

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diverzita pelagických diplomem na vertikálním gradientu

Bakalářská práce

Michaela Uhrová

Vedoucí práce: Mgr. Aleš Horák, Ph.D.

České Budějovice 2017

Uhrová, M., 2017: Diverzita pelagických diplomem na vertikálním gradientu. [The diversity of pelagic diplomemids on the vertical gradient. Bc Thesis, in Czech]– 42 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

This Bachelor thesis focuses on the diversity of the recently discovered group of marine protists- diplomemids. Only a few species were known until the results from the *Tara* Oceans Expeditions revealed their extreme diversity and abundance in the global ocean ecosystem. Nowadays, they are considered to be the most diverse planktonic eukaryotes. The data available from the *Tara* Oceans expeditions indicate vertical stratification of eupelagonemids (group of diplomemids), but these studies are based only on limited sampling. The main objective of this thesis is to find and compare eupelagonemids from samples collected in Adriatic Sea in the whole dept spectrum using environmental sequencing methods.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, archivované Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

Datum: Podpis:

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli Alešovi Horákovi za pomoc se zpracováním celé práce a cenné rady během mé práce v laboratoři. Stejně tak patří dík i Olze Flegontové za pomoc se zpracováním vzorků a ostatním pracovníkům z laboratoře molekulární biologie prvků. Ráda bych také poděkovala Dr. Danijele Šantič za poskytnutí vzorků, které se staly základem mé práce.

Velký dík patří také celé mé rodině za trvalou podporu během mého studia. Svým kamarádům děkuji za to, že mě vždy dokázali odreagovat od laboratorní práce a svým spolubydlícím za to, že mě v těžkých chvílích návratů z laboratoře podporovali třeba jen připravenou večeří, případně venčením psa.

OBSAH

1. Úvod.....	1
1.1. Určení druhů organismů a jejich diverzity v prostředí	1
1.2. Environmentální sekvenování.....	2
1.3. Současný pohled na ekosystém oceánu	5
1.4. Diplonemy	7
2. Cíle práce.....	12
3. Materiály a metody.....	13
3.1. Vzorky a izolace	13
3.2. Polymerázová řetězcová reakce	14
3.3. Gelová elektroforéza.....	15
3.4. Klonování a transformace	16
3.5. Sekvenování a úprava sekvencí	16
3.6. Fylogenetické analýzy	16
4. Výsledky.....	17
5. Diskuze.....	26
6. Závěr.....	29
7. Použitá literatura	30

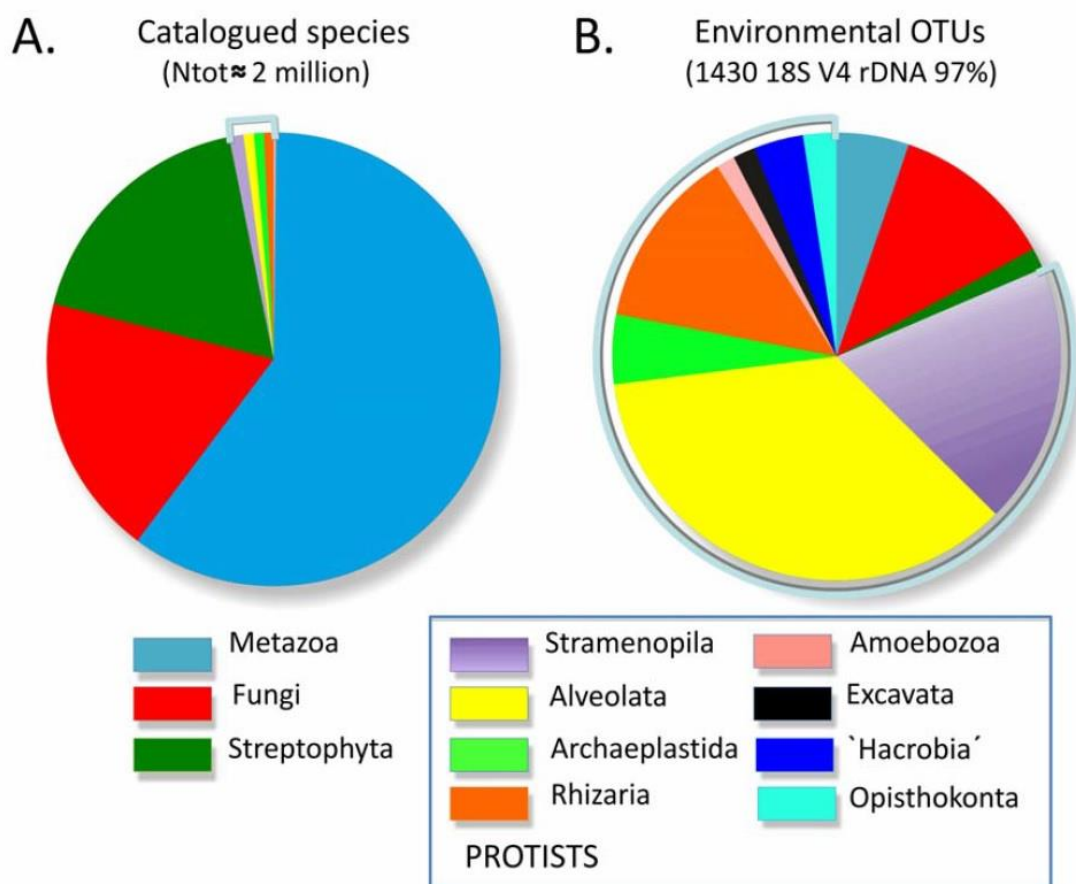
1. Úvod

1.1. Určení druhů organismů a jejich diverzity v prostředí

Odhad diverzity a abundance organismů v daném prostředí je nezbytný předpoklad pro poznání funkce ekosystému a pro jeho účinnou ochranu (Thornhill et al. 2007). Díky relativně dlouhé tradici přírodních věd máme, snad s výjimkou hmyzu, poměrně dobrou představu o diverzitě makroskopických organismů, tzn. rostlin, části hub a živočichů (Monastersky 2014). Mnohem horší situace je u mikroskopických jednobuněčných forem eukaryot, prvoků, kde jsme až do nedávna znali jen velmi malou frakci skutečné druhové rozmanitosti (Pawlowski et al. 2012). Vzhledem k rozlehlosti a odlehlosti pro mikrosvět oceánu to platí ještě více než pro pevninský ekosystém. Mezi mořské prvoky spadá mnoho heterogenních autotrofních nebo heterotrofních jednobuněčných organismů s různou velikostí patřících do mnoha skupin eukaryot (Caron et al. 2012). V dřívějších dobách byl při popisu nových prvoků používán klasický přístup– morfologický popis organismů při pozorování v mikroskopu. Často jsme ale naráželi na problémy způsobené malou velikostí a s nimi spojenou absencí morfologických znaků. Navíc naprostou většinu mořských (nejenom) prvoků zatím neumíme kultivovat (Potter & Lajeunesse 1997; Rappé & Giovannoni 2003; Thornhill et al. 2007). Proto je přínos molekulárních metod, jako je sekvenování DNA nesporný, obchází všechny výše zmíněné problémy a poskytuje nám tak jiný pohled na ekologii a evoluci těchto organismů skrze studie založené na zkoumání diverzity mikrobiální DNA (případně RNA) (Thornhill et al. 2007). Díky těmto studiím se prokázala vysoká diverzita prvoků, jejich důležitost pro ekosystém a byly nově objevené i nové, ekologicky velmi důležité skupiny (de Vargas et al. 2015; Bork et al. 2015; Brum et al. 2015; Sunagawa et al. 2015; Armbrust & Palumbi 2015) (Obr. 1).

Starší, klasické metody sekvenování, jako bylo Sangerovo a Maxam-Gilbertovo sekvenování (Sanger et al. 1977; Maxam & Gilbert 1977), se nemohou vyrovnat novým metodám tzv. sekvenování druhé generace (new-generation sequencing, NGS) z 21. století, které umožňují paralelní čtení sekvence mnoha miliónů molekul DNA v jednom sekvenačním běhu (Glenn 2011). NGS nemají však jen výhody, hlavní nevýhodou oproti klasickým metodám je kratší délka výsledných sekvencí, a to 35–700 párů bází (u Sangerovy metody je to přibližně 1000 párů bází) (Goodwin et al. 2016; Heather & Chain 2016; Morey et al. 2013). Přesto výhody NGS předchází nevýhody a poznatky ze sekvenování se využívají v mnoha

ekologických, medicínských i archeologických výzkumech (Morey et al. 2013; Seersholm et al. 2016; del Campo et al. 2016; Lozupone et al. 2012).



Obr. 1: Morfologický (A- relativní počet popsáných druhů na skupinu) versus genetický (B- relativní počet V4 18S rDNA OTUs) pohled na diverzitu všech známých eukaryot (Pawlowski et al. 2012).

1.2. Environmentální sekvenování

Díky rozvoji nových sekvenačních metod se vyvinula mnohá navazující odvětví. Jedním z nich je i jeho environmentální využití. Environmentální sekvenování je poměrně nový postup používající sekvenování DNA všech organismů, vyskytujících se v daném ekosystému, pomocí environmentálního vzorku odebraného z reprezentativní části prostředí (voda, písek,...) (Streit & Schmitz 2004). Environmentální sekvenování tak přináší výhodu sekvenování vzorků DNA izolovaných přímo z prostředí bez nutnosti nejprve dané organismy kultivovat v omezeném množství živných médií. Chybějící sekvence organismů, neschopných

přežít ve známých médiích, nebylo možné zařadit do celkového vyhodnocení. Výsledky proto logicky podhodnocovaly diverzity velké části eukaryotických linií (Rappé & Giovannoni 2003; Pawlowski et al. 2012).

Environmentální sekvenování využívá dvou odlišných principů. První spočívá v čtení celých genomů nebo transkriptomů jednotlivých buněk, neboli SCS (Single Cell Sequencing) nebo také meta–genomika/transkriptomika (Bragg & Tyson 2014; Gawryluk et al. 2016), druhý přístup je založen na sekvenování krátkých variabilních amplikonů, zvaných barkódy, nebo tagy (Taberlet et al. 2012). V případě meta–genomiky/transkriptomiky narážíme na limity současných sekvenačních technologií, respektive na malé množství DNA/RNA přítomné v daném vzorku pro daný taxon. Pro úspěšné přečtení reprezentativní části genomu je totiž stále nutné relativně velké množství DNA, řádově ze stovek až tisíců buněk, což u prvoků, na rozdíl od mnohobuněčných živočichů, může být podstatný problém. Částečné řešení nabízí tzv. „amplifikace celého genomu (Whole Genome Amplification, WGA) kdy z pikogramů RNA/DNA dojde k namnožení nukleových kyselin do potřebného množství (Yilmaz & Singh 2012). Může se ovšem stát, že některé úseky jsou kopírovány častěji než jiné, a proto se nepřečte celý genom buňky, ale jen jeho část. Pro většinu eukaryot také stále nejsou k dispozici přesné modely genů a pozice intronů a exonů je těžké určit. Přesto tímto způsobem můžeme získat mnoho potřebných informací o potenciálním buněčném metabolismu. Existují dva hlavní přístupy: single cell genomics (SCG), charakterizující celý genom na úrovni DNA, a single cell transcriptomics (SGT), popisující všechny aktivní geny které jsou v okamžiku izolace přepisovány do messenger (m)RNA (Keeling & del Campo 2017).

Nejčastěji se však environmentální sekvenování používá ke zkoumání diverzity organismů v daném prostředí, k tomu nám postačí pouze informace z vysoce variabilních amplikonů – molekulárního barkódu. Společně s výběrem úseku DNA vhodného pro stanovení diverzity (ideálně) většiny organismů ve vzorku je zde řešen i problém malého množství nukleových kyselin, a to pomocí PCR, při které dochází k namnožení vybraného úseku (Metzker 2010) z minimálního množství startovního materiálu. Amplikon musí obsahovat jak variabilní, tak i konzervované oblasti, aby daný úsek postihl co nejširší škálu taxonomických úrovní. Proto je u prvoků používána malá podjednotka genu pro ribozomální RNA (SSU nebo 18S rRNA) (Leray & Knowlton 2016), jejíž výhodou je hlavně výskyt u všech eukaryot a pomalé evoluční tempo umožňující posouzení evolučních vztahů i u vzdáleně příbuzných druhů. Další výhodou je i nízký výskyt kopií rRNA o různé sekvenci

(paralogů) uvnitř jedné buňky a minimální frekvence laterálního přenosu genů mezi různými organismy, které by negativně ovlivnily přesnost následných analýz (Vaulot et al. 2008), Nedávno popsáný případ laterálního přenosu tohoto genu mezi třídou *Perkisea* a rodem *Ciliophyris* (Stramenopila) (Yabuki et al. 2014) je spíše výjimkou potvrzující pravidlo. Gen 18S rRNA obsahuje devět hypervariabilních oblastí (V1–V9) uložených ve stabilní neměnné sekvenci (Leray & Knowlton 2016). Dříve používaný krátký V6 úsek (Sogin et al. 2006; Huber et al. 2007), byl postupně nahrazen více informativními doménami V4 a V9 (Pawlowski et al. 2012; Amaral-Zettler et al. 2009). V současnosti patří mezi nejpoužívanější V1, V2, V4 a V9 (Leray & Knowlton 2016). Krátké hypervariabilní oblasti jsou používány kvůli kratší velikosti sekvencí, které NGS metody vyžadují (Keeling & del Campo 2017). Ovšem univerzální primery amplifikující tyto úseky v sobě skrývají problém nestejně efektivity pro všechny skupiny organismů (Amaral-Zettler et al. 2009). Například studie založené na V4 nezahrnovaly informace o skupině Euglenozoa, a tak jejich diverzita byla objevena až po použití V9 amplikonu (Keeling & del Campo 2017; Flegontova et al. 2016). Tento nedostatek může být způsoben kromě specificity primerů taktéž délkou amplikonů: V4 oblast má oproti V9 vysoce variabilní délku napříč hlavními eukaryotickými skupinami (Pawlowski et al. 2011).

Nejběžnější postup environmentálního sekvenování zahrnuje následující kroky: 1) sběr buněk, který zahrnuje třídění podle velikosti (podle jemnosti použitých filtrů), díky němuž získáme detailnější informace o jednotlivých velikostních třídách; 2) zpracování vzorku: izolace DNA, nebo izolace RNA se syntézou komplementární (c)DNA; 3) amplifikace pomocí PCR; 4) příprava sekvenačních knihoven; 5) sekvenování; 6) odstranění „šumu“ a spojení stejných sekvencí do barkódů společně s údaji o jejich početnosti; 7) odstranění chybových sekvencí nebo tzv. chimér (hybridní sekvence vzniklé při PCR amplifikaci, které mohou být považovány za nové organismy a ovlivnit tak výslednou diversitu (Haas et al. 2011)); 8) rozdělení barkódů do tzv. operačních taxonomických jednotek (OTUs) podle limitu předdefinovaného do určité rozdílnosti mezi sekvencemi (např. 3%); 9) rozdělení do taxonů (není nutné řazení barkódů do OTUs) nebo porovnání s rozsáhlou databází; 10) provedení různých analýz ohledně relativní hojnosti, bohatosti OTU jednotek, biogeografii, nebo vytváření vzorů pro společný výskyt OTUs jednak pro celé společenství, nebo pro určité taxonomické skupiny (Flegontova 2017; Leray & Knowlton 2016; Brown et al. 2015).

Každá úprava výše uvedeného postupu může ovlivnit celkové výsledky studie. První problém spočívá už při výběru nukleové kyseliny. Ačkoliv je díky své stabilitě a relativní

snadnosti izolace DNA dobře využitelná pro mnohé studie (de Vargas et al. 2015; Pernice et al. 2016), musíme počítat s přítomností i DNA z poškozených či mrtvých buněk a s mimobuněčnou DNA vyskytující se v prostředí právě díky její stabilitě (Nielsen et al. 2007; Not et al. 2009). Volná RNA v prostředí degraduje v řádu několika minut až hodin, proto je vhodnější pro výzkum „okamžité“ diverzity (tzn. organismů vyskytujících se na daném místě v daný okamžik) (Pochon et al. 2017). Tato výhoda RNA je důležitá hlavně u analýz mořských bentických sedimentů, proto studie zabývající se o sedimenty používají pro metabarkódování hlavně RNA (Stoeck et al. 2007; Forster et al. 2016a).

Další problém způsobuje počet kopií genů daného metabarkódu na buňku, který je u různých organismů odlišný (Medinger et al. 2010; Zhu et al. 2005). Počet těchto kopií je následně využit pro určení relativní četnosti daného organismu. Ukázalo se, že počet rDNA nezáleží jen na velikosti samotné buňky a jejího genomu (Not et al. 2009; Countway et al. 2007; Prokopowich et al. 2003), ale u některých malých organismů (např. picoeucaryota) i na příslušnosti k určité taxonomické skupině a také se předpokládá závislost na životní strategii buněk (Not et al. 2009). Proto se na odhalení skutečné abundance (hojnosti) nepoužívá DNA, ale RNA metabarkódování nebo fluorescentní in situ hybridizace (FISH) (Giner et al. 2016; Massana et al. 2015).

Poslední a důležitý krok je zařazení pozorovaných OTU do vyšších taxonomických jednotek. Probíhá vyhledáváním barkódů nebo OTUs v referenční databázi použitím BLASTu, ggsearch a jim podobným. Přičemž za neznámé jsou označeny sekvence s podobností menší než podle de Vargas et al. (2015) 80% a podle Massana et al. (2015) ~85%. Existuje několik referenčních databází se kterými můžeme výsledky srovnávat. Jednou z nich je SILVA, obsahující informace zejména o prokaryotech, nebo PR2 databáze, specializovaná na prvoky a další eukaryota (Guillou et al. 2013; Pruesse et al. 2007).

1.3. Současný pohled na ekosystém oceánu

Oceány tvoří nejnápadnější a největší ekosystém planety Země. Zahrnují 70 % zemského povrchu, s ohledem na objem dokonce až 99 % (Bigg et al. 2003; Kaiser 2011). Ovlivňují život na celé planetě, a přesto zůstávají stále z větší části neprozkoumány. Víme málo nejen o oceánech, ale i o životě v něm. Lidé mají tendenci se zabývat makroskopickými organismy a přehlížet ty mikroskopické, ačkoli tvoří až 98 % celkové biomasy i biodiverzity oceánů. Mořský plankton má globální vliv na biogeochemické procesy (de Vargas et al. 2015), vytváří přibližně polovinu veškeré primární produkce Země (Field 1998), tvoří základ

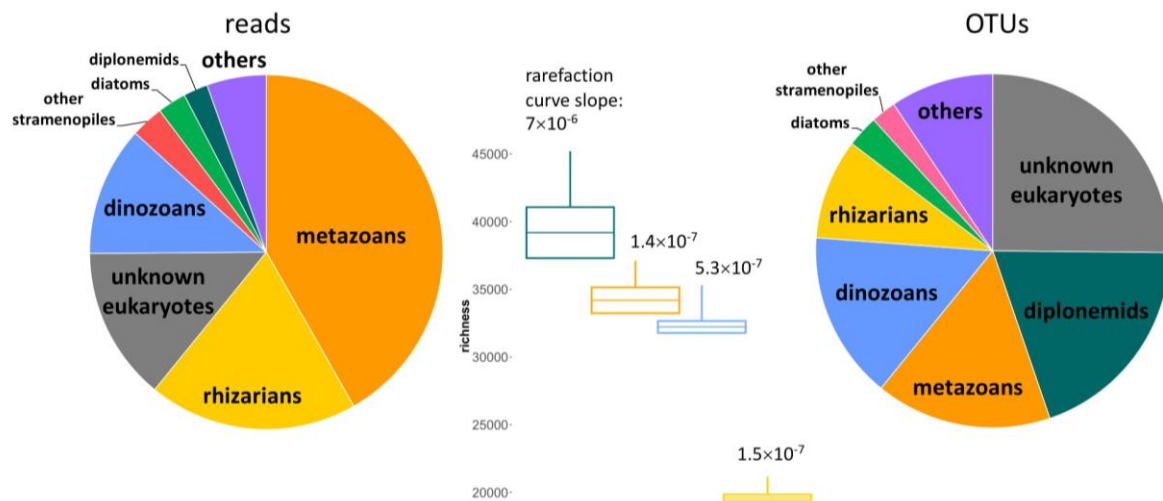
potravních sítí- primárních producentů, konzumentů i dekompozitorů, a spojuje různé stupně trofických pyramid (Caron et al. 2012). Biom horní vrstvy oceánů má funkci membrány vytvářející předěl mezi atmosférou a hlubšími vodami. Zdejší plankton přeměňuje CO₂ a další anorganické prvky v organický materiál, který vstupuje do potravního řetězce, kde se může buď přeměnit zpět v anorganický, nebo může klesnout do hloubky a zůstat zde po miliony let (de Vargas et al. 2015).

V poslední letech je patrná zvýšená snaha porozumět oceánskému ekosystému, jeho vlivu na biogeochemické cykly a také jestli a jaký vliv má globální změna klimatického prostředí na oceánské procesy a mořskou biodiverzitu. Mezi důležité expedice patřil například *Sorcerer II* (2003–2010) či *Malaspina* expedice (2010–2011), jejichž zájmem byla metagenomika prokaryot z povrchu oceánu a z batypelagické zóny (>1000 m hloubky). Další a nejobsáhlejší z nich byly expedice *TARA Oceans* (2009–2012) a *TARA Oceans Polar Circle* (2013), které nabraly celkem přes 35000 vzorků mořské vody a planktonu z 210 míst ve 20 biogeografických provinciích oceánských oblastí (Pesant et al. 2015) a snažily se zachytit jak morfologickou, tak genetickou diverzitu celé planktonní společnosti (Bork et al. 2015), od virů až po larvy mořských živočichů (Pesant et al. 2015). Zaměřily se hlavně na fotickou zónu oceánů (do 200 m), ale vzorky byly sbírány až do hloubek 2000 m (Bork et al. 2015; Zhang & Ning 2015). *TARA Oceans* expedice tak doplňují informační mezery z předchozích průzkumů o mezopelagickou zónu (100–1000 m) (Lukeš, et al., 2015; Pesant et al., 2015).

Výsledky studie de Vargase (2015) z této expedice ukázaly obrovskou druhovou rozmanitost planktonu, která mnohonásobně předčila předchozí odhady. Ze závěrů odhadují, že odkryli okolo 75 % celkové diverzity planktonu oceánů. Následné mapování metabárekodů (V9 variabilní oblast malé ribozomální podjednotky) na referenční databázi PR2 (Guillou et al. 2013) ukázalo, že až 85 % celkové ribozomální diverzity tvoří prvoci (de Vargas et al., 2015). Pomocí extrapolace zjištěné diverzity na odhad počtu druhů (Mora et al. 2011), se celkový počet potenciálních druhů žijících v oceánech dostává až na 16,5 milionů (de Vargas et al. 2015). Studie odhalila mnoho nových rodů, například i ve všeobecně prozkoumané skupině, jako jsou rozsivky (Malviya et al. 2016). Jako nejdiverzifikovanější skupiny prvoků vyskytující se ve fotické zóně se ukázaly Alveolata, Rhizaria a Excavata. Avšak nejvíc překvapující byl nález velkého množství sekvencí, patřící do třídy Diplonemea (de Vargas et al. 2015).

1.4. Diplonemy

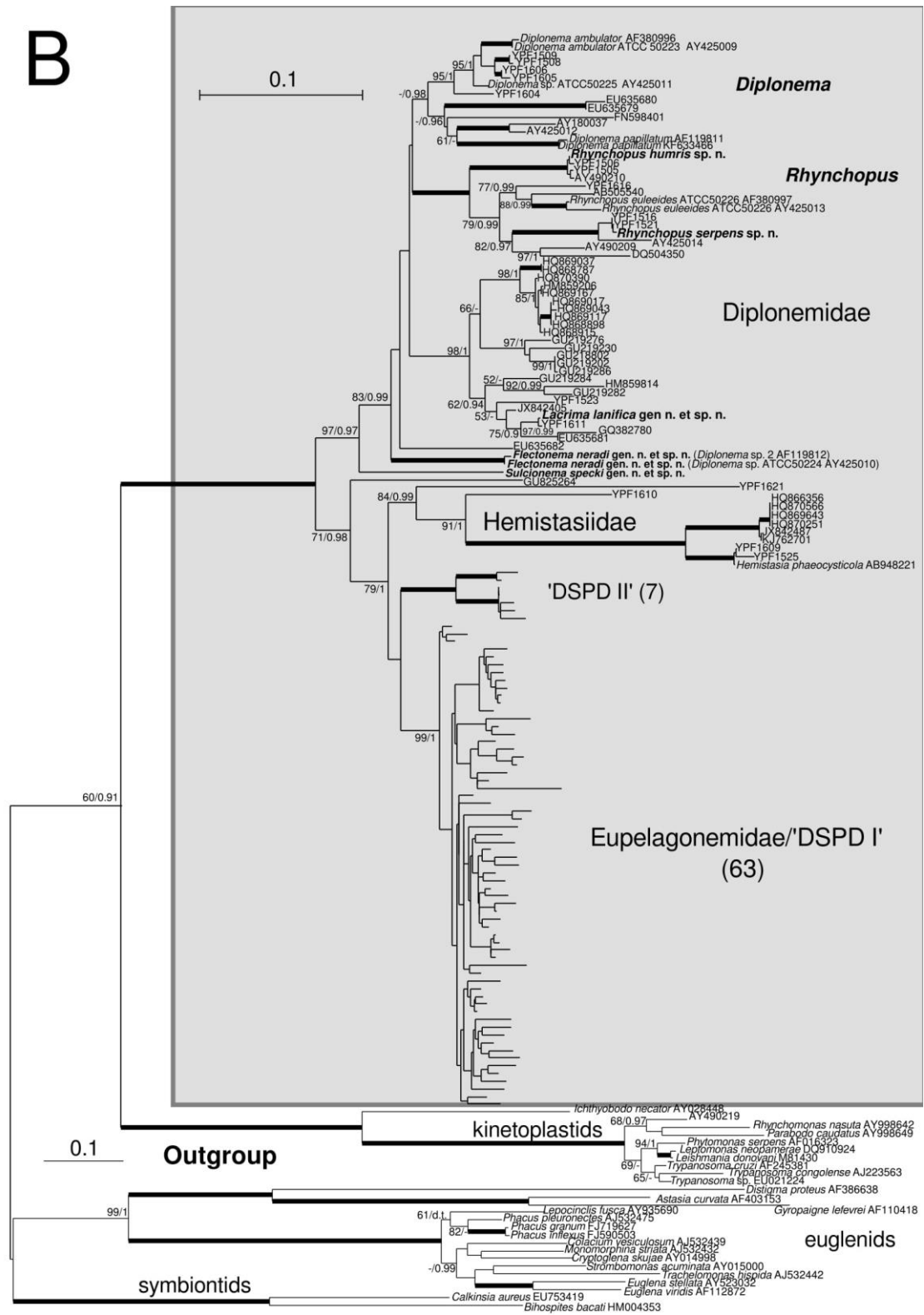
Diplonemea jsou heterotrofní dvoubičíkatí jednobuněční prvoci, patřící do skupin Excavata– Discoba, kmene Euglenozoa společně například s kinetoplastidy, kam řadíme mnoho významných patogenů jako *Trypanosoma*, *Leishmania* a *Phytomonas*, nebo s fotosyntetickými euglenidy s nejběžnějším rodem *Euglena* – Krásnoočko (Lukeš et al. 2015; Adl et al. 2012), přičemž blíže mají pravděpodobně ke kinetoplastidům (Simpson & Roger 2004). První druh, *Diplonema breviciliata*, byl popsán už roku 1913 (Griessmann 1913), avšak donedávna byly nacházeny jen velmi zřídka a zejména z brakických a pobřežních vod. Popsáno bylo jen pár druhů ze dvou rodů: *Diplonema* a *Rhynchopus*. S nástupem environmentálního sekvenování se začaly objevovat sekvence příbuzné klasickým diplomemám, poprvé popsané z antarktické oblasti ve vzorcích sbíraných v 3000 metrech (López-García et al. 2001). Zprávy o tomto kládu diplomem postupně přibývaly a Lara et al. (2009) popisuje několik desítek sekvencí z většiny oceánů. Stále však unikaly pozornosti širší vědecké veřejnosti a známy byly spíše svým bizarním uspořádáním mitochondriální DNA (Marande & Burger 2007). Zveřejnění výsledků Tara Oceans expedice týkajících se diverzity planktonu v oceánech však diplomemy katapultovalo do popředí zájmu protozoologů. Diplonemy se totiž staly třetí druhově nejbohatší a šestou nejpočetnější skupinou planktonu svrchní vrstvy oceánů. (de Vargas et al. 2015). Podrobnější studie ukázala, že po započtení dat z hlubších vrstev oceánu jsou diplomemy dokonce vůbec druhově nejpočetnějšími planktonními eukaryoty (Flegontova et al. 2016; Gawryluk et al. 2016) (Obr. 2). Nejpravděpodobnější vysvětlení dlouhodobého přehlížení tak obrovské a zjevně významné skupiny prvoků se nachází v odlehlosti a obrovské rozloze oceánského ekosystému, jakožto i metodickým omezením výzkumu heterotrofických prvoků. Naprostou většinu druhů/ribotypů diplomem tak známe pouze díky krátkému V9 metabarkódu. Víme tak pouze, že jde o kosmopolitní malé organismy (do 20 μm), jejichž rozšíření postrádá biogeografickou strukturu a centrum druhové bohatství je soustředěno v hlubších vrstvách oceánu (Flegontova et al. 2016; Gawryluk et al. 2016; Lukeš et al. 2015).



Obr. 2: Rozdělení bohatosti a abundance diplomem s dalšími pěti nejdíverzifikovanějšími skupinami planktonních eukaryot v rozsáhlém datasetu Tara Oceans (Flegontova et al. 2016).

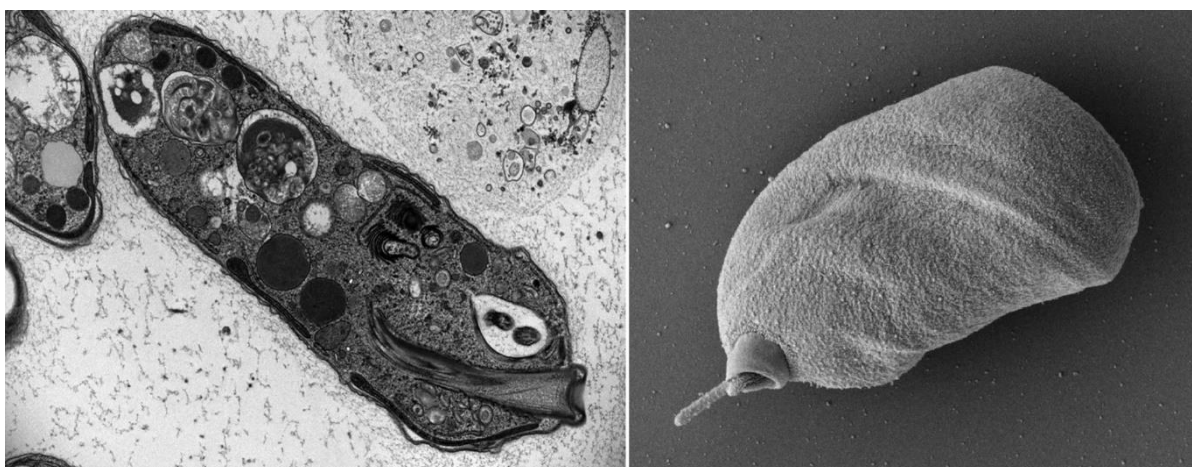
První objevené druhy diplomemid vědci nejprve zařazovali k euglenám, nebo mezi jejich blízké příbuzné, například *Diplonema breviciliata*, *Rhynchopus amitus* nebo *Isonema nigricans* (Skuja 1948; Schuster et al. 1968; Griessmann 1913). Později si Triemer a Ott (1990) uvědomili fakt, že dvě skupiny, *Diplonema* a *Isonema*, mají být spojeny do jednoho rodu. Ale kompletní samostatná skupina diplomem, patřící do kmene Euglenozoa, vznikla až v roce 1993 (Cavalier-Smith 1993). Od té doby se pohled na tuto skupinu podstatně změnil. Došlo k zařazení dříve popsáného rodu *Hemistasia* k diplomemám (Yabuki & Tame 2015). Za druhé se přišlo na fakt, že doposud známé dva rody (*Diplonema* a *Rhynchopus*) patří do skupiny Diplonemidae (Tashyreva et al., v tisku). Na základě environmentálních sekvencí byly objeveny další dvě skupiny: DSPD I a II (deep-sea pelagic Diplonemids I a II) (Lara et al. 2009). Podle studie Lary (2009) existují dvě možnosti fylogenetického uspořádání těchto skupin, buď se na bázi objevuje DSPD II a od nich odvozené DSPD I a klasické diplomemy (Diplonemidae) tvoří sesterské klady. Druhá možná varianta umísťuje Diplonemidae na bázi a DSPD I a II se stávají odvozenými sesterskými skupinami. Dle výzkumu Flegontovy (2017), Okamoto et al. (v recenzním řízení) a Tashyreva et al. (v tisku) je ale členění třídy Diplonemea následující: Diplonemidae (rody *Diplonema*, *Flectonema*, *Lacrima*, *Rhynchopus*, *Sulcionema*), Hemistasiidae (*Hemistasia*), Eupelagonemidae (dříve DSPD I, *Eupelagonema*), a DSPD II (Obr. 3). Přičemž jejich vzájemný fylogenetický vztah nelze na základě SSU rDNA spolehlivě určit. Důležitým zjištěním tohoto výzkumu byla taktéž diverzita (dle OTUs) čeledi Eupelagonemidae, která předčí nejen ostatní čeledi diplomemidů, všechny skupiny exkavat, ale i diverzitu významných eukaryotických skupin mořského planktonu, jako jsou všechny

eukaryotické linie Alveolata, Rhizaria, Stramenopiles, Opisthokonta, Amoebozoa a Archaeplastida (de Vargas et al. 2015; Lukeš et al. 2015; Flegontova et al. 2016).



Obr. 3: *Fylogenetický strom skupiny Diplonemea (Tashyreva et al., v tisku).*

Morfologie čeledi Diplonemidae je poměrně známá. Jedná se o bezbarvé, podlouhlé, nebo eliptické buňky, přibližně do 20 μm dlouhé, s apikální papilou a dvěma bičíky, vystupující ze subapikální rýhy (Roy et al. 2007). Mořští diplonemidé z navrhované čeledi Eupelagonemidae byli odchyceni a pozorováni až ve výzkumu Gawryluka et al. (2016) a Okamoto et al. (v recenzním řízení). Lišili se jak ve velikosti (7–25 μm), tak ve tvaru, přesto u všech byly pozorovány apikální papily i bičíky.



Obr. 4: Vlevo ultrastruktura dosud nepopsaného druhu rodu *Diplonema* (snímek z transmisního elektronového mikroskopu). Vpravo další dosud nepopsaný druh rodu *Diplonema* (snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu). Snímky G. Prokopchuk (Lukeš 2017).

Stejně jako jejich sesterská skupina kinetoplastida, vlastní diplonema jeden z největších mitochondriálních genomů, srovnatelným s některými vyššími rostlinami (Marande et al. 2005). Mitochondriální genom je složen z tisíců kruhových molekul DNA, které tvoří buď jednu velkou propojenou síť, nebo se vyskytují ve formě volných nadšroubovic DNA (Lukeš et al. 2015). Na rozdíl od kinetoplastidů, kteří mají vláknitou mitochondrii plnou velkého množství malých a diskoidních krist, mitochondrie diplonem mají améboidní strukturu s málo se vyskytujícími velkými a rovnými kristami (Marande et al. 2005). RNA editing je také přítomen a zdá se, že běží podle podobného mechanismu například jako u dobře prozkoumané trypanozómy. Nicméně diplonemy mají vyvinutý trochu jiný způsob mitochondriálního přepisu. Každá kruhovitá molekula DNA kóduje pouze jeden fragment genu, kdy jsou následně jednotlivé fragmenty transkribovány a spojovány pomocí prozatím nejasného transplicing mechanismu. Tento krok musí být opravdu extrémně přesný, musí být schopný

najít mezi velkým množstvím fragmentů ten pravý a spojit je s ostatními, a to ve správném pořadí a poloze. Už sám o sobě to je mechanismus zvláštní a nemající u jiných skupin obdoby, navíc je dále komplikován omezenou úpravou RNA (Lukeš et al. 2015).

Ekologie diplomem je ve větší míře stále neznámá. Druhy z čeledi Diplonemidae jsou převážně bentické a mezi jejich potravní strategie patří osmotrofie, fagocytóza, detritofagie a příležitostně parazitismus (Roy et al. 2007). Důkladně prozkoumán je způsob života u rodu *Rhynchopus*, který je parazitem rozsivek, humrů, krabů i škeblí (Schnepf 1994; Heyden et al. 2004; Kent et al. 1987), a rod *Diplonema* je popsán jako parazit/predátor škeblí a mořské trávy rodu *Halophila*, taktéž je spojován s náhlým úpadkem růstu kryptokoryn v akváriích (Larsen & Patterson 1990; Marande et al. 2005). Do skupiny Hemistasiidae patří parazité/predátoři různých mořských planktonních eukaryot, od haptophyt, obrněnek, rozsivek až po klanonožce (Yabuki & Tame 2015; Elbrächter et al. 1996). Biologie čeledi Eupelagonemidae je neznámá, k dispozici máme pouze nepřímé důkazy. Tyto hlavně planktonní druhy jsou některými považovány za predátory ostatních eukaryot, parazity a pravděpodobně i symbionty (Lima-Mendez et al. 2015; Lukeš et al. 2015). Vyloučena je pouze myxotrofie a fototrofie, napovídá tomu hlavně výskyt v hloubkách, kde již nelze využít světla jako zdroje energie (Lukeš et al. 2015; Flegontova et al. 2016). Ačkoli výše uvedené studie naznačují, že velká část pelagických diplomem má převážně parazitický způsob života, existuje několik vážných argumentů, které tuto domněnku vyvrací. Jednak by se svou obrovskou diverzitou museli infikovat většinu mořských organismů. Sice by více druhů mohlo mít jednoho hostitele, to je ale nepravděpodobné, protože hlavní hybnou silou speciace parazitů je hostitelská specializace. Další argument souvisí s místem výskytu. Relativní četnost a druhové bohatství diplomem roste s hloubkou, kde však klesá počet potenciálních hostitelů (Lukeš et al. 2015). Třetí důvod se nachází v *in silico* analýze interakcí mezi jednotlivými taxony z *Tara Oceans* datasetu V9 barkódů (de Vargas et al. 2015; Lima-Mendez et al. 2015). Výsledky analýzy ukazují na jednoznačné interakce mezi jednotlivými známými skupinami planktonních parazitů (jako jsou např. MALV/Syndiniales a výtrusovci) a jejich předpokládanými hostiteli, u diplomem jakýkoliv jasný signál chybí a statisticky významných interakcí je obecně málo (Lima-Mendez et al. 2015; Flegontova et al. 2016). Poslední fakt hovořící proti parazitismu přináší studie Gawryluka (2016), kde všech deset single-cell genomů skupiny Eupelagonemidae mělo odhadovanou velikost přes 300Mbp (některé dokonce přes 1 Gbp), což špatně koresponduje s kompaktností doposud popsaných genomů parazitických prvoků. Autoři studie ovšem předpokládají, že aspoň někteří eupelagonemidé se živí na skupinách prasinophyt a haptophyt.

2. Cíle práce

Výsledky analýzy V9 metabárkódů pořízených během expedice *Tara Oceans* ukazují na vertikální (hloubkovou) stratifikaci eupelagonemích společenstev, tzn. eupelagonemy z hlubin se liší od těch z hladiny (Flegontova et al. 2016). Bohužel, k dispozici jsou vzorky pouze ze tří hloubek (hladina, hluboké chlorofylové maximum a vysoce variabilní sampling v mezopelagické zóně), přičemž první dvě zóny převažují. Není tedy jasné, jestli je tato stratifikace pozvolná, nebo v určité hloubce dochází ke zlomu, na kterém se složení přítomných eupelagonem prudce změní. Obecným cílem této práce je na příkladu dvou lokalit z Jaderského moře, u nichž jsou k dispozici vzorky v celém hloubkovém spektru (od hladiny až ke dnu), pomocí metody environmentálního sekvenování za pomoci specifických oligonukleotidů detekovat přítomné eupelagonemy a porovnat taxonomické zastoupení pro dané hloubky.

Specifické cíle:

- 1) přidat sekvence získané v rámci této práce ke globálnímu datasetu diplomem a zjistit, jestli patří mezi již známé skupiny nebo tvoří nezávislou fylogenetickou linii
- 2) porovnat pozorovanou diverzitu mezi oběma lokalitami a v rámci jednotlivých hloubkových zón
- 3) porovnat fylogenetickou strukturu diplomem na daných lokalitách a zjistit, jestli koreluje s hloubkovým gradientem
- 4) zjistit vhodnost lokalit pro případný podrobnější výzkum pomocí NGS

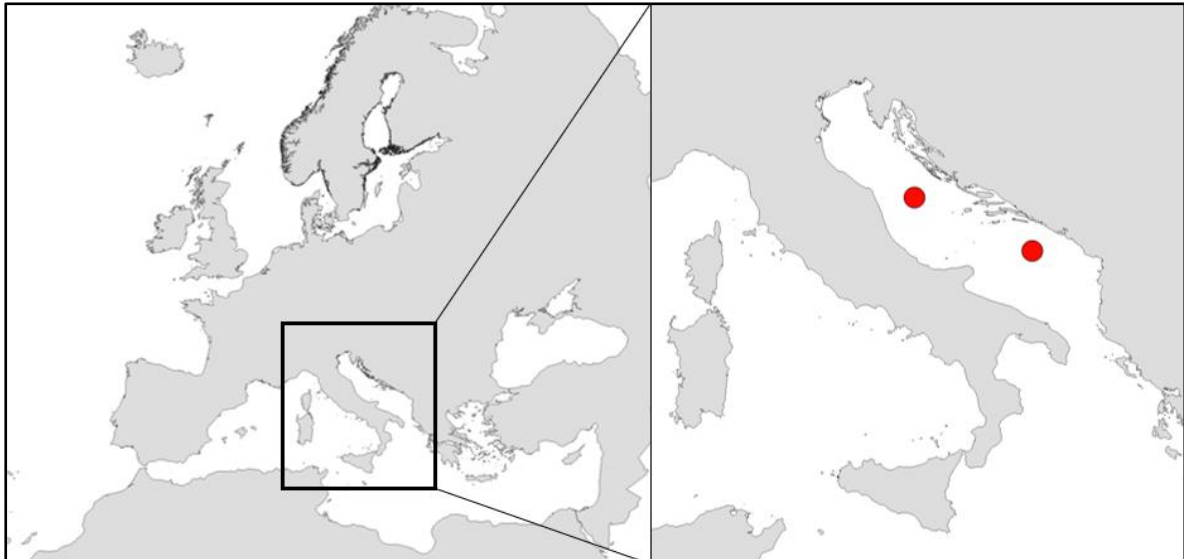
3. Materiály a metody

3.1. Vzorčky a izolace

Vzorčky pro tuto bakalářskou práci byly poskytnuty Dr. Danijelou Šantič z Institute of Oceanography and Fisheries Split, Chorvatsko (Tab. I). Sbírány byly v dubnu 2016 na dvou lokalitách v Jaderském moři (Obr. 5). Každý vzorek vznikl přefiltrováním cca 2 litrů mořské vody. Do izolace byly uchovávány na filtru v teplotě – 20 °C. Izolace DNA byla provedena pomocí kitu PowerWater DNA Isolation Kit (Mo Bio) podle přiloženého protokolu. Výsledná koncentrace (Tab. I) byla změřena přístrojem Qubit 2.0 (Invitrogen).

Tab. I: Tabulka vzorků s koncentracemi vyizolované DNA

Lokalita	Číslo vzorku	Hloubka (m)	Hloubková zóna	Koncentrace DNA (ng/μl)
245 43°22'38.6"N 14°44'55.6"E	2	20	epipelagiál	3.81
Deep chl max (50 m)	4	75	epipelagiál	2.98
	6	120	svrchní mezopelagiál	2.09
	8	256	svrchní mezopelagiál	0.603
9 42°07'20.2"N 17°46'41.8"E	17	2		1.88
Deep chl max (62 m)	18	62		4.24
	19	200	svrchní mezopelagiál	0.693
	20	350	svrchní mezopelagiál	0.648
	21	700	spodní mezopelagiál	0.327
	22	800	spodní mezopelagiál	0.675
	23	1000	spodní mezopelagiál	0.277
	24	1208	spodní mezopelagiál	0.243



Obr. 5: Mapa lokalit sběru vzorků

3.2. Polymerázová řetězcová reakce

Požadovaná část malé podjednotky 18S rRNA byla namnožena pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR). Všechny reakce měly vždy stejný celkový objem – 25 μ l. U amplifikace části genu, kde byla jako templát použita DNA izolovaná ze vzorků uvedených v Tab. I, se lišilo jen množství DNA podle její koncentrace (Tab. II). Složení bylo 12,5 μ l OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix (New England BioLabs), 0,5 μ l forward primeru DSPD F (5'-CCCTGCCGTGTGAAGATT-3'), 0,5 μ l reverse primeru DSPD R (5'-GTGRMCTGMATTWCTCCTT -3'), 0,5/1 μ l DNA (Tab. II) a dH₂O do 25 μ l celkového objemu. Oligonukleotidy byly navrženy dle sekvencí diplomemidů volně dostupných v NCBI a amplifikují část V4 variabilní domény SSU rRNA a 5' přílehlou oblast. Program je uveden v Tab. III. U PCR po klonování za účelem ověření klonů nesoucích inzertní DNA, tzv. klontestu, bylo místo templátové DNA použito nepatrné množství testované kolonie. Reakce se lišila v Master Mixech s polymerázou a reakčních programech (Tab. IV) podle použité polymerázy. Složení bylo 12,5 μ l Master Mixu, 1 μ l forward primeru M13F (5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCAC-3'), 1 μ l reverse primeru M13R (5'-AGCGGATAACAATTTACACAG-3'), 10,5 μ l dH₂O. Amplifikace byla provedena pomocí přístrojů T-Personal Thermocycler (Biometra), T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) a Mastercycler Pro (Eppendorf).

Tab. II: Množství použité DNA u jednotlivých vzorků PCR

Množství DNA na 1 reakci	Vzorky
0,5 μ l	2, 4, 6
1 μ l	8, 19, 20, 21, 22, 23, 24

Tab. III: Reakční program PCR pro DSPD primery

	Počáteční denaturace	Denaturace	Nasedání primerů	Počet cyklů	Syntéza	Finální syntéza
Teplota/ čas	94 °C/5 min	94 °C/15 s	50 °C/ 30 s	34	68 °C/1 min	68 °C/5 min

Tab. IV: Typy Master Mixů a reakční programy PCR pro M13 primery

Druhy polymeráz:		One Taq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix (New England BioLabs)	PPP Master Mix (Top-Bio)	Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs)
Reakční programy:	Počáteční denaturace	94 °C/4 min	94 °C/1 min	98 °C/30 s
	Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/15 s	98 °C/10 s
	Nasedání primerů	50 °C/30 s	55 °C/15 s	50 °C/15 s
	Syntéza	72 °C/2 min	72 °C/1 min	72 °C/20 s
	Počet cyklů	30	30	34
	Finální syntéza	72 °C/8 min	72 °C/7 min	72 °C/2 min

3.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla použita k oddělení fragmentů získaných v PCR a k potvrzení přítomnosti inzertů v koloniích po transformaci. Elektroforéza se prováděla v 1% agarózovém gelu s fluorescenčním barvivem GelRed (Biotium) za použití 1X TAE pufru. Správná velikost daných produktů byla určena pomocí DNA ladderu (GeneRuler 1kb, Thermo Scientific). Pro nanášení do gelu byl u Q5 Hot Start High-Fidelity 2X MM použit 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific). PCR produkty byly zviditelněny pomocí přístroje s UV spektrem – Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad), vyfoceny a upraveny v programu ImageLab.

3.4. Klonování a transformace

PCR produkty byly klonovány pomocí plasmidu použitím TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) a kompetentních buněk SURE 2 Supercompetent (Agilent technologies). Od příloženého protokolu (TOPO Cloning Kit) se postup lišil v délce heat-shocku, který probíhal 1 minutu a v množství napipetované směsi na ampicilinové misky- 100 μ l. Z bílých/inzert-pozitivních kolonií se udělala PCR a ověřené (pomocí gelové elektroforézy) PCR produkty z kolonií byly vyčištěny pomocí kitu GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma). Oproti protokolu byla místo elučního roztoku použita dH₂O. Koncentrace vyčištěných PCR produktů byla změřena na přístroji Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

3.5. Sekvenování a úprava sekvencí

Vyčištěné PCR produkty z kolonií byly sekvenovány společností Eurofins Genomics – produkt Mix2Seq Kit. Sekvence se upravovaly v programu Geneious. Nejprve byla zkontrolována jejich kvalita a následně se sekvence ověřily pomocí online nukleotidové databáze serveru NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Jednotlivé forward a reverse sekvence genů byly spojeny do tzv. contigů. Následné ořezání sekvencí primerů a vektorů proběhlo pomocí funkce VecScreen databáze severu NCBI BLAST. Po zalignování všech získaných kontigů společně s referenčním datasetem se zjistilo, že některé sekvence jsou antisense, ty se pomocí funkce *reverse complement* převedly do sense směru.

3.6. Fylogenetické analýzy

Sekvence získané v rámci této práce byly přidány k již známým – referenčním – sekvencím eupelagonemid z databáze NCBI. Díky značné velikosti takto vzniklého datasetu (308) a následným problémem s vizualizací fylogenetického stromu, byl počet referenčních sekvencí redukován pomocí programu Usearch (Edgar 2010) klastrováním na 97% hladině podobnosti. Tímto způsobem došlo ke snížení komplexity zhruba o třetinu (198 sekvencí) aniž by byl výrazněji narušen fylogenetický signál. Sekvence pak byly alignovány v programu MAFFT v. 7.266 (Katoh & Standley 2013) pomocí algoritmu LOCALPAIR. Výsledný alignment byl ořezán na délku mnou osekvenovaných krátkých fragmentů (cca 450 bp) v programu SeaView 4 (Gouy et al. 2010). Fylogenetická analýza upraveného alignmentu byla provedena metodou maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood) v programu IQTree v. 1.5 (Nguyen et al. 2015) podle evolučního modelu SYM+R4, který získal nejvyšší

hodnotu Bayesian Information Criterion (BIC) v modeltestu obsaženém v IQTree (-m MFP). Podpora větvení byla odhadnuta metodou „nonparametric-bootstrap“ ze stovky opakování ve výše uvedeném programu. Výsledná topologie byla převedena do grafického formátu SVG v SeaView 4 a následně upravena do výsledné podoby ve vektorovém grafickém editoru Inkscape 0.92.1 (<https://inkscape.org>). Průměrná genetická vzdálenost mezi jednotlivými páry pozic studovaných sekvencí byla změřena v programu MEGA 7.0.26 (Kumar et al. 2016). Analýza průměrné genetické vzdálenosti byla provedena použitím kompozitního modelu maximální věrohodnosti (Maximum Composite Likelihood model) (Tamura et al. 2004). Haplotypové sítě byly vytvořeny v programu PopART 1.7 (Leigh & Bryant 2015), pro zpracování zde získaného datasetu byl použit TCS algoritmus (Clement et al. 2000; Clement et al. 2002). Pro využití dat v PopARTu se alignment převedl do formátu Sequential NEXUS pro vytváření fylogenetických sítí pomocí online programu ALTER (Alignement Transformation EnviRonment, <http://sing.ei.uvigo.es/ALTER/> (Glez- Peña et al. 2010)). Jelikož výsledky haplotypových sítí se skupinami podle jednotlivých hloubek neukázaly žádnou závislost, byly hloubky spojeny do tří skupin– epipelagiál, svrchní mezopelagiál a spodní mezopelagiál (Tab. I). Také bylo kvůli redukci komplexity signálu nutné zklustrovat dataset, použitý pro některé haplotypové sítě. V tomto případě jsem sekvence klastrovala v programu Swarm v. 2.8.2. (Mahé et al. 2014; Mahé et al. 2015). Pro vznik klastrů sekvencí bylo nutné nastavit kritérium 10 mutačních událostí ($d=10$), jelikož defaultní nastavení ($d=1$), žádné shluky nevytvořilo.

4. Výsledky

Z celkového počtu 12 vzorků mělo 10 pozitivní signál na přítomnost diplomem. Jako negativní se projevíly hladinové vzorky u lokality 9, konkrétně vzorky č.: 17 a 18. Ze zbylých 10 pozitivních vzorků jsem pro fylogenetické analýzy klonováním vytvořila 96 sekvencí (přehled je znázorněn v tabulce (Tab. V)), z toho byly jen 2 identické, a to jedna z lokality 245 a hloubky 256 m, druhá z lokality 9 a hloubky 1208 m. Průměrná genetická vzdálenost párů jednotlivých pozic sekvencí byla pro lokalitu 245: 0.08, pro lokalitu 9: 0.074 a pro obě lokality dohromady: 0.078. Kompletní přehled průměrných genetických vzdáleností pro jednotlivé vzorky je vyobrazen v tabulce (Tab. V). Výsledky ukazují na 90–95% genetickou podobnost mezi vzorky, z čehož lze předpokládat, že mnohé jedinečné sekvence v získaném datasetu jsou samostatné druhy (viz Diskuze).

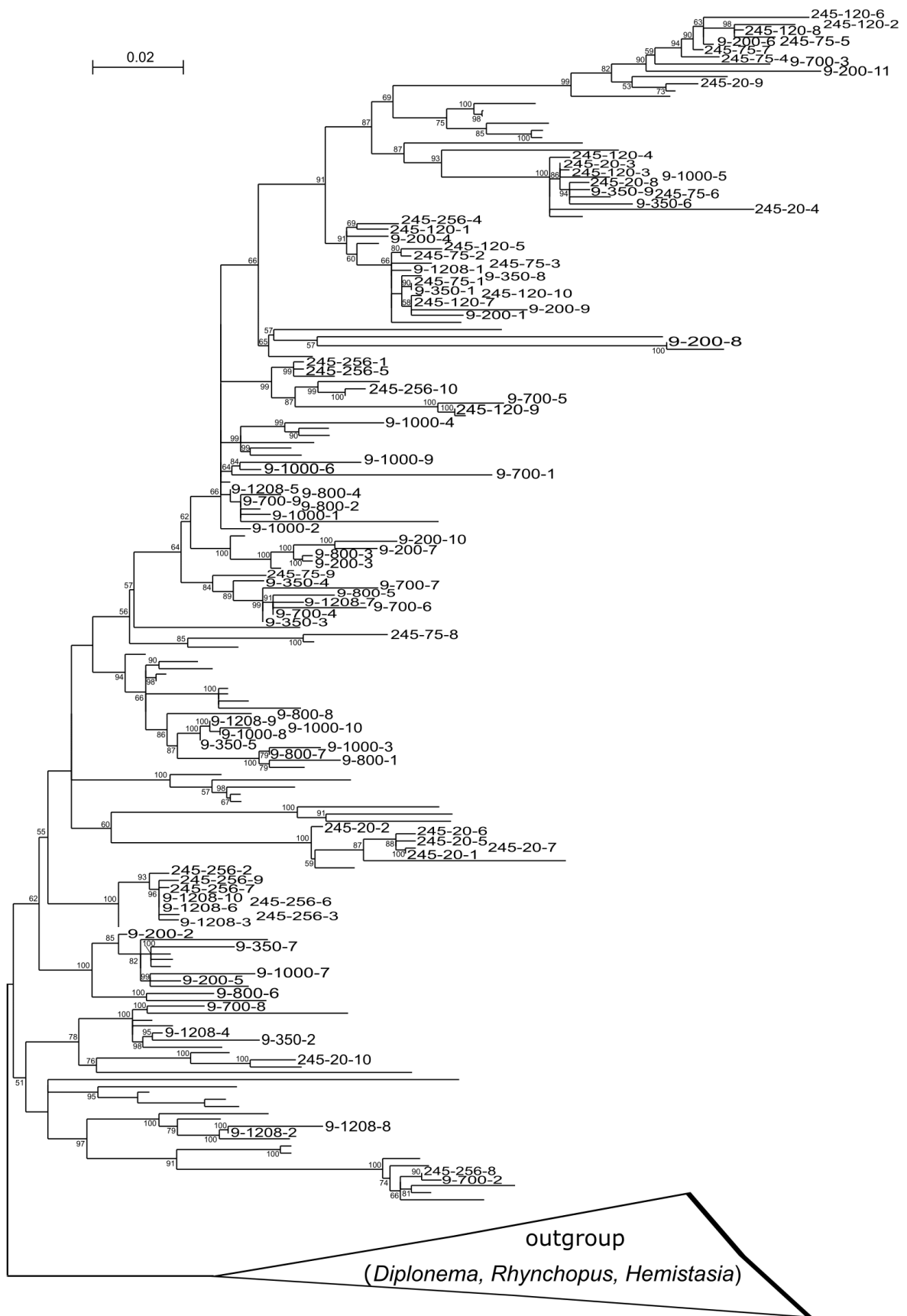
Z fylogenetického stromu (Obr. 6), vytvořeného z alignmentu ze získaných a vybraných referenčních sekvencí, lze vyčíst, že všechny získané sekvence patří do skupiny Eupelagonemidae, což se předpokládalo a potvrdilo kvůli specificitě primerů. Taktéž netvoří žádnou novou, od již známých sekvencí, jasně oddělenou skupinu v rámci eupelagonemid a přestože se spíše shlukují a nejsou náhodně rozesety, jejich výskyt je patrný po celém fylogenetickém stromě. Z výsledků stromu nelze určit přesnější schéma rozšíření podle hloubky ani podle lokality, ačkoli se ve stromě nachází pár oddělených klastrů. Dva klastry z lokality 9 a převážně větší hloubkou (700-1208 m a 350-1208 m) a jeden z lokality 245 s naopak malou hloubkou (20 m).

Haplotypové sítě, které jsou vhodnější pro popisování vztahů na nízkých taxonomických úrovních (populace a blízké příbuzné komplexy druhů, viz Diskuze) než klasické fylogenetické metody (Obr. 7– Obr. 12) zobrazují vzájemnou genetickou příbuznost jednotlivých sekvencí podle lokality a podle hloubky sběru vzorku jednotlivých oblastí. Z výsledků sítě s rozdělením dat podle lokalit (Obr. 7) není vidět fylogeografická struktura eupelagonem ze zkoumaných lokalit, což vzhledem k jejich relativní blízkosti není překvapující. Abychom však vyloučili, že jde o artefakt způsobený přílišnou komplexitou datasetu, použili jsme shlukovací program SWARM (Mahe et al. 2015). Při defaultním nastavením kritéria pro shlukování jedné mutační události ($d=1$) nedošlo k redukci komplexity (vzniku shluků/klastrů sekvencí), ta byla pozorována až při mnohem konzervativnějším nastavení ($d=10$). Ani tehdy však není na lokalitách patrná separace (Obr. 8).

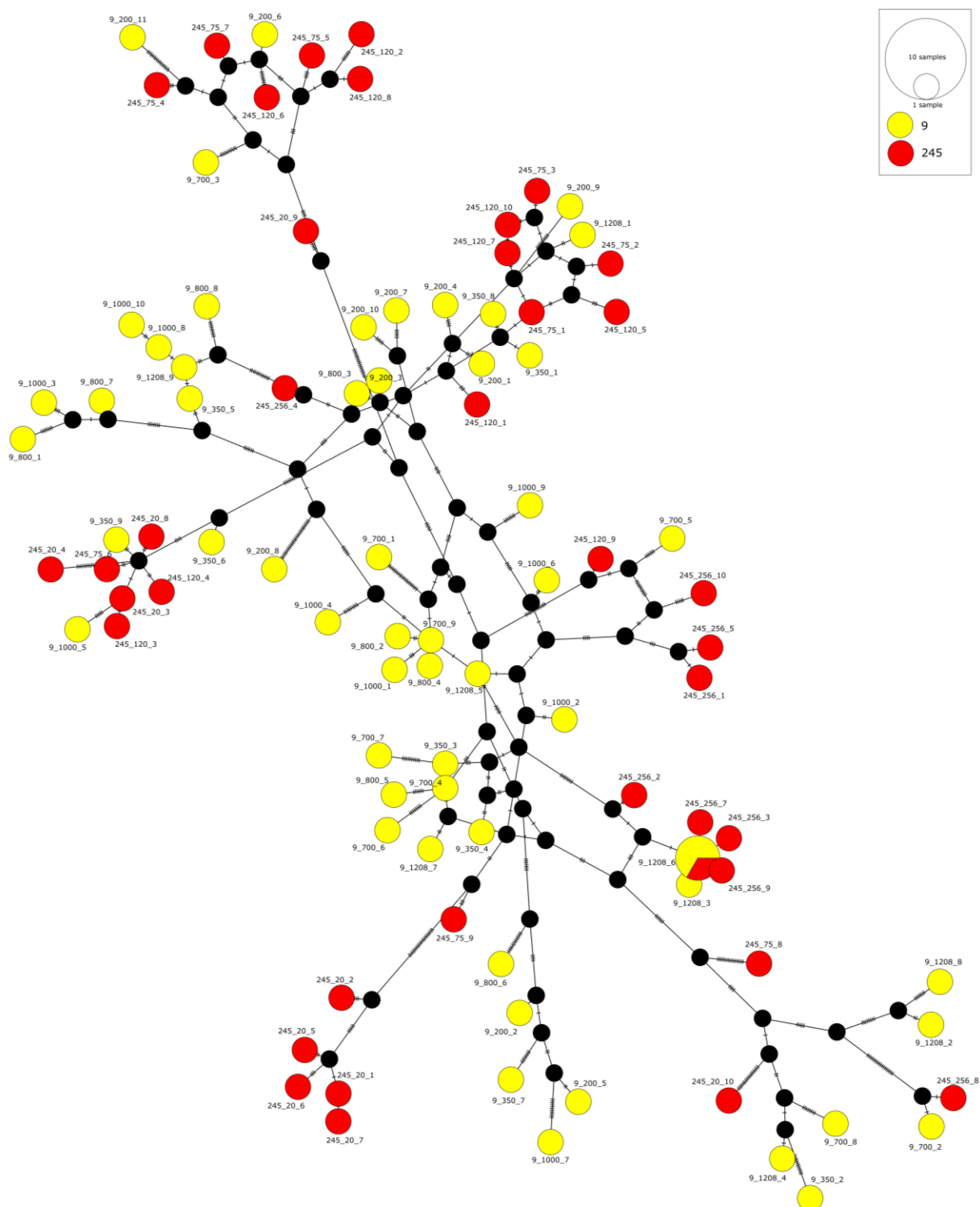
Jedním z cílů mé práce bylo potvrzení vertikální separace pelagických diplomem popsané na základě analýzy globálního datasetu *Tara Oceans* (Flegontova et al., 2016). Vzhledem k tomu, že na úrovni ribotypů nedocházelo ke sdílení mezi jednotlivými hloubkami, použili jsme opět metodiku haplotypových sítí. Z nich, po rozdělení jednotlivých hloubek do tří skupin (epipelagiál, svrchní a spodní mezopelagiál) (Obr. 9, Obr. 10, Obr. 11 a Obr. 12), je patrný určitý trend, oddělující populace mezi jednotlivé vrstvy. I když jsou zde výjimky a nelze tak hovořit o pravidlu. Tento trend je lépe patrný u lokality 9 (Obr. 9, Obr. 10), kde je jednak více vzorků a také větší hloubka, u níž se předpokládá největší abundance diplomem.

Tab. V: Počet osekvenovaných klonů na vzorek a průměrná genetická vzdálenost mezi pozicemi jednotlivých sekvencí spočítaná vždy pro všechny osekvenované klony jednoho vzorku.

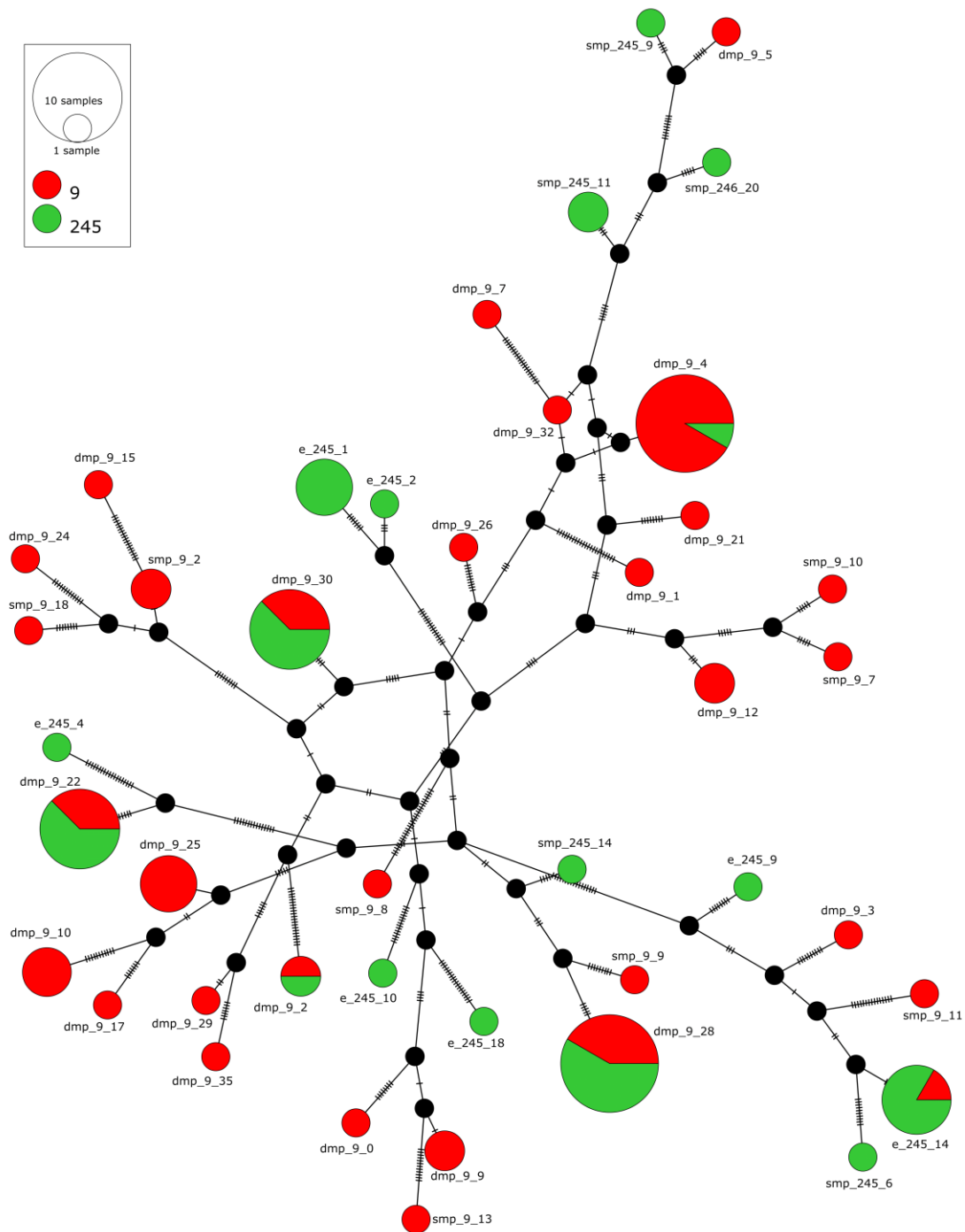
Lokalita	Číslo vzorku	Hloubka (m)	Počet osekvenovaných klonů	Průměrná genetická vzdálenost
245 43°22'38.6"N 14°44'55.6"E	2	20	10	0.062
Deep chl max (50 m)	4	75	9	0.078
	6	120	10	0.05
	8	256	10	0.055
9 42°07'20.2"N 17°46'41.8"E	19	200	11	0.085
Deep chl max (62 m)	20	350	9	0.072
	21	700	9	0.092
	22	800	8	0.061
	23	1000	10	0.068
	24	1208	10	0.055



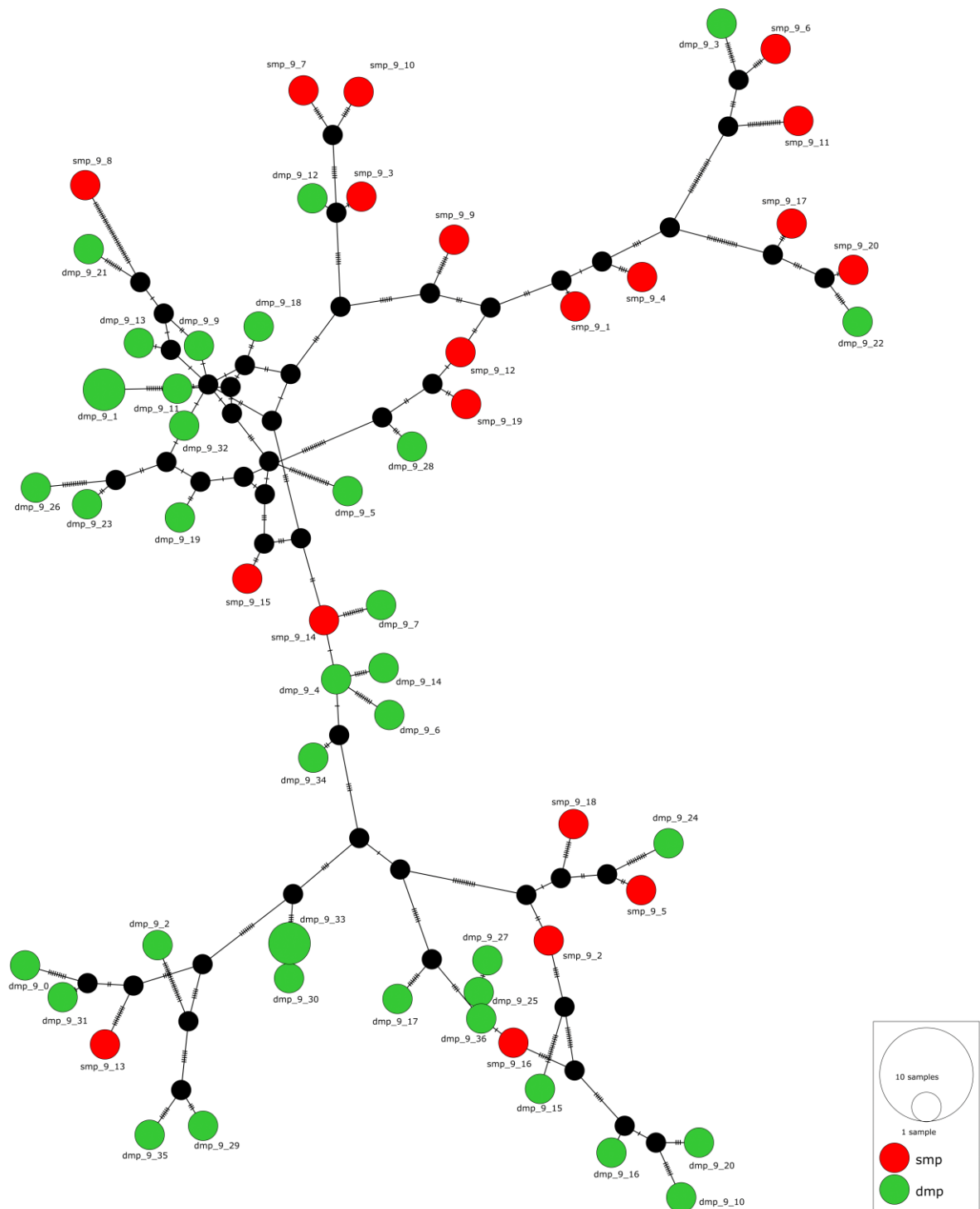
Obr. 6: Fylogenetický strom vytvořený ze získaných a referenčních sekvencí. Vzorky jsou pojmenované podle vzoru: lokalita-hloubka (m)-číslo sekvence.



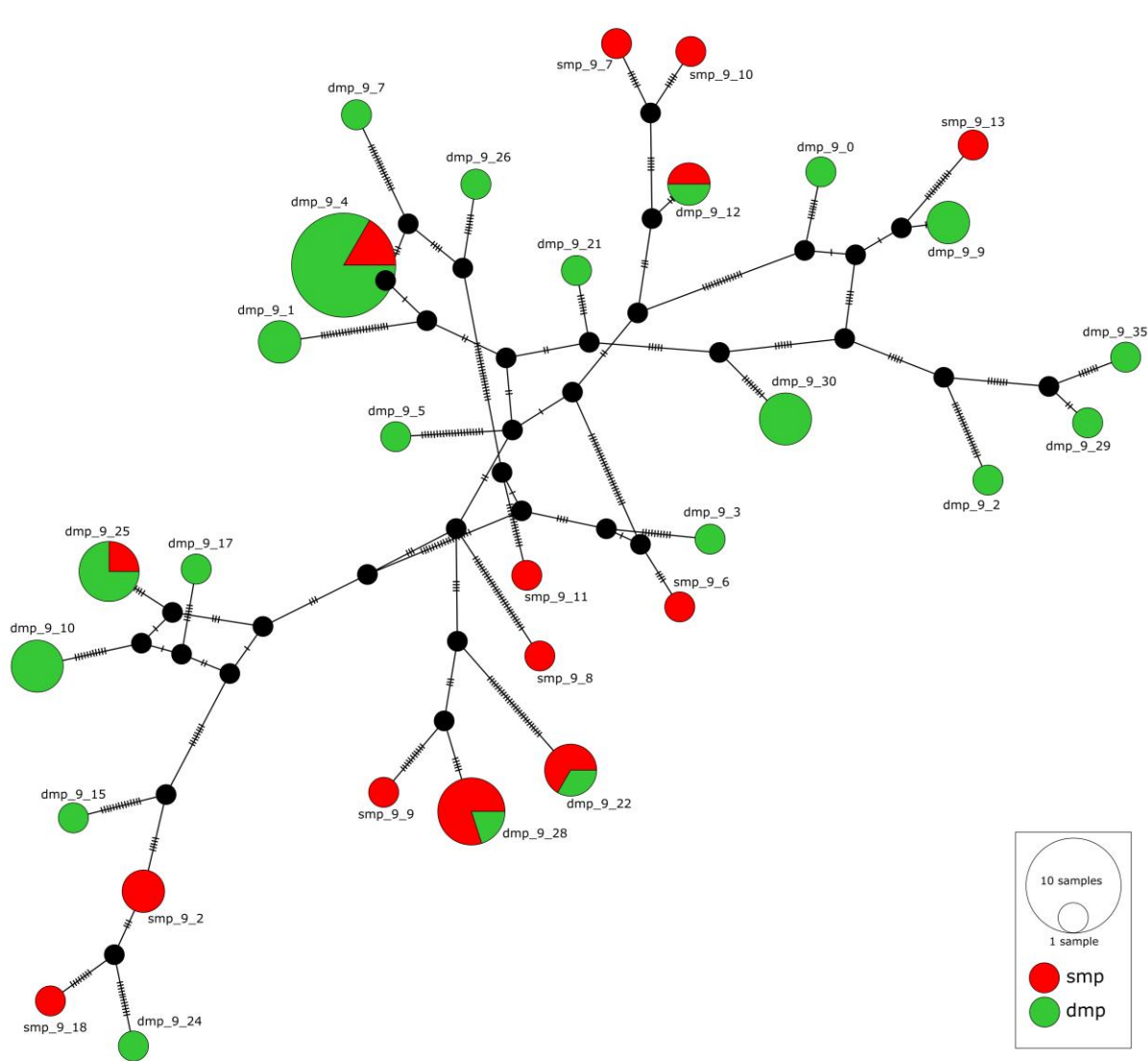
Obr. 7: Haplotypová síť celého získaného datasetu, rozděleného do dvou skupin podle lokality– 9 a 245.



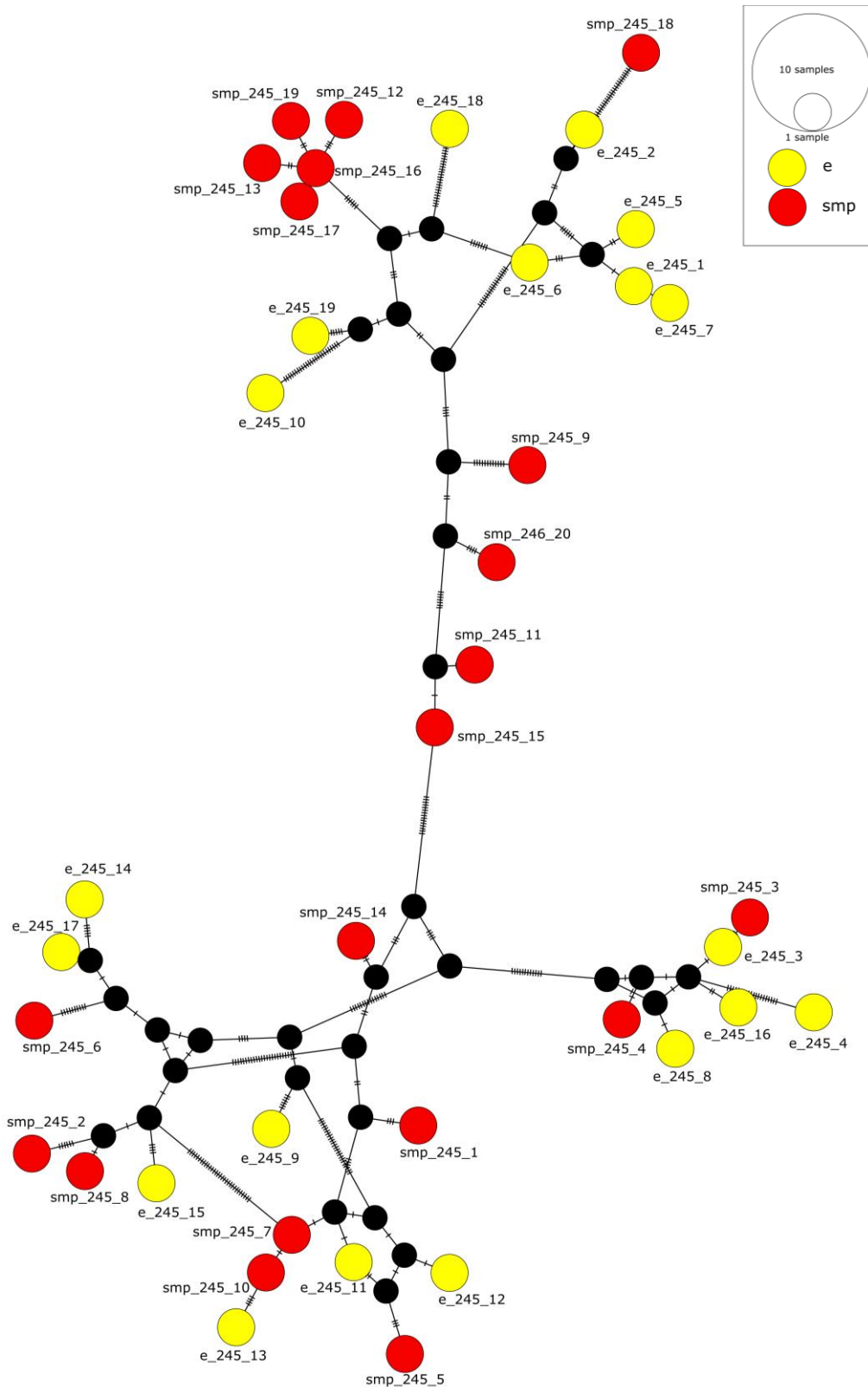
Obr. 8: Haplotypová síť celého získaného a zklastrovaného datasetu, rozdeleného do dvou skupin podle lokality– 9 a 245.



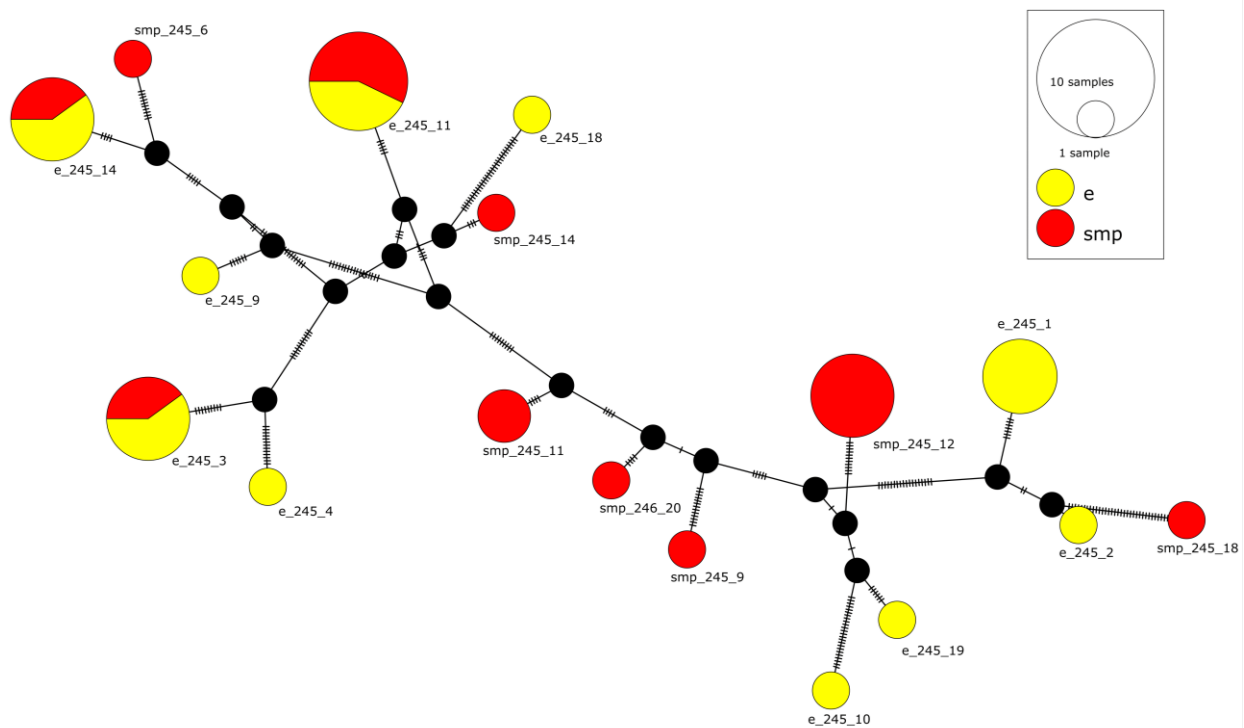
Obr. 9: Haplotypová síť všech získaných sekvencí z lokality 9, rozdělené do dvou skupin podle hloubkových vrstev. Jedna skupina: smp= svrchní mezopelagiál (zde vzorky z 200–350 m) a druhá skupina dmp= spodní mezopelagiál (zde 700–1208 m).



Obr. 10: Haplotypová síť všech získaných a zklastrovaných sekvencí z lokality 9, rozdělené do dvou skupin podle hloubkových vrstev. Jedna skupina: smp= svrchní mezopelagiál (200 a 350 m) a druhá skupina dmp= spodní mezopelagiál (700–1208 m).



Obr. 11: Haplotypová síť všech získaných sekvencí z lokality 245, rozdělené do dvou skupin podle hloubkových vrstev. Jedna skupina: e= epipelagiál (20 a 75 m) a druhá skupina smp= svrchní mezopelagiál (120 a 256 m).



Obr. 12: Haplotypová síť všech získaných a zklastrovaných sekvencí z lokality 245, rozdělené do dvou skupin podle hloubkových vrstev. Jedna skupina: e= epipelagiál (20 a 75 m) a druhá skupina smp= svrchní mezopelagiál (120 a 256 m).

5. Diskuze

Určení druhů u mikroskopických eukaryot je velmi náročné, z hlediska morfologie není u velké části jednobuněčných organismů dostatek znaků (výjimku tvoří například rozsivky, obrněnky, kokolitky či kořenonožci u nichž se vyskytuje externí exoskeleton). Alternativním přístupem je environmentální sekvenování, při kterém zjišťujeme tzv. sekvenční diverzitu. V tomto případě se jednotlivé druhy určují na základě vzájemné podobnosti získaných sekvencí. Přesná hranice této podobnosti pro odlišení druhů však dosud nebyla určena a díky rozdílné evoluční rychlosti jednotlivých molekulárních markerů napříč eukaryotickou diverzitou nejspíš vůbec neexistuje (Brown et al. 2015; Nebel et al. 2011). Proto některé studie považují členění druhů u prvoků za nedůležité a říkají, že u mikroorganismů pojem „druh“ neexistuje (Boenigk et al. 2012). Nicméně zařazení organismů do druhů je základem pro určení druhové bohatosti, a proto je stále snaha o definování hranice podobnosti. Různé studie používají odlišné hranice, na základě cílové skupiny, avšak nejběžněji používanou hodnotou

u prvoků je 97% hranice podobnosti, od níž jsou sekvence považovány za jeden druh (Schloss & Handelsman 2005). U diplomem zatím není dostatek informací pro podrobnější určení, a tak pokud se budeme řídit právě 97% hranicí podobnosti, lze říci, že přibližně polovina mnou získaných sekvencí patří jedinečným druhům diplomem. Alternativním způsobem shlukování sekvencí do operačních taxonomických jednotek je vazebný algoritmus použitý např. v programu SWARM 2 (Mahé et al. 2015). Místo celkové hladiny podobnosti počítané z celé délky sekvence tvoří shluky na základě mutačních kroků a pravděpodobně tak blíže odpovídá reálnému modelu speciace (založenému na kumulování mutací a následné nekompatibilitě). Tento přístup byl v poslední době použit na celé řadě velkých projektů (Mahé et al. 2017; de Vargas et al. 2015; Forster et al. 2016). Aplikací programu SWARM na můj dataset za použití doporučeného nastavení mutačních kroků ($d=1-3$) došlo k minimální redukci diverzity (91 shluků vs. 95 jedinečných ribotypů). Výraznější pokles se objevil až při poměrně drastickém a tvůrci programu nedoporučeném nastavení ($d=10$, 41 shluků). Jiným způsobem vizualizace diverzity je fylogenetický strom. V mém případě (Obr. 6) se sekvence vyskytují po celém stromě a jsou rozděleny do blízce příbuzných skupin, v těchto jednotlivých skupinách tak pravděpodobně některé nejpodobnější sekvence patří příslušníkům stejného druhu. Toto můžeme říci například o některých sekvencích z lokality 245, vzorku 6, kde si jsou velmi podobné 3 sekvence a vzorku 8 s prakticky stejnou dvojicí sekvencí. U lokality 9 je tomu tak u jedné trojice u vzorku 24. Všechny sekvence však zapadají do již známého taxonomického kontextu eupelagonem a neobjevila jsem nové klády.

Z předchozích studií je patrná vertikální stratifikace eupelagonem bez jakéhokoli geografického členění. V rozšířeném datasetu *Tara Oceans* expedice, obsahující vzorky i z mezopelagické zóny (200-1000m), bylo nalezeno mnohem více diplomem než ve fotické zóně, přestože vzorků pocházejících z hlubších vod bylo méně (Flegontova et al. 2016; Lara et al. 2009; de Vargas et al. 2015). Kvůli nedostatku dat v předchozích výzkumech, poskytující informace jen o třech hloubkách, bylo jedním z cílů této bakalářské práce zjistit jakým způsobem je členěná diverzita eupelagonem ve vodním sloupci. Díky obrovské diverzitě získaných sekvencí se však nepodařilo určit přesnější hranici hlavního výskytu eupelagonem, úplně negativní signál byl jen u dvou vzorků (2 a 62 m) z fotické zóny u celkově hlubší lokality (9), tato hranice se ale nepotvrdila u druhé lokality, kde byly pozitivní i vzorky z 20 m. Přestože by pro podrobnější informace bylo potřeba více osekvenovaných klonů vzorků, podařilo se potvrdit preferenci různých hloubek u určitých skupin eupelagonem, což je znatelné hlavně u lokality 9. U druhé lokality (245) tento trend není až tak patrný, důvodem

může být jednak menší počet vzorků, ale také celková hloubka lokality, která dosahuje jen 256 m. Z výsledků této práce je tedy patrná určitá komunikace mezi jednotlivými hloubkami, i když u hlubších vzorků je stratifikace patrnější. Důvodem částečně promíchaných populací však může být i vertikální migrace jedinců. Celková vertikální migrace planktonu ve vodním sloupci mezi dnem a nocí je známá už poměrně dlouho (Angel & de C. Baker 1982). Další migrace planktonu může být zapříčiněna i sezónními změnami prostředí, ať už je jejímž důvodem okolní teplota (Sunagawa et al. 2015) nebo potravní tlak (Not et al. 2007). Nechtěné promíchávání mohou způsobit i případné mořské proudy, ty ale u zkoumaných lokalit nejsou nikterak výrazné a celková cirkulace mořských vrstev je mírná (Cushman-Roisin & Naimie 2002). Výsledky této bakalářské práce tedy do jisté míry potvrdily vertikální stratifikaci, ale neurčily její hranici.

Doposud dostupné fylogenetické analýzy skupiny Eupelagonemidae založené na 18S rRNA poskytují velmi málo informací o struktuře této skupiny, což společně s objeveným nízkým stupněm divergence a naopak extrémní diverzitou, naznačují pravděpodobnou relativně recentní hyper-radiaci (Flegontova et al. 2016). Nalezená extrémní diverzita eupelagonem se potvrzuje stále v dalších studiích. Jedním z faktorů, které by mohly pozorovanou diverzitu silně nadhodnocovat je existence kopií/paralogů o různé sekvenci v rámci jedné buňky. V případě eupelagonem byl použit gen 18S rRNA, kde byl výskyt paralogů popsán například u primitivních ryb nebo rozsivek (Alverson & Kolnick 2005; Krieger & Fuerst 2002), ale jeho poměrně malá míra byla považovaná za polymorfismus vzniklý při diverzifikaci druhů. U diplomem však jejich výskyt nebyl pozorován. V současné době probíhá skládání genomů dvou zástupců skupiny Diplonemea, *Diplonema papillatum* a *Hemistasia phaeocysticola*, ani v jednom případě nebyl výskyt rRNA polymorfizmu patrný (Horák, osobní sdělení). Navíc v nedávné studii Gawryluka et al. (2016), kde izolovali 10 různých buněk eupelagonem a následně pomocí metody SCG nahlédli do části (10-25%) jejich genomů, nebyl výskyt rRNA paralogů nalezen. Další teorií odporující vysoké diverzitě je nízký evoluční potenciál mořského planktonu. Dříve byl mořský zooplankton považován za pomalu se vyvíjející skupinu, u které je předpokládán neefektivní genetický drift v rámci své obrovské populace (Bucklin & Wiebe 1998; Lynch et al. 1991). Taktéž byl přirovnáván k poletujícím částicím ve vzduchu, volně se pohybujícím po celém oceánu, a proto se nemůže adaptovat na konkrétní lokalitu (Angel 1993). Nicméně na základě nedávno objevených oddělených populací planktonu Peijnenburg & Goetze (2013) vytvořili teorii vysokého evolučního potenciálu mořského zooplanktonu, jejíž hlavní evoluční silou je selekce. Rovněž

Smetacek (2001) tvrdí, že primárními silami speciace mořského planktonu jsou, spíše než konkurence o zdroje a prostor jak je tomu u terestrických druhů, biotické interakce.

Výsledky mé práce souhlasí s ostatními studiemi. Diverzita eupelagonem nalezená ve zde použitých vzorcích byla velmi vysoká (téměř stoprocentní). Kvůli tomu byla výsledná data této práce nedostačující na přesnější určení diverzity eupelagonem a jejich stratifikaci v mořském prostředí, přestože z každého vzorku bylo osekvenováno průměrně 10 klonů. Proto by bylo vhodné osekvenovat více klonů z každého vzorku pro lepší představu o diverzitě eupelagonem a její stratifikaci v této oblasti. Díky efektivitě klonování a relativně velké ceně Sangerova sekvenování se však jako mnohem vhodnější jeví aplikace některé z technologií NGS, vzhledem k velikosti zvoleného barkódu nejspíš Illumina MiSeq 300+300. Případně barkódování pomocí technologie PacBio, která umožní čtení celých sekvencí 18S rRNA, případně celých ribozomálních operonů (ovšem při menším pokrytí).

6. Závěr

O skupině diplomem toho zatím víme poměrně málo. Existují důkazy ohledně jejich všudypřítomnosti, obrovské diverzity a abundance v mořském planktonu, stávají se tak jedněmi z klíčových organismů největšího ekosystému světa (Flegontova 2017; de Vargas et al. 2015; Lara et al. 2009). O to důležitější je zjistit co nejvíce o jejich roli, kterou v něm hrají. Pro objasnění rozšíření a případné fylogeneze eupelagonem ze dvou lokalit v Jaderském moři jsem použila environmentálního sekvenování a pro následnou rekonstrukci vzájemných vztahů fylogenetické stromy a haplotypové sítě. Výsledky této práce podporují předchozí studie o jejich vertikální stratifikaci, avšak pro jejich obrovskou diverzitu nebyla určena hranice výskytu ve vodním sloupci. Tuto odpověď by bylo možné získat po podrobnějším sekvenování této lokality, která se pro tyto účely ukázala jako vhodná.

7. Použitá literatura

- Adl, S.M. et al., 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, pp.429–493.
- Alverson, A.J. & Kolnick, L., 2005. Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18s) rDNA paralogs in the diatom genus *Skeletonema* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 41, pp.1248–1257.
- Amaral-Zettler, L.A. et al., 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA Genes. *Plos ONE*, 4, pp.1–9.
- Angel, M.V. & de C. Baker, A., 1982. Vertical distribution of the standing crop of plankton and micronekton at three stations in the northeast Atlantic. *Biological Oceanography*, 2, pp.1–30.
- Angel, M.V., 1993. Biodiversity of the pelagic ocean. *Conservation Biology*, 7, pp.760–772.
- Armbrust, E. V. & Palumbi, S.R., 2015. Uncovering hidden worlds of ocean biodiversity. *Science*, 348, pp.865–867.
- Bigg, G.R. et al., 2003. The role of the oceans in climate. *International Journal of Climatology*, 23, pp.1127–1159.
- Boenigk, J. et al., 2012. Concepts in protistology: Species definitions and boundaries. *European Journal of Protistology*, 48, pp.96–102.
- Bork, P. et al., 2015. *Tara* Oceans studies plankton at planetary scale. *Science*, 348, p.873.
- Bragg, L. & Tyson, G.W., 2014. Metagenomics using next-generation sequencing. In *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*. Humana Press, pp. 183–201.
- Brown, E.A. et al., 2015. Divergence thresholds and divergent biodiversity estimates: Can metabarcoding reliably describe zooplankton communities? *Ecology and Evolution*, 5, pp.2234–2251.
- Brum, J.R. et al., 2015. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. *Science*, 348.

- Bucklin, A. & Wiebe, P.H., 1998. Low mitochondrial diversity and small effective population sizes of the copepods *Calanus finmarchicus* and *Nannocalanus minor*: possible impact of climatic variation during recent glaciation. *Journal of Heredity*, 89, pp.383-392.
- del Campo, J. et al., 2016. Ecological and evolutionary significance of novel protist lineages. *European Journal of Protistology*, 55, pp.4–11.
- Caron, D.A. et al., 2012. Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4, pp.467–493.
- Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews*, 57, pp.953–994.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, pp.1657–1660.
- Clement, M. et al., 2002. TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium., Proceedings International*, 2.
- Countway, P.D. et al., 2007. Distinct protistan assemblages characterize the euphotic zone and deep sea (2500 m) of the western North Atlantic (Sargasso Sea and Gulf Stream). *Environmental Microbiology*, 9, pp.1219–1232.
- Cushman-Roisin, B. & Naimie, C.E., 2002. A 3D finite-element model of the Adriatic tides. *Journal of Marine Systems*, 37, pp.279–297.
- Edgar, R., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, pp.2460–2461.
- Elbrächter, M., Schnepf, E. & Balzer, I., 1996. *Hemistasia phaeocysticola* (Scherffel) comb. nov., redescription of a free-living, marine, phagotrophic kinetoplastid flagellate. *Archiv für Protistenkunde*, 147, pp.125–136.
- Field, C.B., 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, pp.237–240.
- Flegontova, O. et al., 2016. Extreme diversity of diplomonid Eukaryotes in the ocean. *Current Biology*, 26, pp.3060–3065.
- Flegontova, M.S.O., 2017. Diversity and biogeography of diplomonid and kinetoplastid protists in global marine plankton.

- Forster, D. et al., 2016a. Benthic protists: the under-charted majority. *FEMS Microbiology Ecology*, 92.
- Forster, D. et al., 2016b. Comparison of three clustering approaches for detecting novel environmental microbial diversity. *PeerJ*, 4, p.e1692.
- Gawryluk, R.M.R. et al., 2016. Morphological identification and single-cell genomics of marine diplomonads. *Current Biology*, 26, pp.3053–3059.
- Giner, C.R. et al., 2016. Environmental sequencing provides reasonable estimates of the relative abundance of specific picoeukaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, pp.4757–4766.
- Glenn, T.C., 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11, pp.759–769.
- Glez- Peña, D. et al., 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research*, 38.
- Goodwin, S., McPherson, J.D. & McCombie, W.R., 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, pp.333–351.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27, pp.221–224.
- Griessmann, K., 1913. Ober marine Flagellaten. *Archiv für Protistenkunde*, 32, pp.1–78.
- Guillou, L. et al., 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 41, pp.597–604.
- Haas, B.J. et al., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21, pp.494–504.
- Heather, J.M. & Chain, B., 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107, pp.1–8.
- Heyden, S. et al., 2004. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of Euglenozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, pp.402–416.

- Huber, J.A. et al., 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*, 318, pp.97–100.
- Kaiser, M., 2011. *Marine ecology: processes, systems, and impacts second.*, Oxford University Press.
- Katoh, K. & Standley, D., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp.772–780.
- Keeling, P.J. & del Campo, J., 2017. Marine protists are not just big bacteria. *Current Biology*, 27, pp.R541–R549.
- Kent, M.L., Elston, R.A. & Sawyer, T.K., 1987. An *Isonema*-like flagellate (Protozoa: Mastigophora) infection in larval geoduck clams, *Panope abrupta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50, pp.221–229.
- Krieger, J. & Fuerst, P.A., 2002. Evidence of multiple alleles of the nuclear 18S ribosomal RNA gene in sturgeon (Family: Acipenseridae). *Journal of Applied Ichthyology*, 18, pp.290–297.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, pp.1870–1874.
- Lara, E. et al., 2009. Pan-oceanic distribution of new highly diverse clades of deep-sea diplomonids. *Environmental Microbiology*, 11, pp.47–55.
- Larsen, J. & Patterson, J., 1990. Some flagellates (Protista) from tropical marine sediments. *Journal of Natural History*, 24, pp.801–937.
- Leigh, J. & Bryant, D., 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, pp.1110–1116.
- Leray, M. & Knowlton, N., 2016. Censusing marine eukaryotic diversity in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371, p.20150331.
- Lima-Mendez, G. et al., 2015. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348, p.1262073.

- López-García, P. et al., 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 409, pp.603–607.
- Lozupone, C.A. et al., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, pp.220–230.
- Lukeš, J., Flegontova, O. & Horák, A., 2015. Diplonemids. *Current Biology*, 25, pp.R702–R704.
- Lukeš, J., 2017. Sekvenování jednotlivých buněk: odhalení diplomem, neznámých, a přesto početných prvoků. *Živa*, 2017, pp.118–120.
- Lynch, M., Gabriel, W. and Wood, A.M., 1991. Adaptive and demographic responses of plankton populations to environmental change. *Limnology and Oceanography*, 36, pp.1301-1312.
- Mahé, F. et al., 2017. Parasites dominate hyperdiverse soil protist communities in Neotropical rainforests. *Nature Ecology & Evolution*, 1, p.91.
- Mahé, F. et al., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, p.e593.
- Mahé, F. et al., 2015. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, p.e1420.
- Malviya, S. et al., 2016. Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, pp.E1516–E1525.
- Marande, W. & Burger, G., 2007. Mitochondrial DNA as a genomic jigsaw puzzle. *Science*, 318, p.415.
- Marande, W., Lukes, J. & Burger, G., 2005. Unique mitochondrial genome structure in diplomemids, the sister group of kinetoplastids. *Eukaryotic Cell*, 4, pp.1137–1146.
- Massana, R. et al., 2015. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environmental Microbiology*, 17, pp.4035–4049.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, pp.560–4.

- Medinger, R. et al., 2010. Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Molecular Ecology*, 19, pp.32–40.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies– the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11, pp.31–46.
- Monastersky, R., 2014. Life– a status report. *Nature*, 516, pp.158–161.
- Mora, C. et al., 2011. How many species are there on earth and in the ocean? *Plos Biology*, 9, pp.1–8.
- Morey, M. et al., 2013. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110, pp.3–24.
- Nebel, M. et al., 2011. Delimiting operational taxonomic units for assessing ciliate environmental diversity using small-subunit rRNA gene sequences. *Environmental Microbiology Reports*, 3, pp.154–158.
- Nguyen, L.-T. et al., 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32, pp.268–274.
- Nielsen, K.M. et al., 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*, 6, pp.37–53.
- Not, F. et al., 2007. Vertical distribution of picoeukaryotic diversity in the Sargasso Sea. *Environmental Microbiology*, 9, pp.1233–1252.
- Not, F. et al., 2009. New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. *Plos ONE*, 4.
- Okamoto, N. et al., v recenzním řízení. *Eupelagonema oceanica* n. gen. & sp. and a revised diplomemid taxonomy.
- Pawlowski, J. et al., 2011. Eukaryotic richness in the abyss: insights from pyrotag sequencing. *Plos ONE*, 6.
- Pawlowski, J. et al., 2012. CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *Plos Biology*, 10.
- Peijnenburg, K.T. & Goetze, E., 2013. High evolutionary potential of marine zooplankton. *Ecology and Evolution*, 3, pp.2765–2783.

- Pernice, M.C. et al., 2016. Large variability of bathypelagic microbial eukaryotic communities across the world's oceans. *The ISME Journal*, 10, pp.945–958.
- Pesant, S. et al., 2015. Open science resources for the discovery and analysis of *Tara* Oceans data. *Scientific data*, 2, p.150023.
- Pochon, X. et al., 2017. Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *Plos ONE*, 12.
- Potter, D. & Lajeunesse, T.C., 1997. Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. *Biodiversity and Conservation*, 107, pp.99–108.
- Prokopowich, C.D., Gregory, T.R. & Crease, T.J., 2003. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46, pp.48–50.
- Pruesse, E. et al., 2007. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35, pp.7188–7196.
- Rappé, M. & Giovannoni, S., 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57, pp.369–394.
- Roy, J. et al., 2007. Description of *Rhynchopus euleeides* n. sp. (Diplonemea), a Free-Living Marine Euglenozoan. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54, pp.137–145.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, pp.5463–5467.
- Schloss, P.D. & Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp.1501–1506.
- Schnepf, E., 1994. Light and electron microscopical observations in *Rhynchopus coscinodiscivorus* spec. nov., a colorless, phagotrophic euglenozoon with concealed flagella. *Archiv für Protistenkunde: Protozoen, Algen, Pilze*, 144, pp.63–74.
- Schuster, F.L., Goldstein, S. & Hershenov, B., 1968. Ultrastructure of a flagellate, *Isonema nigrigricans* nov. gen. nov. sp., from a polluted marine habitat. *Protistologica*, 4, pp.141–149.

- Seersholm, F.V. et al., 2016. DNA evidence of bowhead whale exploitation by Greenlandic Paleo-Inuit 4,000 years ago. *Nature Communications*, 7, p.13389.
- Simpson, A.G.B. & Roger, A.J., 2004. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, pp.201–212.
- Skuja, H., 1948. Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland, Schweden. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, 9, pp.1–399.
- Smetacek, V., 2001. A watery arms race. *Nature*, 411, pp.745–745.
- Sogin, M.L. et al., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere“. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, pp.12115–12120.
- Stoeck, T. et al., 2007. A molecular approach to identify active microbes in environmental eukaryote clone libraries. *Microbial Ecology*, 53, pp.328–339.
- Streit, W.R. & Schmitz, R.A., 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7, pp.492–498.
- Sunagawa, S. et al., 2015. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348.
- Taberlet, P. et al., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21, pp.2045–2050.
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, pp.11030–11035.
- Tashyreva, D. et al., v tisku. Phylogeny and morphology of new diplomonads from Japan.
- Thornhill, D.J., Lajeunesse, T.C. & Santos, S.R., 2007. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: How intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Molecular Ecology*, 16, pp.5326–5340.
- Triemer, R.E., Ott, D.W., 1990. Ultrastructure of *Diplonema ambulator* Larsen & Patterson (Euglenozoa) and its relationship to *Isonema*. *European Journal of Protistology*, 25, pp.316–320.

- de Vargas, C. et al., 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348, pp.1–12.
- Vaulot, D. et al., 2008. The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, pp.795–820.
- Yabuki, A. & Tame, A., 2015. Phylogeny and reclassification of *Hemistasia phaeocysticola* (Scherffel) Elbrächter & Schnepf, 1996. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62, pp.426–429.
- Yabuki, A., Toyofuku, T. & Takishita, K., 2014. Lateral transfer of eukaryotic ribosomal RNA genes: an emerging concern for molecular ecology of microbial eukaryotes. *The ISME Journal*, 8, pp.1544–1547.
- Yilmaz, S. & Singh, A.K., 2012. Single cell genome sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, pp.437–443.
- Zhang, H. & Ning, K., 2015. The *Tara* Oceans project: new opportunities and greater challenges ahead. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13, pp.275–277.
- Zhu, F. et al., 2005. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, pp.79–92.