a v jižní části Jižní Ameriky (Pollinger 1987).

#### 4. Shrnutí

Obě teorie se shodují v názoru, že současným problémem pro získání vhodných dat o diverzitě a biogeografii protist je „undersampling“. I když v případě umírněného ubikvitního modelu je tomuto problému dáována větší důležitost než v případě ubikvitního modelu, což se odráží v odhadech globální diverzity a následně v porovnání lokální/globální diverzity. V případě umírněného ubikvitního modelu jsou tyto odhady několikanásobně větší než v případě ubikvitního modelu. Mimoto, rozdílné odhady nejsou způsobeny jenom na základě „undersampling“, ale hlavně tím, že umírněný ubikvitní model na rozdíl od modelu ubikvitního rozšíření počítá s endemickými druhy, které tvoří hlavní část globální diverzity.

Model ubikvitního rozšíření se rozchází s umírněným ubikvitním modelem v pohledu na důležitost velké početnosti populací a malé velikosti organismů. Ubikvitní model předpokládá, že to jsou hlavní faktory, které umožňují kosmopolitní rozšíření protist. Zatímco umírněný ubikvitní model je v tomhle pohledu skeptický, kdy se odvolává na podobné vlastnosti u hub, nižších a vyšších rostlin.

Dále bych rád poukázal na určité výhody jednotlivých modelů, které jsou zároveň nevýhodami toho druhého modelu. Jednou z výhod ubikvitního modelu je, že prosazuje to, že i mezi protistními organismy jsou specialisti a generalisti, kteří mají vliv na pochopení celkové diverzity. Další výhodou je, že poukazuje na důležitost důkladného průzkumu sebraných vzorků, na základě jejichž analýzy je možné nalézt daleko větší lokální diverzitu než jak se všeobecně předpokládá. Naopak výhodami umírněného ubikvitního modelu je, že k potvrzení výskytu endemických druhů jsou použity vlajkové druhy, a že poukazuje na vliv člověka, který ovlivnil současné rozšíření některých druhů.

Z ubikvitního modelu vyplývá, že všechny druhy sladkovodních protist mohou eventuálně být objeveny pouze v jednom malém rybníku (Finlay a Esteban 1998), proto není nutné jezdit na exotické lokality a hledat nové druhy, a nemá cenu chránit mikrobiální diverzitu.

Pro zjištění, zda protista mají nebo nemají biogeografii, je potřeba provést další výzkumy. K tomu je zapotřebí vylepšit stávající techniky odběru nebo vyvinout nové účinnější postupy, které by minimalizovali vliv „undersampling“.

### III. Praktická část

#### 1. Úvod

V praktické části bakalářské práce je hlavním cílem optimalizace molekulárních metod, zejména pak izolace DNA z kultur a amplifikace genu velké podjednotky RUBISCO (*rbcL*) pomocí PCR, které použiji v diplomové práci pro výzkum biodiverzity a biogeografie rodu *Klebsormidium*. Tento rod má uniformní morfologii, je asexuální a má kosmopolitní rozšíření, což ho činí ideálním modelem pro studium biogeografie protist.

#### 2. Charakteristika rodu *Klebsormidium*

Rod *Klebsormidium* P. C. Silva, Mattox a W. H. Blackwell (Silva a kol., 1972) se vyznačuje jednoduchými nevětvenými vlákny, s buňkami uspořádanými do jedné řady. Každá buňka má jeden parietální chloroplast s jedním pyrenoidem, který vyplňuje buňku přibližně z poloviny. Rozmnožují se jednak vegetativně fragmentací stélky nebo některé druhy asexuálně pomocí dvoubičíkatých zoospor, pohlavní rozmnožování nebylo dosud pozorováno. Zoospora je mírně zploštělá, asymetrická se dvěma subapikálně uloženými bičíky, které mají „multilayered structure“ (MLS) bičíkového kořene.

*Klebsormidium* je kosmopolitní rod (Rindi 2008), který je rozšířený po celém světě od polárních oblastí až k tropickým (Ramanathan 1964; Lee a Wee 1982; Broady 1996; Lokhorst 1996; John 2002, 2003). Vyskytuje se jak v aero-terestrických (např. v půdě (Deason 1969), kůra stromů (Handa a kol. 1991; Nakano a kol. 1991), tak v sladkovodních habitatech (např. potoky a řeky (Morison a Sheath 1985; Necchi a kol. 1991), mokřady (John 2002).

Na základě molekulárních a ultrastrukturálních dat spadá tento rod do streptofytní linie rostlin v blízké fylogenetické pozici k parožnatkám a rostlinám (Marchant a kol. 1973; Sluiman a Guihal 1999; Karol a kol. 2001; Lewis a McCourt 2004; McCourt a kol. 2004; Sluiman a kol. 2008).

Lokhorst (1996) rozpoznává osm morfologicky definovaných druhů, zahrnující pět druhů podpořených fylogenetickou analýzou ITS rDNA sekvencí (Sluiman a kol. 2008): *K. flaccidum*, *K. elegans*, *K. bilatum*, *K. crenulatum*, *K. mucosum*; a dále tři druhy, které zatím zůstávají fylogeneticky nevyřešeny: *K. dissectum*, *K. fluitans*, *K. nitens*. Novis (2006) popsal nový druh *Klebsormidium acidophilum*, který našel na Novém Zélandu v kyselých potocích.



### 3. Optimalizace metod

#### 3.1. Úvod do metodiky

Abychom mohli získat určitou sekvenci DNA, je zapotřebí nejdříve vyizolovat DNA z živé monoklonální kultury, následně amplifikovat potřebný úsek DNA pomocí PCR a nakonec PCR produkt přečistit a osekvenovat.

K izolaci DNA a následné PCR se použila nová metoda tzv. jednobuněčné PCR (Duff a kol. 2008; Auinger a kol. 2008), kdy stačí použít jen několik buněk daného druhu k získání PCR a následné sekvenaci amplifikované části DNA.

Amplifikaci vybrané sekvence DNA umožňuje metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis a Faloona 1987). Důležitými složkami, které jsou potřebné pro uskutečnění této reakce: je templátová DNA z monokultury, kterou chceme amplifikovat, DNA polymeráza, primery, které umožní polymeráze nasednout na templát a ohraničí vybranou sekvenci DNA, dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty) stavební kameny pro vznikající nové řetězce DNA, pufr, který upraví chemické prostředí potřebné pro správnou funkci polymerázy a nakonec destilovaná voda. Tato směs je vystavena střídání teplot v přístroji zvaném termocykler, kde dochází ke třem hlavním krokům (1.) denaturace – rozpletení DNA, (2.) annealing – nasednutí primerů na specifická místa DNA a následně i polymerázy, (3.) elongace – syntéza DNA. Tyto kroky se opakují v několika cyklech, čímž je dosažena mnohonásobná amplifikace daného úseku DNA.

#### 3.2. Materiál a metody

##### *3.2.1. Použité přístroje a materiál*

- Světelný mikroskop Olympus CX31
- Plastové kultivační destičky pro tkáňové kultury, 12 jamek, ploché dno
- Pipety Eppendorf Research
- Centrifuga Centrifuge 5415D, Eppendorf
- Centrifuga Spectrafuge mini spin plus, Eppendorf
- Skleněné kuličky - průměr 1,5 mm
- Žebříček O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus
- Mlýnek na drcení rostlinného materiálu Retsch MM400

- Termoblok Thermomixer compact, Eppendorf
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Mikrozkušavky PCR (0,2 ml) s plochým víčkem (P-lab)
- Mikrozkušavky - typ Eppendorf (0,5 ml) s víčkem (P-lab)
- Mikrozkušavky – typ Eppendorf (1,5 ml) s víčkem (P-lab)
- Mikrozkušavky – typ Eppendorf (2 ml) s víčkem (P-lab)
- Chladítko IsoFreeze PCR (P-lab)
- Touchgene Gradient, Techne
- Vybavení pro elektroforézu Scie-Plas: HU6 - horizontální malá krátká SHU6 - horizontální malá dlouhá, HU13 - horizontální velká
- UV lampa Herolab UV T-20 M, dokumentační systém Gel Logic 100 Imaging System Kodak
- NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo scientific

### ***3.2.2. Získání vzorků, izolace, kultivace***

Vzorky pochází z lesa z okolí města Nikko v Japonsku, které mi poskytl Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D. Byly sebrány tři kameny, dva kameny z lesa a jeden v blízkosti vodopádu, dále pak část silnice a nakonec půda z lesa a z okolí vodopádu.

Abych mohl vyizolovat jednotlivé linie musel jsem ze vzorků (kamene, silnice, půdy) odebrat přibližně 5-10 miligramů, ty jsem smíchal s 200 µl destilované vody a skleněnými kuličkami, to jsem následně vortexoval 9-10 minut. Ze vzniklé směsi jsem odebral 25 µl, toto množství jsem nanesl na Petriho misku s médiem (BBM). Po třech až čtyřech týdnech jsem z Petriho misek vyizoloval jednotlivé kmeny za použití mikroskopu Olympus CX31 pomocí sterilní jehly. Jednotlivé kolonie jsem přenášel na plastové kultivační destičky. Vyizolované kultury rostly při přirozeném osvětlení a laboratorní teplotě.

### ***3.2.3. Kmeny***

<b>kmen</b>	<b>lokalita</b>	<b>kmen</b>	<b>lokalita</b>
JK1	Nikko kámen	JVK1	Nikko vodopád kámen
JK2	Nikko kámen	JVK2	Nikko vodopád kámen
JK3	Nikko kámen	JVK3	Nikko vodopád kámen
JK4	Nikko kámen	JVK4	Nikko vodopád kámen
JK5	Nikko kámen	JVK5	Nikko vodopád kámen
JK6	Nikko kámen	JVK6	Nikko vodopád kámen

JK7	Nikko kámen	JVK7	Nikko vodopád kámen
JK8	Nikko kámen	JVK8	Nikko vodopád kámen
JK9	Nikko kámen	JVK9	Nikko vodopád kámen
JKK1	Nikko kámen 2	JVK10	Nikko vodopád kámen
JKK2	Nikko kámen 2	JVK11	Nikko vodopád kámen
JKK3	Nikko kámen 2	JVK12	Nikko vodopád kámen
JKK4	Nikko kámen 2	JVK13	Nikko vodopád kámen
JKK5	Nikko kámen 2	JS1	Nikko silnice
JKK6	Nikko kámen 2	JS2	Nikko silnice
JKK7	Nikko kámen 2	JS3	Nikko silnice
JKK8	Nikko kámen 2	JS4	Nikko silnice
JKK9	Nikko kámen 2	JVP1	Nikko vodopád půda
JKK10	Nikko kámen 2	JVP2	Nikko vodopád půda
JKK11	Nikko kámen 2	JVP3	Nikko vodopád půda
JKK12	Nikko kámen 2	JVP4	Nikko vodopád půda
JKK13	Nikko kámen 2	JVP5	Nikko vodopád půda
JKK14	Nikko kámen 2	JVP6	Nikko vodopád půda
JKK15	Nikko kámen 2	JVP7	Nikko vodopád půda
JKK16	Nikko kámen 2	JVP8	Nikko vodopád půda
JKK17	Nikko kámen 2	JVP9	Nikko vodopád půda
JKK18	Nikko kámen 2	JVP10	Nikko vodopád půda
JP1	Nikko půda		

Tabulka III. 1. Seznam vyizolovaných kmenů z Japonska

### 3.2.4. Izolace DNA

- K vyizolování DNA jsem použil kmeny (tab. III. 1).
- Použil jsem 2 ml zkumavky s víčkem, do které jsem dal 100  $\mu\text{m}$  InstaGene matrix buffer, několik vláken kmenu a 2-3 skleněné kuličky (s průměrem 1,5 mm).
- Za použití mlýnku (6 min, při 30 frekvence za sekundu) jsem buňky rozbil.
- Zkumavku jsem přendal do thermomixeru, kde jsem teplotu nastavil na 56 °C při míchání 700 rpm.
- Po 30 minutách jsem zkumavky vyndal a vortexoval 10 sekund na max.
- Vrátil jsem zpět do thermomixeru na 8 min. s teplotou 100 °C.
- Opět vortexoval 10 s na max.
- Nakonec jsem centrifugoval 2 min. při 12 000 otáček. $\cdot\text{s}^{-1}$ .(rpm)

### 3.2.5. Měření koncentrace DNA

Koncentraci DNA jsem měřil na Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo scientific

- Nejdříve jsem nanesl 2  $\mu\text{l}$  dest. vody.

- Potom jsem změřil BLANK za použití dest. vody.
- Vlastní vzorek jsem měřil při  $\lambda = 260$  nm.

### 3.2.6. PCR

#### a) Použité primery a jejich kombinace

Jméno	Sekvence	Citace	Orientace
KlebsR	TCCTCCGCTTAGTAATATGC	vlastní	R
Klebs-ITS1-F	GAAGCTGTGAGAAGTTCATTAACACC	vlastní	F
Klebs-ITS1-F2	ACCGATGCTTGTGCCAACAA	vlastní	F
Klebs-ITS2-F	CTGGTCGGCTGAAAGGCAGATGC	vlastní	F
Klebs-ITS2-R	CCCGCGATGCGGTCTACCACG	vlastní	R
Klebs-LSU-R	CTCTCACCCCTCTCTGACGTCCCATT	vlastní	R

Tabulka III. 2. Seznam ITS primerů

Jméno	Sekvence	Citace	Orientace
KF2	ACTTACTACACTCCTGATTATGA	vlastní	F
KR2	GGTTGCCTTCGCGAGCTA	vlastní	R
KF590	GATGAAAACGTAAACTCTCAGC	vlastní	F

Tabulka III. 3. Seznam *rbcl* primerů

1.	Klebs-ITS1-F	KlebsR
2.	Klebs-ITS1-F	Klebs-LSU-R
3.	Klebs-ITS1-F2	KlebsR
4.	Klebs-ITS1-F2	Klebs-LSU-R
5.	Klebs-ITS1-F	Klebs-ITS2-R
6.	Klebs-ITS1-F2	Klebs-ITS2-R
7.	Klebs-ITS2-F	KlebsR
8.	Klebs-ITS2-F	Klebs-LSU-R

Tabulka III. 4. Kombinace ITS primerů

1.	KF2	KR2
2.	KF590	KR2

Tabulka III. 5. Kombinace *rbcl* primerů

#### b) Použité master mixy pro PCR

složka	$\mu$ l na 1 vzorek
polymeráza	0,5
MgCl <sub>2</sub>	0,2
puf	2
voda	15,4
dNTP	0,4
primer 1	0,25
primer 2	0,25
DNA	1

Tabulka III. 6. Master Mix při použití RedTaq Jump Start polymerázy pro PCR

složka	μl na 1 vzorek
polymeráza	0,2
MgCl <sub>2</sub>	2
pufř	2
voda	13,9
dNTP	0,4
primer 1	0,25
primer 2	0,25
DNA	1

Tabulka III. 7. Master Mix při použití Gold polymerázy pro PCR

**c) Použité cykly**

Iniciální denaturace	94 °C	2 min	35 cyklů
Denaturace	94 °C	1 min	
Annealing	50 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1 min 30 s	
Finální elongace	72 °C	10 min	

Tabulka III. 8. Cyklus pro ITS

Iniciální denaturace	95 °C	2 min	40 cyklů
Denaturace	94 °C	1 min	
Annealing	47 °C	1 min	
Elongace	72 °C	3 min	
Finální elongace	72 °C	8 min	

Tabulka III. 9. Cyklus *rbcL* 1

Iniciální denaturace	95 °C	2 min	37 cyklů
Denaturace	94 °C	1 min	
Annealing	50 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1 min 30 s	
Finální elongace	72 °C	1 min	

Tabulka III. 10. Cyklus *rbcL* 2

Iniciální denaturace	95 °C	2 min	37 cyklů
Denaturace	94 °C	1 min	
Annealing	47 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1 min 30 s	
Finální elongace	72 °C	8 min	

Tabulka III. 11. Výsledný cyklus pro *rbcL*.

#### d) Ředění DNA pro PCR

$$d = (x * y) / z$$

$$v = x - d$$

ředění: v:d

x ... požadovaný objem DNA

y ... požadovaná c (DNA)

z ... naměřená c (DNA)

d ... objem neředěné DNA

v ... objem destilované vody

Izolovanou DNA jsem ředil na požadovanou koncentraci 5 ng/μl.

#### e) Postup čištění produktu PCR

Pomocí kitu Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250 jsem přečistil PCR produkty.

- Do zkumavky s PCR produktem jsem přidal 80 μl H1, směs jsem přendal na filtr, který byl ve zkumavce.
- Centrifugoval 1 minutu při 12 000 rpm, obsah zkumavky jsem vylil.
- Na filtr jsem přidal 500 μl H2 + etanol.
- 2 x centrifugovat (1 min, 12 000 rpm) do sucha.
- Filtr se následně přendá do nové 1,5 μl ependorfky s víčkem.
- Na závěr se přidá TE zahřáté na 65-70 °C a nechá se 6 minut stát.
- Potom se to centrifuguje dvě minuty při 12 000 rpm.
- Po 4 hodinách se změří koncentrace DNA.

#### 3.2.7. Příprava gelu, elektroforéza, focení gelu

Příprava 1% TBE gelu pro středně velkou misku: agarósa I 0,5g + pufr TBE 1% 50 ml + 1 kapka thiamid bromidu

- Smíchal jsem agarósu s TBE a uvařil v mikrovlnce.

- Po mírném zchlazení jsem přidal thiamid bromid.
- Do připravené misky s hřebínky jsem nalil výslednou směs a nechal jsem 20 minut tuhnout.
- Potom jsem z okraje misky odlepil lepicí pásku a vyndal hřebínky.
- Ponořil jsem vaničku do nádoby pro elektroforézu s TBE pufrem.
- Do první jamky jsem nanesl 3  $\mu\text{l}$  žebříčku a pak jsem už nanášel 4  $\mu\text{l}$  vlastních vzorků.
- Zapnul jsem přívod proudu, kde jsem nastavil napětí na 100 V a nechal 20 minut běžet.
- Pod UV zářením jsem zjistila výsledek (Herolab UV T -20 M, dokumentační systém Gel Logic 100 Imaging System Kodak).

### 3.2.8. Sekvenace

Osekvenování zajišťuje společnost MacroGene v Jižní Korei.

## 3.3. Výsledky

### 3.3.1. Koncentrace DNA

Po izolaci DNA za použití InstaGene matrix jsem získal z jednotlivých kmenů DNA o koncentracích, které ukazuje tab. III. 12.

kmen	lokalita	Koncentrace DNA v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	kmen	lokalita	Koncentrace DNA v $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
JK1	Nikko kámen	16,2	JVK1	Nikko vodopád kámen	25,1
JK2	Nikko kámen	40,7	JVK2	Nikko vodopád kámen	46,8
JK3	Nikko kámen	45,2	JVK3	Nikko vodopád kámen	10,7
JK4	Nikko kámen	316,1	JVK4	Nikko vodopád kámen	42,1
JK5	Nikko kámen	25,8	JVK5	Nikko vodopád kámen	494,9
JK6	Nikko kámen	61,9	JVK6	Nikko vodopád kámen	1450,0
JK7	Nikko kámen	59,6	JVK7	Nikko vodopád kámen	1343,2
JK8	Nikko kámen	85,9	JVK8	Nikko vodopád kámen	767,5
JK9	Nikko kámen	97,1	JVK9	Nikko vodopád kámen	76,1
JKK1	Nikko kámen 2	105,9	JVK10	Nikko vodopád kámen	503,3
JKK2	Nikko kámen 2	104,7	JVK11	Nikko vodopád kámen	55,8
JKK3	Nikko kámen 2	121,5	JVK12	Nikko vodopád kámen	265,6
JKK4	Nikko kámen 2	213,9	JVK13	Nikko vodopád kámen	325,9
JKK5	Nikko kámen 2	195,3	JS1	Nikko silnice	24,8
JKK6	Nikko kámen 2	134,3	JS2	Nikko silnice	21,6
JKK7	Nikko kámen 2	182,1	JS3	Nikko silnice	39,3

JKK8	Nikko kámen 2	79,5		JS4	Nikko silnice	188,9
JKK9	Nikko kámen 2	112,2		JVP1	Nikko vodopád půda	68,7
JKK10	Nikko kámen 2	265,9		JVP2	Nikko vodopád půda	252,3
JKK11	Nikko kámen 2	153,9		JVP3	Nikko vodopád půda	83,7
JKK12	Nikko kámen 2	14,7		JVP4	Nikko vodopád půda	957,1
JKK13	Nikko kámen 2	44,6		JVP5	Nikko vodopád půda	83,3
JKK14	Nikko kámen 2	57,5		JVP6	Nikko vodopád půda	134,9
JKK15	Nikko kámen 2	54,0		JVP7	Nikko vodopád půda	45,7
JKK16	Nikko kámen 2	29,0		JVP8	Nikko vodopád půda	136,6
JKK17	Nikko kámen 2	819,7		JVP9	Nikko vodopád půda	406,6
JKK18	Nikko kámen 2	591,5		JVP10	Nikko vodopád půda	181,8
JP1	Nikko půda	132,5				

Tabulka III. 12. Koncentrace DNA jednotlivých kmenů

### 3.3.2. PCR

Přehled jednotlivých PCR reakcí.

#### a) PCR 1

Pro první PCR reakci jsem vybral kmeny: JK1, JK9, JKK6, JS1 a kontrolní kmen K9. Použil jsem master mix s Gold polymerázou (Tab. III. 7.), kombinaci ITS primerů (Tab. III. 4.) a cyklus (Tab. III. 8.).

Nejlépe dopadla kombinace primerů Klebs-ITS1-F2 - Klebs-LSU-R, které byly vybrány pro další PCR reakce.

#### b) PCR 2

Použil jsem 20 kmenů: JK2, JK3, JK4, JK5, JK6, JK7, JK8, JKK1, JKK2, JKK3, JKK4, JKK5, JKK7, JKK8, JKK9, JKK10, JKK11, JS2, JS3, JS4.

Použil jsem master mix (Tab. III. 7.) s primery Klebs-ITS1-F2 a Klebs-LSU-R a cyklus (Tab. III. 8.).

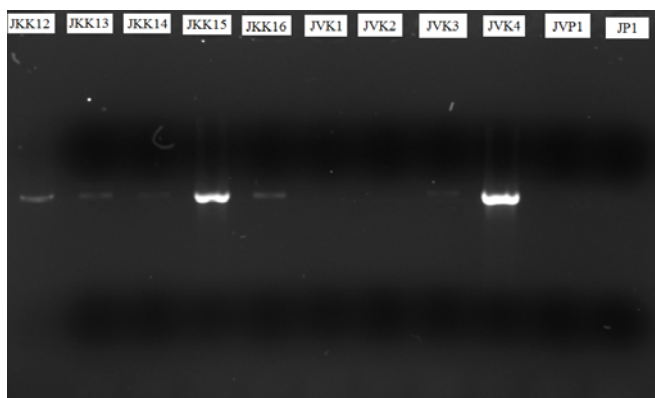
Vyšlo celkem 14 kmenů z 20, nevyšly pouze JK6, JK7, JKK4, JKK5, JKK10, JKK11.

#### c) PCR 3

Použil jsem 11 kmenů: JKK12, JKK13, JKK13, JKK14, JKK15, JKK16, JVK1, JVK2, JVK3, JVK4, JVP1, JP1.

Použil jsem master mix (Tab. III. 7.) s primery Klebs-ITS1-F2 a Klebs-LSU-R a cyklus (Tab. III. 8.).





Obrázek III. 1. Výsledek PCR 3

Tentokrát, jak dokumentuje (Obr. III. 1.), vyšly pouze 2 kmeny (JKK15, JVK4).

#### d) PCR 4

Potom jsem přešel na amplifikaci *rbcL* genů.

Použil jsem 20 kmenů: JK3, JK6, JK7, JK9, JKK1, JKK2, JKK4, JKK7, JKK8, JKK11, JKK15, JVK1, JVK2, JVK3, JVK4, JS1, JS3, JS4, JVP1, JP1.

Použil jsem master mix (Tab. III. 8.) s *rbcL* primery KF2 a KR2 a cyklus (Tab. III. 9.). Nevyšel ani jeden kmen.

#### e) PCR 5

Použil jsem kmeny JK5, JKK7, JKK11, JVP2, JS3 a kontrolní kmeny 39 a 44.

Použil jsem KF2 a KR2 primery, dva typy master mixu, jeden s Glod polymerázou a druhý s RedTaq polymerázou (Tab. III. 6. a 7.) a dva cykly (Tab. III. 9. a 10.).

Na kmeny s master mixem obsahující Gold polymerázu byly použity oba cykly a kmeny s RedTaq polymerázou byl použit pouze jeden cyklus (Tab. III. 10.).

Zjistil jsem, že vlastní kmeny nevyšli, kromě JS3, a vyšly oba kontrolní kmeny ve všech třech kombinacích.

#### f) PCR 6

Pro optimalizaci PCR reakce pro *rbcL* gen, jsem použil dva kmeny JKK7 a JKK11, které jsem naředil na čtyři různé koncentrace (Tab. III. 13.) a kmeny JS2, JKK14 a JVP8 které byly naředěny na 5 ng.μl<sup>-1</sup>.

	Koncentrace DNA ng.μl <sup>-1</sup>			
JKK7	0,5	25,6	104,4	182,1
JKK11	1,5	20,1	102,6	153,9

Tabulka III. 13. Naředěné kmeny

Použil jsem KF2 a KR2 primery pro naředěné kmeny a kombinaci primerů KF590 – KR2 jsem použil na standartně naředěné kmeny.

Použil jsem master mix s Gold polymerázou (Tab. III. 7.) a cyklus (Tab. III. 11). Vyšly pouze kmeny, kde byla použita kombinaci primerů KF590 – KR2.

#### g) PCR 7

Použil jsem 22 kmenů: JKK1-JKK13, JKK15-JKK18, JS1, JS4, JP1, JK1, JK2.

Použil jsem master mix s Gold polymerázou (Tab. III. 7.) s kombinací primerů KF590 - KR2. Použit byl výsledný cyklus (Tab. III. 11.).

Vyšlo všech 22 kmenů.

## 4. Shrnutí

Pro kultivaci rodu *Klebsormidium* budu i nadále používat BBM medium a ukázalo se, že izolace pomocí InstaGene matrix je rychlá a snadná metoda.

Pro PCR reakci budu používat master mix (Tab. III. 14.) a cyklus (Tab. III. 11.).

složka	μl na 1 vzorek
polymeráza	0,2
MgCl <sub>2</sub>	2
pufř	2
voda	13,9
dNTP	0,4
KF590	0,25
KR2	0,25
DNA	1

Tabulka III. 14. Výsledný master mix

#### **IV. Závěr**

V mé bakalářské práci jsem se seznámil s dosavadními znalostmi a názory, týkajícími se diverzity a biogeografie protist a ze studií zabývajících se touto problematikou jsem se dozvěděl, jak jednotliví vědci a týmy odborníků postupovali při studiu biogeografie a diverzity protistních organismů. Tyto získané poznatky mi pomohou při vlastní vědecké činnosti.

V praktické části se mi povedlo optimalizovat molekulární metody, které použiji v diplomové práci pro studium diverzity a biogeografie rodu *Klebsormidium*.

## **V. Poděkování**

Chtěl bych poděkovat rodině, kamarádům a pedagogům PřF UK, kteří mi během mého studia na Přírodovědecké fakultě UK pomáhali a podporovali mě.

Mé největší poděkování patří mému školiteli bakalářské práce Mgr. Pavlovi Škaloudovi, Ph.D. za výborné vedení bakalářské práce a který mě s velkou trpělivostí zaškolil pro práci v molekulární laboratoři.

Nakonec děkuji všem členům algologického pracoviště PřF UK a DNA laboratoře za pomoc a za navození příjemné atmosféry.

## VI. Literatura

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. a Taylor, M. F. J. R.** (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52, 399–451.
- Alongi, G., Cormaci, W. H. a Furnari, G.** (2002): The Corallinaceae (Rhodophyta) from the Ross Sea (Antarctica): a taxonomic revision rejects all records except *Phymatolithon foecundum*. *Phycologia*, 41, 140-146.
- Atkins, M. S., Teske, A. P. a Andersen, O. R.** (2000): A survey of flagellate diversity at four deep-sea hydrothermal vents in the Eastern Pacific Ocean using structural and molecular approaches. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 400–411.
- Auinger, B. M., Pfandl, K. a Boenigk, J.** (2008): Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and environmental microbiology*, 2505-2510.
- Bass, D., Richards, T. A., Matthai, L., Marsh, V. a Cavalier-Smith, T.** (2007): DNA evidence for global dispersal and probable endemicity of protozoa. *BMC Evolutionary*
- Boenigk, J., Pfandl, K., Stadler, P. a Chatzinotas, A.** (2005): High diversity of the „*Spumella*-like“ flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 7(5), 685-697.
- Broady, P. A.** (1996): Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodivers. Conserv.*, 5, 1307-1335.
- Chao, A., Li, P. C., Agatha, S. a Foissner, W.** (2006): A statistical approach to estimate soil ciliate diversity and distribution based on data from five continents. *Oikos*, 114, 479–493.
- Cho, J.-C. a Tiedje, J. M.** (2000): Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5448-5456.

- Cohan, F. M.** (2002): What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 457-487.
- Corliss, J. O. a Esser, S. C.** (1974): Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of free-living protozoa. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 93, 578-593.
- Darling, K. F., Wade, C. M., Stewart, I. A., Kroon, D., Dingle, R. a Leigh Brown, A. J.** (2000): Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic planktonic foraminifers. *Nature*, 405, 43-47
- Deason, T. R.** (1969): Filamentous and colonial soil algae from Dauphin Island, Alabama. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 88, 240–246.
- Dragesco, J.** (1968): A propos de *Neobursaridium gigas* Balech, 1941: Sténothermie, inclusions, ultrastructure des trichocystes. *Protistologica*, 4, 157–167.
- Duff, R. J., Ball, H. a Lavrentyev, P. J.** (2008): Application of combined morphological – molecular approaches to the identification of planktonic protists from environmental samples. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55(4), 306-312.
- Elliott, A. M.** (1973): Life cycle and distribution of *Tetrahymena*. In: *Biology of Tetrahymena* (Ed. A. M. Elliott). Hutchinson a Ross, Stroudsburg, 259-286.
- Fenchel, T.** (1993): There are more small than large species? *Oikos*, 68, 375-378.
- Fenchel, T., Esteban, G. F. a Finlay, B. J.** (1997): Local versus global diversity of microorganisms: Cryptic diversity of ciliated protozoa. *Oikos*, 80, 220–225.
- Fenchel, T. a Finlay, B. J.** (2003): Is microbial diversity fundamentally different from biodiversity of larger animals and plants? *European Journal of Protistology*, 39, 486-490.
- Fenchel, T. a Finlay, B. J.** (2004): The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience*, str. 777.
- Finlay, B. J.** (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296, str. 1061.
- Finlay, B. J. a Clarke, K. J.** (1999): Apparent global ubiquity of species in the protist genus *Paraphysomonas*. *Protist*, 150, 419-430. *Biology*, 7:162.
- Finlay, B. J., Corliss, J. O., Esteban, G. a Fenchel, T.** (1996): Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere. *The quarterly review of biology*, 71(2).
- Finlay, B. J., Esteban, G. F., Brown, S., Fenchel, T. a Hoef-Emden, K.** (2006): Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist*, 157, 377-390.

- Finlay, B. J., Esteban, G. F., Clarke, K. J. a Olmo, J. L.** (2001): Biodiversity of terrestrial protozoa appears homogeneous across local and global spatial scales. *Protist*, 152, 355-366.
- Finlay, B. J., Esteban, G. F. a Fenchel, T.** (1998) Protozoan diversity: converging estimates of the global number of free-living ciliate species. *Protist*, 149, 29-37
- Finlay, B. J. a Fenchel, T.** (1999): Divergent perspective on protist species richness. *Protist*, 150, 229-233.
- Finlay, B. J., Genoveva, F. E. a Fenchel, T.** (2004): Protist diversity is different? *Protist*, 155, 15-22.
- Finlay, B. J., Monaghan, E. B. a Maberly, S. C.** (2002): Hypothesis: the rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance. *Protist*, str. 261.
- Foissner, W.** (1987): Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators, and guide to the literature. *Progr. Protistol.*, 2, 69-212
- Foissner, W.** (1996): Faunistics, taxonomy and ecology of moss and soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Antarctica, with description of new species, including *Pleuroplitoides smithi* gen. n., sp. n. *Acta Protozool.*, 35, 95-123.
- Foissner, W.** (1997a): Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. *Biol. Fertil. Soils.*, 25, 317-339.
- Foissner, W.** (1997b): Global soil ciliate (Protozoa, Ciliophora) diversity: a probability-based approach using large sample collections from Africa, Australia and Antarctica. *Biodiv. Conserv.*, 6, 1627-1638.
- Foissner, W.** (1998): An updated compilation of world soil ciliates (Protozoa, Ciliophora), with ecological notes, new records, and descriptions of new species. *Europ. J. Protistol.* 34, 195-235.
- Foissner, W.** (1999): Protist diversity: estimates of the near-imponderable. *Protist*, 150, 363-368.
- Foissner, W.** (2000): A compilation of soil and moss ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Germany, with new records and descriptions of new and insufficiently known species. *Europ. J. Protistol.*, 36, 253-283.

- Foissner, W.** (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 45, 111-136.
- Foissner, W.** (2008): Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodivers Conserv*, 17, 235-242.
- Foissner, W., Chao, A. a Katz, L. A.** (2007): Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Biodivers Conserv*, 17, 345-365.
- Foissner, W. a Wölfel, S.** (1994): Revision of the genus *Stentor* Oken (Protozoa, Ciliophora) and description of *S. araucanus* nov. spec. from South American lakes. *J. Plankton Res.*, 16, 255-289.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L. a Muyzer, G.** (1996): Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microb.*, 62, 3284-3291.
- Gaston, K. J.** (1992): Regional numbers of insect and plant-species. *Funct. Ecol.* 6, 243.
- Godhe, A., McQuoid, M. R., Karunasagar, In., Karunasagar, Id. a Rehnstam-Holm, A.** (2006): Comparison of three common molecular tools for distinguishing among geographically separated clones of the diatom *Skeletonema marinoi* Sarno et Zingone (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 42, 280-291.
- Gómez, F.** (2003): Checklist of Mediterranean free-living dinoflagellates. *Botanica Marina*, 46, 215-242.
- Gómez, F.** (2006): Endemic and Indo-Pacific plankton in the Mediterranean Sea: a study based on dinoflagellate records. *Journal of Biogeography*, 33, 261-270.
- Gómez, F. a Boicenco, L.** (2004): An annotated checklist of dinoflagellates in the Black sea. *Hydrobiologia*, 517, 43-59.
- Hallegraeff, G. M. a Bolch, C. J.** (1992): Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J. Plankton Res.*, 14, 1067-1084.
- Handa, S., Nakano, T. a Takeshita, S.** (1991): Some corticolous algae from Shibetsu, Hokkaido, northern Japan. *J. Jpn. Bot.*, 66, 211-223.
- Hülsmann, N. a Galil, B. S.** (2002): Protists - a dominant component of the ballast-transported biota. In: *Invasive Aquatic Species of Europe* (Eds. E. Leppäkoski *et al.*) *Kluwer Academic Publ.*, Dordrecht, Boston, London, 20-26.



- John, D. M.** (2002): Orders Chaetophorales, Klebsormidiales, Microsporales, Ulotrichales. In John, D. M., Whitton, B. A. & Brook, A. J. [Eds.] *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 433–468.
- John, D. M.** (2003): Filamentous and plant-like green algae. In Wehr, J. D. & Sheath, R. G. [Eds.] *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, San Diego, California, pp. 311–352.
- John, U., Fensome, R. A. & Medlin, L. K.** (2003): The application of molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* „species complex“ (Dinophyceae). *Molecular biology and evolution*, 20(7), 1015-1027.
- Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T. & Delwiche, C. F.** (2001): The closest living relatives of land plants. *Science*, 294, 2351-2353.
- Kodric-Brown, A. & Brown, J. H.** (1993): Incomplete data sets in community ecology and biogeography: a cautionary tale. *Ecol. Appl.*, 3, 736-742.
- Kristiansen, J.** (1996): Dispersal of freshwater algae - a review. *Hydrobiologia*, 336, 151-157.
- Kristiansen, J.** (2008): Dispersal and biogeography of silica-scaled chrysophytes, *Biodivers Conserv*, 17, 419-426.
- Lawton, J. H.** (1998): Small is beautiful, and very strange. *Oikos* 81, 3-5.
- Lee, K. B. & Wee, Y. C.** (1982): Algae growing on walls around Singapore. *Malays. Nat. J.*, 35, 125-132.
- Lewis, L. A. & McCourt, R. M.** (2004): Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.*, 91, 1535-1556.
- Lobban, C. S., Scheffter M., Simpson, A. G. B., Pochon, X., Pawlowski, J. & Foissner, W.** (2002): *Maristentor dinoferus* n. gen., n. sp., a giant heterotrich ciliate (Spirotrichea: Heterotrichida) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Mar. Biol.*, 140, 411-423.
- Lokhorst, G. M.** (1996): Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. In Juřlich, W. [Ed.] *Cryptogamic Studies*, Vol. 5, Gustav Fischer, Stuttgart, Germany, 1–55.
- Martens, K.** (1997): Speciation in ancient lakes. *TREE*, 12, 177–182.
- MacArthur, R. H. & Wilson, E. O.** (1967): *The Theory of Island Biogeography*. Princeton (NJ): Princeton University Press.

- Marchant, H. J., Pickett-Heaps, J. D. a Jacobs, K.** (1973): An ultrastructural study of zoosporogenesis and the mature zoospore of *Klebsormidium flaccidum*. *Cytobios*, 8, 95-107.
- Maskell, W. M.** (1887): Trans. N. Z. Inst. 20, 3.
- May, R. M.** (1988): How many species are there on Earth? *Science*, 241, 1441–1449
- McCourt, R. M., Delwiche, C. F. a Karol, K. G.** (2004): Charophyte algae and land plant origin. *Trends Ecol. Evol.*, 19, 661-666.
- Miao, W., Yu, Y., Shen, Y. a Zhang, X.** (2003): Intraspecific phylogeography of *Carchesium polypinum* (Petrichia, Ciliophora) from China, inferred from 18S-ITS1-5.8S ribosomal DNA. *Science in China Ser. C Life Science*, 47, 11-17.
- Mitchell, E. A. D. a Meisterfeld, R.** (2005): Taxonomic confusion blurs the debate on cosmopolitanism versus local endemism of free-living protists. *Protist*, 156, 263–267.
- Montresor, M., Lovejoy, C., Orsini, L. a Procaccini, G.** (2003): Bipolar distribution of cyst-forming dinoflagellate *Polarella gracialis*. *Polar Biol*, 26, 186-194.
- Montresor, M., Procaccini, G. a Stoecker, D. K.** (1999): *Polarella gracialis* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): Suessiaceae are still alive! *J. Phycol*, 35, 186-197.
- Morison, M. O. a Sheath, R. G.** (1985): Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia*, 24, 129-145.
- Mullis, K. B. a Faloona, F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- Nakano, T., Handa, S. a Takeshita, S.** (1991): Some corticolous algae from the Taishaku-Kyo Gorge, western Japan. *Nova Hedwigia*, 52, 427–451.
- Nanney, D. L.** (2004): No trivial pursuit. *BioScience*, 54, 720-721.
- Nanney, D. L. a McCoy, J. W.** (1976) Characterization of the species of the *Tetrahymena pyriformis* complex. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 95, 664-682.
- Nanney, D. L., Park, C., Preparata, R. a Simon, E. M.** (1998): Comparison of sequence differences in a variable 23S rRNA domain among sets of cryptic species of ciliated Protozoa. *J. Euk. Mikrobiol.*, 45, 91-100.
- Necchi, O., Dip, M. R. a Goes, R. M.** (1991): Macroalgae of a stream in southeastern Brazil composition, seasonal variation and relation to physical and chemical variables. *Hydrobiologia*, 213, 241-250.

- Nicholls, K. H. a MacIsaac H. J.** (2004): Euryhaline, sand-dwelling, testate rhizopods in the Great Lakes. *J. Great Lakes Res.*, 30, 123-132.
- Norris, R. D.** (2001): Pelagic species diversity and evolution. *Paleobiol.*, 26, 236–258.
- Novis, P. M.** (2006): Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. *Phycologia*, 45(3), 293-301.
- Papke, R. T., Ramsing, N. B., Bateson, M. M. a Ward, D. M.** (2003): Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 5(8), 650-659.
- Patterson, D. J. a Lee W. J.** (2000): Geographic Distribution and Diversity of Free-Living Heterotrophic Flagellates. *In Leadbeater BSC and Green JC (eds) The Flagellates.*, 269–287.
- Persson, A.** (2002): Proliferation of cryptic protists and germination of resting stages from untreated sediment samples with emphasis on dinoflagellates. *Ophelia*, 55, 152–166.
- Pollinger, U.** (1987): Ecology of dinoflagellates: freshwater ecosystems. *Bot. Monogr.*, 21, 502-529.
- Ramanathan, K. R.** (1964): *Ulotrichales*. *Indian Council of Agricultural Research, New Delhi*, ix + 188 pp.
- Rindi, F., Guiry, M. D. a López-Bautista, J. M.** (2008): Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environment in Europe. *J. Phycol.*, 44, 1529-1540.
- Sabbe, K., Vanhoutte, K., Lowe, R. L., Bergey, E. A., Biggs, B. J. F., Francoeur, S., Hodgson, D. a Vyverman, W.** (2001) Six new *Actinella* (Bacillariophyta) species from Papua New Guinea, Australia and New Zealand: further evidence for widespread diatom endemism in the Australasian region. *Europ. J. Phycol.*, 36, 321-340.
- Schluter, D.** (1998): Ecological causes of speciation. In: Howard DJ, Berlocher SH (eds) *Endless forms*. Univ Press, New York, 114–129.
- Silva, P. C., Mattox, K. R. Balackwell, W. H.** (1972): The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon*, 21, 639-645.
- Sluiman, H. J. a Guihal, C.** (1999): Phylogenetic position of *Chaetospheridium* (Chlorophyta), a basal lineage in the Charophyceae, inferred from 18S rDNA sequences. *J. Phycol.*, 35, 395-402.
- Sluiman, H. J., Guihal, C. a Mudimu, O.** (2008): Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA

- phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *J. Phycol*, 44, 183-195.
- Smith, H. G. a Wilkinson, D. M.** (2007): Not all free-living microorganisms have cosmopolitan distribution – the case of *Nebela (Apodera) vas* Cartes (Protozoa, Amoebozo, Arcellinida). *Journal of Biogeography*, 34, 1822-1831.
- Song, W. a Wilbert, N.** (2002): Faunistic studies on marine ciliates from the Antarctic benthic area, including descriptions of one epizoic form, 6 new species and, 2 new genera (Protozoa: Ciliophora). *Acta Protozool.*, 41, 23-61.
- Sonneborn, T. M.** (1975): The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 94, 155-178.
- Souza, V., Nguyen, T. T., Hudson, R. R., Pinero, D. a Lenski R. E.** (1992): Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 8389-8393.
- Staley, J. T. a Gosink, J. J.** (1999): Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 53, 189-215.
- Stoeck, T., Kasper, J. a Bunge, J.** (2007): Protistan diversity in the artic: a case of paleoclimate shaping modern biodiversity? *PLoS ONE*, 8, 1-16.
- Šlapeta, Jan. López-García, P. a Moreira, D.** (2006): Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 23-29.
- Tyler, P. A.** (1996): Endemism in freshwater algae with special reference to the Australian region. *Hydrobiologia*, 336, 1-9.
- de Vargas, C., Renaud, S., Hilbrecht, H. a Pawlowski, J.** (2001): Pleistocene adaptive radiation in *Globorotalia truncatulinoides*: genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology*, 27(1), 104-125.
- Van de Vijver, B., Gremmen, N. J. M. a Beyens, L.** (2005): The genus *Stauroneis* (Bacillariophyceae) in the Antarctic region. *Journal of Biogeography*, 32, 1791-1798.
- Vyverman, W.** (1996): The Indo-Malaysian North-Australian phycogeographical region revised. *Hydrobiologia*, 336, 107-120.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. a Taylor, J. W.** (2003): Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 301, str. 976.

- Whittaker, R. H.** (1969): „New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms“. *Science*, 163(863), 150-160.
- Wilkinson, D. M.** (2001): What is the upper size limit for cosmopolitan distribution in free-living microorganisms? *J. Biogeogr.*, 28, 285-291.
- Wilmotte, A., Turner, S., van de Peer, Y. a Pace, N. R.** (1992): Taxonomic study of marine Oscillatoriacean strains (cyanobacteria) with narrow trichomes. II Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J. Phycol.*, 28, 828-838.