



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Charakterizace želvušek izolovaných
z prostředí**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Vilma Hofmanová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Vilma Hofmanová
Název práce	Charakterizace želvušek izolovaných z prostředí
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra experimentální biologie Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	Želvušky jsou mikroskopičtí živočichové studovaní mimo jiné pro svoji vysokou odolnost k různým formám stresu. Práce popisuje pokus o morfologickou a genetickou charakterizaci a také kultivaci 10 izolátů vybraných z širšího souboru vzniklého izolací více než dvou set vzorků mechu. Všechny podrobněji studované izoláty patří k čeledi Ramazzottiidae a Macrobiotidae, rodům <i>Macrobiotus</i> a <i>Mesobiotus</i> . V jednom případě se podařilo získat několik generací želvušek in vitro, potravou byly krytenky a <i>Caenorhabditis elegans</i> .
Klíčová slova	Želvušky, DNA barkódování, Ramanova spektrometrie
Počet stran	100
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Vilma Hofmanová
Title of thesis	Characterization of tardigrades isolated from the environment
Type of thesis	Master
Department	The Department of Experimental Biology Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	Tardigrades are microscopic animals studied, among other, for their high resistance to various forms of stress. The study describes an attempt at morphological and genetic characterization and also the cultivation of 10 isolates selected from a broader collection resulting from the isolation of more than two hundred samples of moss. All the more thoroughly studied isolates belong to the family <i>Ramazzottiidae</i> and <i>Macrobotidae</i> , genera <i>Macrobotus</i> and <i>Mesobotus</i> . In one case, it was possible to obtain several generations of tardigrades in vitro, with their diet consisting of rotifers and <i>Caenorhabditis elegans</i> .
Keywords	Tardigrades, DNA barcoding, Raman spectrometry
Number of pages	100
Number of appendices	2
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 10.5.2024

Vilma Hofmanová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat studentům středních škol a jejich vyučujícím, kteří shromáždili většinu vzorků mechu, ze kterých se izolovaly želvušky. Dále bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a veškerý čas, který mi při psaní této práce věnoval. Také mé díky patří i Mgr. Dominiku Vítkovi a Mgr. Dominice Trofimenkové za pomoc a čas, který mi věnovali v laboratoři. V neposlední řadě děkuji RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za analýzu vzorků na Ramanově mikroskopu.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	9
2 Teoretická část	10
2.1 Želvušky	10
2.2 Rozmnožování želvušek	12
2.3 Životní cyklus	13
2.4 Taxonomie	14
2.5 Kultivace želvušek	15
2.5.1 Rod <i>Hypsibius</i>	16
2.5.2 Rod <i>Ramazzottius</i>	17
2.5.3 Rod <i>Milnesium</i>	17
2.5.4 Rod <i>Paramacrobiotus</i>	18
2.5.5 Rod <i>Echiniscus</i> , <i>Pseudechiniscus</i> a <i>Viridiscus</i>	18
2.6 Ramanova spektrometrie	20
2.6.1 Princip Ramanovy spektrometrie	20
2.6.2 Ramanova spektrometrie v biologii	21
2.7 DNA barkórování	21
3 Materiál a metody	23
3.1 Přístrojové a laboratorní vybavení	23
3.1.1 Spotřební materiál	23
3.2 Biologický materiál	24
3.3 Použité chemikálie	24
3.4 Metodika	25
3.4.1 Izolace želvušek z mechu	25
3.4.1.1 Izolace pomocí Baermannových nálevok	25
3.4.1.2 Izolace pomocí inzertů	26
3.4.2 Kultivace	27
3.4.3 Optická mikroskopie	28
3.4.3.1 Příprava trvalých preparátů pro optickou mikroskopii	28
3.4.4 Ramanova mikroskopie	28
3.4.4.1 Příprava vzorků pro Ramanovu mikroskopii	28
3.4.4.2 Analýza na Ramanově mikroskopu	28
3.4.5 Příprava synchronizovaných kultur <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
3.4.6 Genotypizace divokých želvušek z mechu	29

3.4.6.1 Izolace DNA	29
3.4.6.2 Polymerázová řetězová reakce	30
3.4.6.3 Horizontální agarosová elektroforéza.....	32
3.4.6.4 Příprava vzorků na sekvenaci DNA.....	32
3.4.7 Optimalizace PCR pro primer ITS2	33
4 Výsledky.....	34
4.1 Sběr mechu, izolace.....	34
4.2. Kultivace.....	36
4.3 Světelná mikroskopie – trvalé preparáty	38
4.4 Fluorescenční mikroskopie.....	50
4.5 Ramanova mikroskopie	61
4.6 Genotypizace divokých želvušek z mechu	62
4.6.1 Optimalizace PCR reakce.....	63
4.6.2 Vlastní barkódování	63
5 Diskuse	75
6 Závěr.....	78
7 Použitá literatura.....	79
8 Přílohy.....	88
8.A Publikované kultivační metody – detailní přehled.....	88
8.A.A Kultivační metody pro rod <i>Hypsibius</i>	88
8.A.B Kultivační metody pro rod <i>Ramazzottius</i>	90
8.A.C Kultivační metody pro rod <i>Milnesium</i>	91
8.A.D Kultivační metody pro rod <i>Paramacrobiotus</i>	93
8.A.E Přehled publikovaných kultivačních metod	96
8.B Seznam škol, které se zapojily do sběru vzorků	100

Seznam zkratk

COX1 Cyklooxygenáza 1

ITS2 Vnitřní transkribovaný spacer 2

1 Úvod a cíle práce

Želvušky jsou kmen patřící do Ecdysozoa, který čítá více než 1450 druhů (Degma a Guidetti, 2023). Jedná se o bilaterálně symetrické organismy, dosahujících velikosti od 50 μm do 1200 μm , které mají segmentované tělo a čtyři páry končetin zakončených drápky (Nelson, Guidetti a Rebecchi, 2010). Obývají mořské, sladkovodní i suchozemské oblasti. K reprodukci a aktivnímu stavu života potřebují vodu, alespoň ve formě vodního filmu. Jinak přecházejí do klidového stavu tzv. anhydrobiózy, kdy snižují metabolickou aktivitu a morfologicky vytvářejí tzv. soudeček. Po opětovném vystavení vodě se vrací do aktivního stádia. Jsou extrémně odolné vůči nepříznivým podmínkám, kromě dehydratace také zvládají extrémní teploty a tlak, ionizující záření nebo působení toxinů (Arakawa, 2022).

Studium odpovědi želvušek na stres významně usnadňuje, pokud je k dispozici homogenní laboratorní kultura. Protokolů bylo publikováno několik desítek. Optimalizované parametry zahrnují kultivační médium, teplotní a světelné podmínky, složení potravy a typ kultivační nádoby. U heterotardigrádních druhů protokoly zahrnují cykly vysychání. Často je možné jeden protokol s drobnými modifikacemi použít pro chov více druhů želvušek.

Součástí diplomové práce je literární rešerše zabývající se biologií želvušek a přehledem kultivačních metod vybraných druhů, podle kterých také probíhaly pokusy o založení kultur.

Diplomová práce se zabývá izolací želvušek z mechu, dokumentací pomocí světelné, fluorescenční mikroskopie a Ramanovy mikroskopie a následnou identifikací druhů podle morfologických znaků. Vzhledem k náročnosti spolehlivé identifikace při zvětšení, které umožňovaly námi používané mikroskopy, bylo také provedeno DNA barkódování vybraných druhů.

Zdrojem materiálu byl jednak vlastní sběr, ale dominantní podíl tvořily vzorky od středoškolských studentů, kteří se se svými učiteli na podzim 2023 zapojili do mapování želvušek ČR (přehled škol je uveden v příloze B, tab. 10).

2 Teoretická část

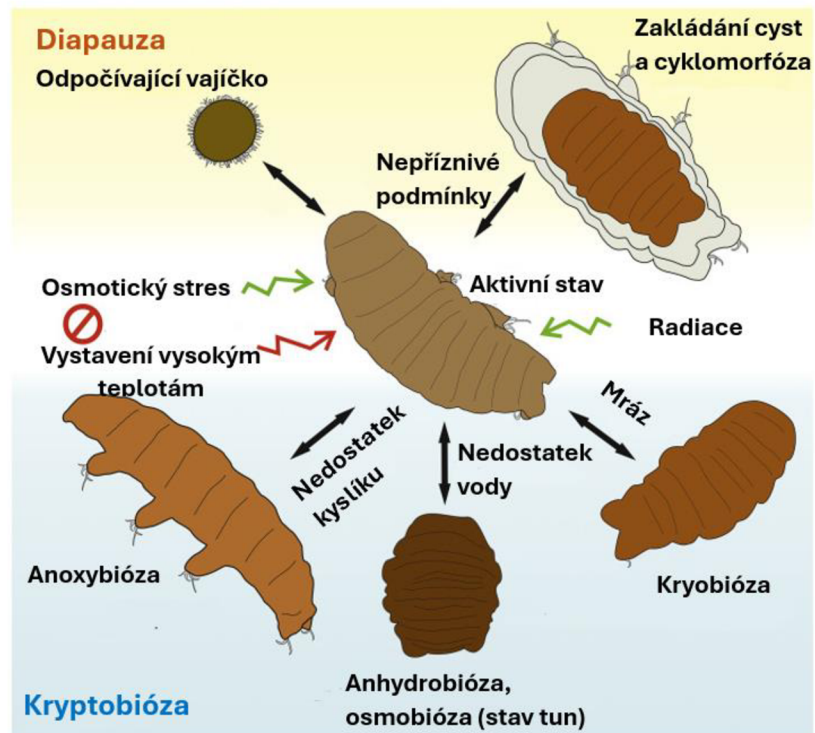
2.1 Želvušky

Již od prvního pozorování v roce 1773 byly želvušky kvůli svému medvědímu vzhledu a končetinám s drápy pojmenovány „Kleiner Wasser Bär“, což je v překladu „vodní medvídek“. V roce 1776 byl Lazzarem Spallanzanim zaveden nový název „il Tardigrado“, ze kterého se odvodilo pojmenování pro celý kmen Tardigrada. Překlad v češtině znamená pomalý chodec a podle pomalé želví chůze vznikl název želvušky (Nelson, Guidetti a Rebecchi, 2010).

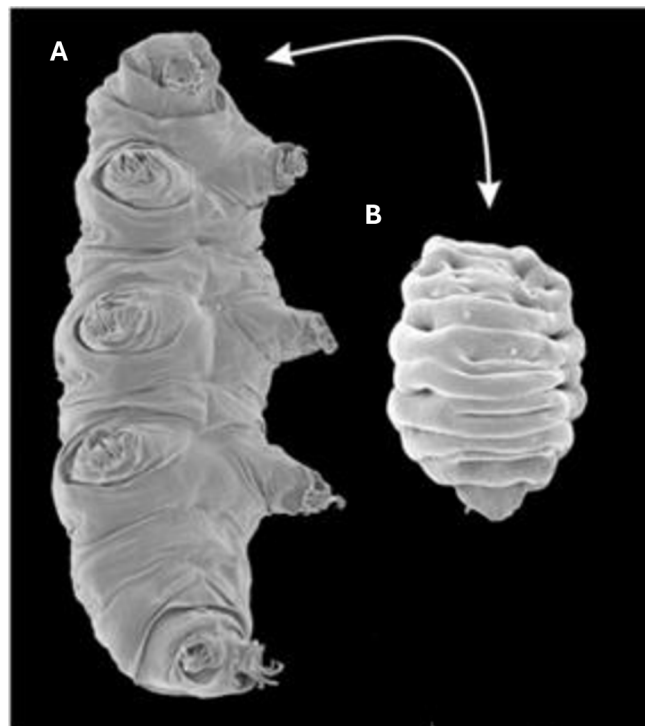
Želvušky jsou mikroskopické bilaterální organismy, dosahující velikosti 50–1200 μm (v průměru 250–500 μm). Jejich tělo je složené z hlavového segmentu, tří trupových segmentů a zadního segmentu. Každý trupový segment nese jeden pár končetin, poslední pár končetin, který se nachází na zadním segmentu, směřuje dozadu. Končetiny jsou zakončené drápy nebo u některých mořských druhů výrůstky (Nelson, Guidetti a Rebecchi, 2010). K roku 2023 bylo objeveno více než 1450 druhů (Degma a Guidetti, 2023).

Želvušky jsou známé pro svou vysokou toleranci vůči různým nepříznivým podmínkám, jako jsou extrémní tlak a teplota, dehydratace nebo ionizující záření, při kterých vstupují do klidového stavu (obr. 1) (Arakawa, 2022). Klidový stav lze rozdělit na dva typy: diapauzu a kryptobiózu. Diapauza je pod endogenní kontrolou, je tedy udržována vnitřní fyziologickou odpovědí. Ukončení diapauzy je vyvoláno vnitřním signálem, který nemusí odpovídat obnoveným příznivým podmínkám prostředí. Mezi projevy diapauzy patří vytváření cyst, cyklomorfóza a další. Kryptobióza je způsobena exogenními podmínkami a je přímo indukována vnějším prostředím. Při obnovení příznivých podmínek dochází k návratu k aktivitě. Kryptobióza má několik forem závislejších na typu vyvolávajícího stresoru: anhydrobiózou, kryobiózou nebo anoxybiózou (Guidetti, Altiero a Rebecchi, 2011). Želvušky jsou původně vodní organismy. Vodu potřebují k udržení aktivity, příjmu potravy a reprodukci. Navzdory tomu mnoho druhů želvušek osídlilo suchozemské prostředí, kde období dehydratace přežívají ve stavu anhydrobiózy a vytvářejí tzv. soudečky (obr. 2). Tento stav je spojen

s výraznými změnami v morfologii a anatomii, dochází ke zkrácení antero-posteriorní osy těla, ke stažení nohou a přeuspořádávání vnitřních orgánů (Møbjerg a kol., 2018).



Obrázek 1. Reakce želvušek na nepříznivé podmínky (upraveno a převzato z: Møbjerg a Neves, 2021).



Obrázek 2. Strukturální změna želvušky: A v příznivých podmínkách B v nepříznivých podmínkách ve stavu soudečku (upraveno a převzato z: Møbjerg a kol., 2018).

2.2 Rozmnožování želvušek

Želvušky se pravděpodobně vyvinuly v moři, kde mají vhodné podmínky pro život. Mořské druhy jsou převážně gonochoristé s poměrem pohlaví cca 1:1, rozmnožují se pohlavně, k partenogenezi nedochází. Postupné osidlování jiných biotopů s méně stabilním prostředím vedlo ke změně způsobu reprodukce. Sladkovodní a suchozemské druhy jsou převážně jednopohlavní, populaci tvoří samice, které se rozmnožují partenogenezí. Méně častý je gonochorismus s vyrovnaným poměrem pohlaví nebo hermafroditismus. Rozmnožování je pak vždy pohlavní (Altiero a kol., 2018).

Vajíčka želvušek mají nejčastěji kulovitý nebo oválný tvar, velikostně měří v průměru 50-100 μm , se skořápkou až 235 μm . Mořští zástupci Heterotardigrada mají vajíčka obalena v lepkavém, hladkém obalu, zatímco suchozemské želvušky mají vajíčka obalená tuhou, sklerotizovanou skořápkou. Doba embryonálního vývoje není u želvušek jednotná (Altiero a kol., 2018).

Želvušky se dle způsobu kladení vajíčka dělí do dvou skupin. První, do které patří například *Hys. convergens* nebo *Mil. Inceptum*, klade vajíčka do svých exuvií (svleček kultikul) (Sugiura a Matsumoto, 2021). U tohoto způsobu se někdy vyskytuje péče o vajíčka. Například samice *Pseudobiotus* nosí exuvii s vajíčky přichycenou na kaudální části těla, dokud se vajíčka nevylíhnou. Vajíčka těchto druhů jsou hladká (Altiero a kol., 2018).

Druhá skupina klade vajíčka volně do okolního prostředí. Příkladem může být *Pam. sp.* (Sugiura a Matsumoto, 2021). Vajíčka volně kladena do prostředí mají geometricky zdobený povrch tvarovými výrůstky, sítkováním nebo jamkami. Tyto morfologické znaky vajíčka mají zásadní taxonomický význam. U této skupiny nebyla pozorována rodičovská péče (Altiero a kol., 2018).

U želvušek dochází k vnějšímu i vnitřnímu oplození. U zástupce třídy Eutardigrada *Isohypsibius granulifera* byly po kopulaci nalezeny spermie přímo ve vaječnicku samice (Nelson a kol., 2015). U *Ursulinius nodosus*, *Hys. convergens* a *Pseudobiotus megalonyx* samec ejakuluje z kloaky do zadního konce samičí exuvie obsahující vajíčka. U *Pseudobiotus megalonyx* bylo pozorováno i jiné chování,

kdy samec propíchl exuvii samice a poté ejakuloval do místa vpichu (Sugiura a Matsumoto, 2021). U některých želvušek dochází k zasnubnímu chování. Příkladem je *Isohypsibius dastychi*, kdy samec drží samici svým prvním párem nohou a samice stimuluje samce pohybem styletu a stahováním sacího hltanu, následně dojde k ejakulaci ze semenných váčků kloakou (Altiero a kol., 2018).

U zástupců třídy Heterotardigrada je známo jen vnější oplození (Sugiura a Matsumoto, 2021). Například samec mořského gonochoristického druhu *Batillipes noerrevangi* stimuluje samici k naklazení vajíček na zrnka písku, která pak oplodní. Vnější oplození bylo pozorováno i u druhu *Actinarctus doryphorus* (Altiero a kol., 2018).

2.3 Životní cyklus

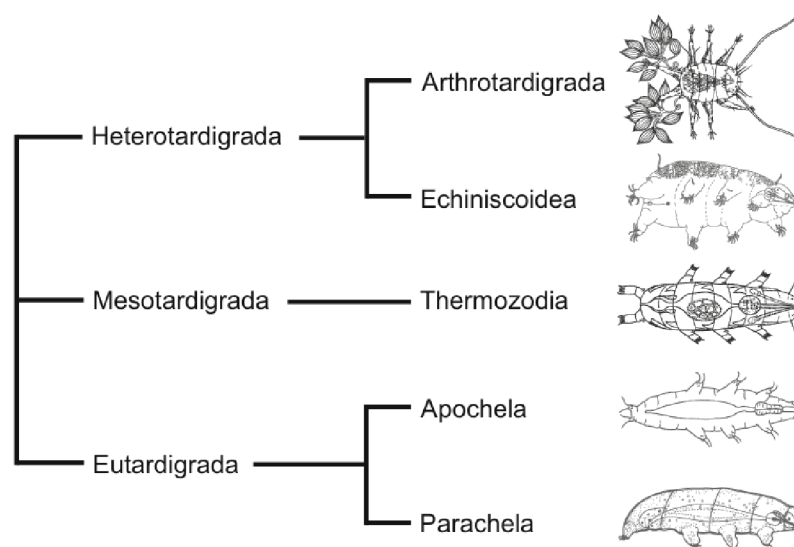
Kultivace želvušek umožnila pozorování jejich životního cyklu od narození až po smrt (Altiero a kol., 2018). Délka života mimo klidová stádia se odhaduje na 3 až 30 měsíců. Při započítání období strávených v klidových stádiích může být délka života značně prodloužena (Nelson a kol., 2015). Životní cyklus samice třídy Eutardigrada zahrnuje několik fází.

Embryonální vývoj trvá od 5 do 100 dní v závislosti na druhu, teplotě a množství kyslíku v prostředí. Následuje vylíhnutí a růst v dospělce. U zástupců třídy Eutardigrada dochází k vývoji přímému, juvenilní jedinci jsou podobní dospělcům. Jsou pouze menší, mají drobné rozdíly v bukalním aparátu a drápkách a mají také nezralé gonády. Sladkovodní a půdní zástupci třídy Heterotardigrada procházejí nepřímým vývojem charakterizovaným dvěma vývojovými stádii. Larvám echiniscidním Heterotardigrada chybí řitní otvor, gonopor a mají na končetinách pouze dva drápky oproti dospělcům, kteří mají drápky čtyři. Po prvním svlékání má juvenilní jedinec již řitní otvor a čtyři drápky, nedosahuje však stále pohlavní zralosti (Nelson a kol., 2015). K dosažení pohlavní zralosti dochází až na výjimky při druhém nebo třetím svlékání. Následuje produkce a kladení vajec, kterých v závislosti na druhu a věku samice a také okolním prostředí může být 1 až 44 v jedné snůšce. K periodickému svlékání dochází i v dospělosti, kdy se s každým svlékáním jedinec zvětšuje, dokud nedoroste do maximální velikosti (Altiero a kol., 2018). Proces svlékání trvá 5-10 dní. Dochází

k vyvržení kutikulární výstelky předního střeva včetně bukální trubice, plakoidů, styletu a styletových podpěr rozšířeným bukálním otvorem. Tím se jedinci dostávají do simplexního stádia, kdy se ústní otvor uzavře a jedinci nemohou přijímat potravu. V tomto stádiu dochází ke znovuvytvoření kutikulární struktury bukální trubice, styletů a jejich podpěr pomocí lícních žláz. Dále pomocí epitelové tkáně jícnu a hltanu dochází k přestavbě zadní části bukálního aparátu. Současně epidermis syntetizuje novou tělní kutikulu, včetně výstelky zadního střeva. Nové drápy vzniknou činností dráповých žláz. Svlékání je dokončeno uvolněním staré kutikuly (Nelson a kol., 2015).

2.4 Taxonomie

Želvušky jsou kmen oddělení Ecdysozoa dělící se na tři třídy: Eutardigrada, Mesotardigrada a Heterotardigrada, schéma je znázorněno na obrázku 3 (Jørgensen a kol., 2018). Taxonomie želvušek tradičně vycházela z morfologie sklerotizovaných struktur, jako jsou drápy, bukální aparát, kutikula nebo vaječná skořápka (Nelson a kol., 2015). Dnes jsou morfologické studie doplňovány o molekulární metody (Jørgensen a kol., 2018).



Obrázek 3. Systém kmene Tardigrada (převzato z: Jørgensen a kol., 2018).

Do třídy Eutardigrada spadá většina popsanych druhů, které obývají především půdní a sladkovodní oblasti. Je pro ně typická hladká kutikula, přítomnost kloaky,

vylučovací orgány tvořené Malpighickými trubicemi, sada dvou dvojitých drápů na každé končetině a absence četných hlavových, tělních a nožních smyslových orgánů, které jsou známé u zástupců třídy Heterotardigrada. Eutardigrada se dělí na dva řády. Apochela s jedinou čeledí Milnesiidae a řádem Parachela, do kterého patří Isohypsibiidae, Hysibioidea, Eohypsibioidea a Macrobiotidea. Řád Parachela se morfologicky vyznačuje absencí vnějších hlavových smyslových přívěšků a přítomností srostlých primárních a sekundárních větví dvojitých drápů (Jørgensen a kol., 2018).

Třída Mesotardigrada byla ustanovena na základě popisu druhu *Thermozodium esakii* Rahm z japonského termálního pramene. Tento druh je však považován za pochybný, protože byl pozorován pouze na této lokalitě, a ta byla zničena zemětřesením. Původní nález se také nedochoval (Nelson a kol., 2015).

Poslední třídou je Heterotardigrada, jejichž jedinci obývají mořské, sladkovodní i půdní oblasti. Morfologicky je charakterizována přítomností řitního otvoru, gonoporu a četnými hlavovými smyslovými přívěsky. Heterotardigrada se dělí na Arthotardigrada, která obývají především moře a Echiniscoidea s především sladkovodními a suchozemskými druhy (Jørgensen a kol., 2018).

2.5 Kultivace želvušek

První zpráva o kultivaci želvušek pochází z roku 1914, kdy von Wenck úspěšně choval druh *Pseudobiotus* v akváriu (Roszkowska a kol., 2021). Od té doby bylo publikováno mnoho kultivačních protokolů lišících se kultivačním médiem, potravou, tepelnými a světelnými podmínkami nebo nádobou na kultivaci. Některé z nich se s malými modifikacemi dají použít pro více druhů. Na druhou stranu pro některé druhy máme hned několik alternativních protokolů, přičemž srovnání efektivity kultivace obvykle chybí.

Požívanými kultivačními médii jsou obvykle Chalkeyho médium ve směsi s půdním extraktem (složení Chalkeyho média v příloze A, tab. 8), vhodná minerální voda (nejčastěji Volvic, Żywiec Zdrój a Geysler), nebo jejich směs s destilovanou/kohoutkovou vodou. Pohyb želvušek je usnadněn zdrsněním povrchu

skleněné nebo plastové nádoby, případně pěstování na agaru. Některé protokoly zahrnují periodické vysychání kultury, zatímco jiné jsou prováděny ve vodním prostředí.

Potravou býložravých jedinců jsou nejčastěji řasy rodu *Chlorella* nebo *Chlorococcus*. Výjimečně se používají i jiné druhy řas. Dravé druhy jsou krmeny hlísticemi, vířníky nebo *Hys. exemplaris*. Řasa je někdy podávána juvenilním jedincům.

V příloze A uvádím kultivační metody pro jednotlivé rody želvušek, nejpodstatnější informace jsou zahrnuty v tabulce 9. Tento přehled rozšiřuje informace z přehledového článku Roszkowska a kol., 2021. Kromě rešerše nové literatury doplňuje i detailnější informace z tam citované literatury.

2.5.1 Rod *Hypsibius*

Hypsibius je rod patřící do třídy Eutardigrada, řádu Parachela, vyskytující se ve sladkovodních útvarech, jako jsou potoky, řeky a jezera, ale také v mechorostech, či na cévnatých rostlinách (McFatter, Meyer, a Hinton, 2007). Jedná se o býložravce, kteří se nejčastěji živí zelenými řasami, ale i některými druhy sinic a hub (Bryndová a kol., 2020).

Jedinci *Hys. exemplaris* dosahují velikosti přibližně 0,26 mm, samice s vajíčky bývají dočasně větší než samice bez vajec. Samice klade v první snůšce průměrně 1 až 3 vajíčka, počet vajíček nakladených na exuvii se s časem zvyšuje. Nejvyšší produkce je dosažena 18-24 den, poté postupně klesá. Samice naklade za život průměrně 42 vajec (Stone a Vasanthan, 2020). Líhnutí vajec trvá necelých 5 dní (Gabriel a kol., 2007). Délka života byla v průměru $61,9 \pm 9,9$ dne, přičemž se za život svlékli přibližně jedenáctkrát (Stone a Vasanthan, 2020).

V průběhu let bylo publikováno mnoho protokolů pro kultivaci. Společné pro ně je, že kultivace probíhá buď přímo v médiu nebo na agarových površích překrytých médiem. Jako krmivo se používají řasy *Chlorococcum sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp.*, případně jejich směsi. Nedávno byly protokoly modifikovány i pro *Hys. pallidoides* (Tumanov, 2020). Jednotlivé protokoly jsou uvedeny v příloze A.

2.5.2 Rod *Ramazzottius*

Ramazzottius je rod patřící do čeledi *Hypsibiidae*. Jedná se o suchozemské a býložravé želvušky (Yoshida a kol., 2017).

Úspěšně byl zatím kultivován pouze druh *Ram. varieornatus*. Publikované protokoly používající Petriho misky s (bacto)agarovou vrstvou překrytou médiem a *Chlorellou vulgaris* jako krmivem jsou podobné těm pro rod *Hypsibius* a jsou uvedeny níže. Neves a kol., 2020 úspěšně kultivovali *Ram. varieornatus* v sebraném vzorku listů, mechu nebo rostlinné drti suspendované v deionizované vodě při 5 °C. Živiny tak želvušky získávaly z přirozeného prostředí. Před kultivací bylo možné vzorky uchovávat při -20 °C. Jednotlivé protokoly jsou uvedeny v příloze A.

2.5.3 Rod *Milnesium*

Milnesium je suchozemský rod třídy Eutardigrada, řadu Apochela, který se nejčastěji vyskytuje na vlhkých místech, jako jsou mechy, spadané listí, lišejníky a další. Jedná se o všežravce, nejčastěji se živící prvoky, hlísticemi, řasami nebo menšími zástupci třídy Eutardigrada (např. jedinci rodu *Hypsibius* nebo *Diphascon*) (Nelson, 2002; Suzuki, 2003).

Nejrozšířenějším zástupcem *Milesií* je *Mil. tardigradum*, u kterého reprodukce nejčastěji probíhá pomocí partenogeneze. Samice ukládá snůšku (obsahující 1-12 vajíček) do staré kutikuly, vajíčka se líhnou za 5-16 dní. Aktivní délka života jedinců chovaných v laboratorních podmínkách činila $42,7 \pm 11,8$ dní (Suzuki, 2003).

Kromě *Mil. tardigradum* se podařilo kultivovat i *Mil. pacifikum* a *Mil. inceptum*, *Mil. variefidum*, *Mil. aligenum* a *Mil. eurystomum*. Potravou jsou vířníci (*Lecane inermis*, *Philodina citrina*), hlístice (*Caenorhabditis elegans*) nebo želvušky (*Hys. exemplaris*). Juvenilní jedinci jsou v některých protokolech krmeni řasou (*Chlorogonium elongatum*). Řasa je někdy přidávána i kvůli zvýšení životnosti vířníků. Kultivační nádoby jsou pokryty agarem nebo mají poškrábané dno. Médiem je obvykle minerální voda. Některé protokoly uvádí i velikost sloupce média (několik mm), parametr může být důležitý pro dostatečné zásobení kultury terestrického druhu kyslíkem. Jednotlivé protokoly jsou popsány v příloze A.

2.5.4 Rod *Paramacrobotus*

Rod *Paramacrobotus* patří do třídy Eutardigrada, řádu Parachela, čeledi Macrobiotidae se dělí na dvě morfologicky odlišné skupiny. První je *richtersi* s přítomností mikroplakoidu v hltanu a druhou skupinou je *areolatus* vyznačující se absencí mikroplakoidu. Jedná se o kosmopolitní, všežravý rod, který se krmí sinicemi, řasami, vířníky, hlísticemi nebo malými juvenilními želvuškami. Zatímco dospělci preferují konzumaci jiných živočichů (vířníci a hlístice), mláďata jsou především býložravá a jedí obvykle jednobuněčné zelené řasy. Délka života je napříč druhy odlišná, například *Pam. farbanksi* se dožívá kolem 137 dní. U *Paramacrobotus* se nachází oboupohlavní i jedнопohlavní populace. Velmi častá je reprodukce pomocí partenogeneze. Dále bylo pozorováno i vnější oplození, ke kterému dochází po naklazení vajec (Kayastha a kol., 2023).

Pro rod *Paramacrobotus* jsou známy protokoly pro kultivaci *Pam. sp.*, *Pam. fairbanksi*, *Pam. richtersi*, *Pam. tonolii*, *Pam. palaui*, *Pam. kenianus*, *Pam. experimentalis* nebo *Pam. gadabouti sp. nov.* Kultivace probíhá na agaru nebo přímo v médiu v nádobách s poškrábaným dnem. Potravou jsou hlístice (*Pristionchus iheritierii*, *Panagrolaimus rigidus*, *C. elegans*, *Pelodera teres*, *Panagrellus sp.*) nebo vířníci (*P. citrina*, *L. inermis*), ke kterým byly v některých protokolech přidávány řasy nebo jejich směs (*Chlorogonium elongatum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp.*). Jednotlivé protokoly jsou uvedeny v příloze A.

2.5.5 Rod *Echiniscus*, *Pseudechiniscus* a *Viridiscus*

Úspěšný pokus o kultivaci (Momeni, Fuentes-González a Pienaar, 2022) zahrnoval chování želvušek v mechu, ve kterém byly nalezeny *Echiniscus sp.*, *Pseudechiniscus ramazzotti* a *Viridiscus viridianus* byly umístěny do 10 cm Petriho misek potažených 1,2% agarovým gelem vytvořeným v roztoku KCM a převrstvené 2mm dešťové vody. Petriho misky byly překryty víčkem, aby se minimalizovalo odpařování a byly ponechány ve vlhkém stavu po dobu tří měsíců. Médium bylo měněno každé tři dny, čímž se zabraňovalo množení bakterií a zároveň tím byl poskytnut čerstvý kyslík. Pipetou se odebíralo staré médium a přidávala se nová dešťová voda. Želvušky pojídaly jednobuněčné řasy *Chlorella vulgaris* a mechové prvoklíčky, které začaly růst na agaru.

Tyto kultury byly schopné existovat maximálně po tři generace (Momeni, Fuentes-González a Pienaar, 2022).

Autoři se dále pokusili zvýšit úspěšnost kultivace zařazením vysušení kultury, přičemž 84 % jedinců vytvořilo soudečky v mechu. Po rehydratování došlo do 30 minut k aktivaci 96 % jedinců. U zbylých 16 % jedinců, kteří vytvořili soudečky mimo mech došlo k obnovení aktivity pouze u 48 %. Oproti kulturám, ve kterých byla neustále vrstva média, došlo ke zvýšení produkce vajec, což vedlo k myšlence udržovat kultury v opakovaných cyklech vysoušení a rehydratace (Momeni, Fuentes-González a Pienaar, 2022).

Níže uvádím další detaily z protokolu vyvinutého kolektivem Momeni, Fuentes-González a Pienaar, 2022. Živé výhonky mechu se vkládají do Petriho misek na 2 mm vrstvu 1,2% agaru v roztoku KCM (7 mg KCL, 8 mg CaCl₂ a 8 mg MgSO₄ v 1 l deionizované vody). Mechové výhonky je nutné denně postříkovat dešťovou nebo minerální vodou, dokud nevyroste prvoklíček, který slouží želvuškám jako potrava, ale i jako prostředí pro rozmnožování. Růst mechu trvající přibližně měsíc se dá urychlit vystavením výhonků pod nepřetržité světlo. Poté, co protonema pokryje téměř celou Petriho misku, je vhodné přidat *C. vulgaris*, 1-2 ml dešťové/minerální vody (případně jejich směsi) a přidat želvušky. Po deset dalších dní se vždy přes noc nechá médium odpařovat a ráno se přidá 1-2 ml vody a 20-60 µl *C. vulgaris*. Tímto krokem jsou napodobovány přirozené podmínky, kdy ráno napadne rosa, která přes den vyschne. Je tím také zajištěn i dostatek kyslíku. Po deseti dnech se nechá miska po dobu tří dnů vysychat. Následují cykly kultivace v hydratovaném a dehydratovaném stavu. Podmínky pro kultivaci byly 55% vlhkost, 20-25 °C a fotoperioda 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Do dvou až tří měsíců je nutné přenést polovinu želvušek na novou Petriho misku. Agar musí být každý měsíc kontrolován, zda nedošlo k jeho rozpadu a v případě poškození gelu přenést želvušky na novou misku (Momeni, Fuentes-González a Pienaar, 2022).

2.6 Ramanova spektrometrie

2.6.1 Princip Ramanovy spektrometrie

Ramanova spektrometrie je metoda založena na měření rozptýleného záření, které má vyšší nebo nižší frekvenci než záření primárního zdroje. Interakcí monochromatického záření s molekulami vzorku, dochází ke změně vibračních a rotačních stavů molekuly, což má za následek dva typy rozptylu světla, pružný a nepružný.

Při pružném neboli Rayleighovu rozptylu dojde k dopadu fotonu na molekulu, která převezme kvantum energie a přejde na vyšší vibrační a rotační energetický stav. Získanou energii molekula vyzáří ve formě fotonu, čímž se okamžitě vrací do základního stavu. Molekula tedy vyzáří stejné kvantum energie, jaké srážkou získala. Z tohoto důvodu tento rozptyl nenes analytickou informaci.

Při nepružných srážkách má rozptýlené záření jinou frekvenci než primární foton, což je způsobeno tím, že se rozkmitaná molekula nevrátila na původní hladinu, ale zaujala jiný vibrační a rotační stav. Jsou dva typy nepružných srážek. Při Stokesově rozptylu molekula srážkou s fotonem přejde na vyšší energetickou hladinu a při zpětném přechodu zůstane na vyšší vibrační a rotační hladině. Kvantum vyzářené energie je tedy menší než kvantum získané srážkou, rozptýlené záření má nižší frekvenci než záření absorbované. Druhým typem je anti-Stokesův rozptyl, kdy je molekula již před přijetím energie fotonu ve vyšším vibračním a rotačním stavu a o vyzáření energie se může navrátit do nižšího nebo základního stavu. Kvantum vyzářené energie je tedy vyšší než kvantum získané srážkou, rozptýlené záření má vyšší frekvence než záření absorbované. Intenzita anti-Stokesových čar je ve spektru nižší než intenzita Stokesových čar, protože při normální teplotě je jen malý počet molekul před excitací ve vyšším vibračním stavu.

Podmínkou pro aktivitu vibrace v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekul v průběhu vibrace. Tuto vlastnost mají především nepolární části molekul, proto jsou intenzivní pásy v Ramanově spektru tvořeny vibracemi nepolárních vazeb. Dalším požadavkem pro získání Ramanových spekter je symetrie molekuly. Funkční skupiny, které vykazují silné Ramanovo spektrum jsou například $-C-X$, $-C-NO_2$, $-C-S-$, $-S-S-$, $-C=C-$, $-C=S-$, $-N=N-$, $-S-H-$, $-CN$ (Das, 2011).

Ramanův spektrometr je složen ze zdroje, který vysílá monochromatické, intenzivní a koherentní záření (nejčastěji laser), držáku na vzorek, monochromátoru a detektoru (nejčastěji fotoelektrický násobič), který detekuje rozptýlené záření kolmé ke směru dopadajícího záření. Ramanovo spektrum se měří v oblasti od 10 do 4000 cm^{-1} (Holzbecher a kol., 1987; Klouda, 2016; Němcová, Čermák a Rychlovský, 1997).

2.6.2 Ramanova spektrometrie v biologii

Ramanova spektroskopie se používá ve strukturní biologii a buněčné biofyzice, nejen k analýze lipidů, proteinů, peptidů, DNA, RNA a malých organických molekul, ale i studiu interakcí protein-protein nebo protein-lipid za různých podmínek. Pokud se spektrum měří v soustavě bodů preparátu na podložním skle, je možné vygenerovat prostorový obraz chemického složení objektu (Ramanova mikroskopie) (Vlasov a kol., 2020).

Dále je Ramanova spektroskopie používána v různých lékařských oborech ke studiu neurodegenerativních, aterosklerotických, kardiovaskulárních onemocnění nebo rakoviny, protože spektra biologických vzorků jsou citlivá na biochemické a strukturní změny, které v buňkách vznikají v důsledku onemocnění. Kromě toho se využívá i k optimalizaci výroby nových léků (Vlasov a kol., 2020).

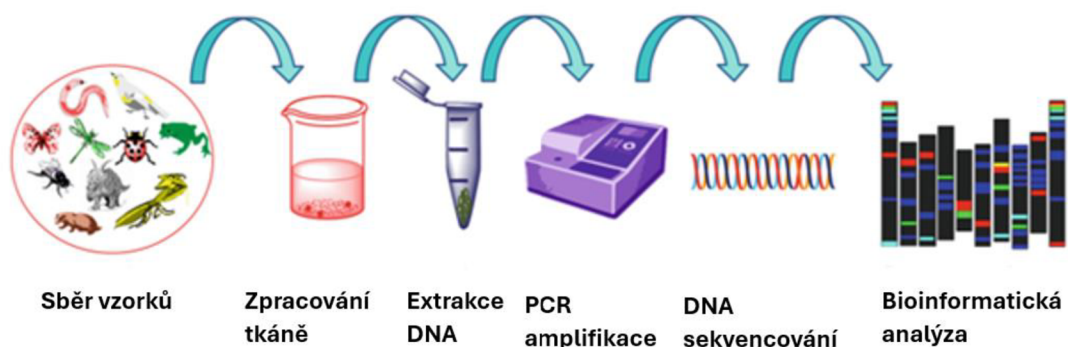
Jediným publikovaným článkem, který využívá Ramanovu spektroskopii pro studium želvušek, je práce Bonifacio a kol., 2012, kteří analyzovali pigmenty v *Echiniscus blumi*. Identifikovali karotenoid (pravděpodobně β -karoten), který želvušky pravděpodobně přijímají z mechu, kterým se živí. Také byla prokázána přítomnost karotenoidů v tělní dutině, vejcích a v očních skvrnách. V kutikule a epidermis se karotenoidy nevyskytovaly (Bonifacio a kol., 2012).

2.7 DNA barkórování

Název DNA barkódování vznikl analogicky s čárovými kódy Uniform Product Code, které se používají na vyrobeném zboží. Jedná se totiž o analýzu krátké sekvence DNA jednotného cílového genu, která umožní identifikaci druhu srovnáním s databází. Tato metoda se dá využít k studiu biologické rozmanitosti, identifikaci vajíček a larválních

druhů nebo potravních sítí na základě analýzy obsahu žaludku, či exkrementů (Stoeckle, 2003).

Sekvence vhodná pro DNA barkódování by měla splňovat následující kritéria. Měla by být krátká (ideálně 400-800 párů bází), čímž se usnadní extrakce a amplifikace DNA, dále by měla být snadno získatelná a charakterizována pro všechny druhy na planetě. Musí také obsahovat významnou genetickou variabilitu a divergenci na úrovni druhu a mít konzervovaná terminální místa pro vývoj univerzálních primerů. Pro identifikaci zvířat na úrovni druhu se osvědčila 600 párů bází dlouhá sekvence DNA mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidásovou podjednotku 1 (CO1) (Kress a Erickson, 2008). Dalšími často využívanými sekvencemi na tvorbu primerů jsou např. malá nukleární podjednotka ribozomální RNA (SSU, také u eukaryot známá jako 18S rRNA), velká nukleární podjednotka ribozomální RNA (LSU, také známá jako 28S rRNA), vnitřní transkribovaný úsek ribozomálního RNA cistronu (ITS) nebo chloroplastický gen kódující velkou subjednotku ribulóza bisfosfát karboxylázy (rbcL) (Blaxter, 2004). Kód se následně porovná s knihovnou barkódů, která slouží jako standard. Přiřazením sekvence neznámého vzorku dojde k jeho identifikaci nebo objevení nového druhu (Kress a Erickson, 2008). Schéma zisku a zpracování DNA ze vzorku je znázorněno na obr. 4.



Obrázek 4. Schéma barkódování (upraveno a převzato z: Suriya a kol., 2020).

3 Materiál a metody

3.1 Přístrojové a laboratorní vybavení

- Automatický mikroskop CV7000 (Yokogawa)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga Microstar 17R (VWR)
- Centrifuga Jouan BR4I (Trigon-plus)
- Flow box Biohazard box, MSC-Advantage™ (Thermo Fisher Scientific)
- Mikroskop inverzní s fázovým kontrastem Olympus IX70 (Olympus)
- Digitální kamera na mikroskop DP73 (Olympus)
- Laboratorní váha Vibra AJ-420CE (Shinko Denshi)
- Minicentrifuga D1008 (Dlab)
- NanoDrop 1000 (Thermo fisher)
- Nádoba na elektroforézu SUB13 Mini-Plus (Hoefer)
- Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences)
- Ramanův mikroskop 300R+ (Witec Alpha)
- Termocyklér C1000 Touch s nástavbou CFX96 Real-Time systém (Biorad)
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- VS200 Research Slide Scanner (Olympus)
- Quick-DNA™ Microprep Plus Kit (Zymo Research)
- Zdroj PowerPac™ Basic Power Supply (BioRad)

3.1.1 Spotřební materiál

- Krycí sklo
- Lak na nehty, bezbarvý
- Mikrozkušavky pro PCR 0,2 ml (Biologix)
- Mikrozkušavka 1,5 ml (Eppendorf)
- Mikrozkušavka 2 ml (Eppendorf)
- Podložní sklo
- 384jamkové desky pro mikroskopii Cell Carrier Ultra (Perkin Elmer)
- 6jamkové desky (TPP)
- 24jamkové desky (TPP)

- 96jamkové desky (TPP)

3.2 Biologický materiál

- Mechy
 - vlastní sběr – N = 31
 - vzorky získané ve spolupráci se středními školami – N = 203

3.3 Použité chemikálie

- Agarosa (Sigma Aldrich)
- DNA Electrophoresis Sample Loading Dye (BioRad)
- ExoCleanUp FAST (VWR)
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
- Minerální voda Volvic
- M9 médium
 - M9 médium bylo připraveno z 1,5 g KH_2PO_4 , 3 g Na_2HPO_4 , 2,5 g NaCl, 500 μL 1 M MgSO_4 , H_2O na 500 ml, autoklávováno.
- Oligonukleotidy LCO1490, HCO2198, ITS3F, ITS4R, SSUF04, SSUR26, 28S rRNA48aF a 7b (Generi Biotech)
- Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO[®], antifading (Supelco)
- Růstové médium
 - Růstové médium pro hlístice na Petriho misky bylo připraveno z 1,5 g NaCl, 8,5 g agarosy, 1,25 g peptonu s 487,5 ml destilované vody, roztok byl autoklávován. Poté byl roztok přenesen na vodní lázeň o teplotě 50 °C a bylo přidáno 500 μL 1 M CaCl_2 , 500 μL 5mg/ml cholesterolu v ethanolu, 500 μL 1 M MgSO_4 , 12,5 ml 1M KPO_4 pufry (54,15 g KH_2PO_2 , 17,8 g K_2HPO_4 v 500 ml H_2O). Mezi jednotlivými přidávánímí byl roztok promíchán, přesto však nesmělo dojít ke ztuhnutí média. Na jednu Petriho misku připadá 10-12 ml média, které musí být nanášeno ve flowboxu. Poté musí být na misku nasazeny bakterie *E. coli* (kmen OP50). Na jednu Petriho misku připadá 100 μL *E. coli* v TB médiu. Skleněnou hokejkou byly bakterie rozprostřeny po celém médiu. Petriho misky byly pokryty

parafilmem a umístěny do 37 °C, po 24 hodinách byly přemístěny do 4 °C. Je vhodné je využít maximálně do měsíce od jejich vzniku. Kultury je vhodné přenášet na novou desku alespoň jednou za dva týdny.

- Savo
- S-complete medium
 - S-complete medium bylo připraveno z 500 ml bazálního média, 5 ml citronanu draselného (pH = 6), 5 ml roztoku stopových kovů, 1,5 ml 1 M CaCl₂, 1,5 ml 1 M MgSO₄.
- SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad)
- TAE pufr
 - 10x koncentrovaný TAE pufr byl připraven 0,4M Tris, 0,4M kyseliny octové, 10mM EDTA, pH 8,0 a následně byl zředěn destilovanou vodou.
- 3M NaOH
- 100 bp Molecular Ruler (BioRad)

3.4 Metodika

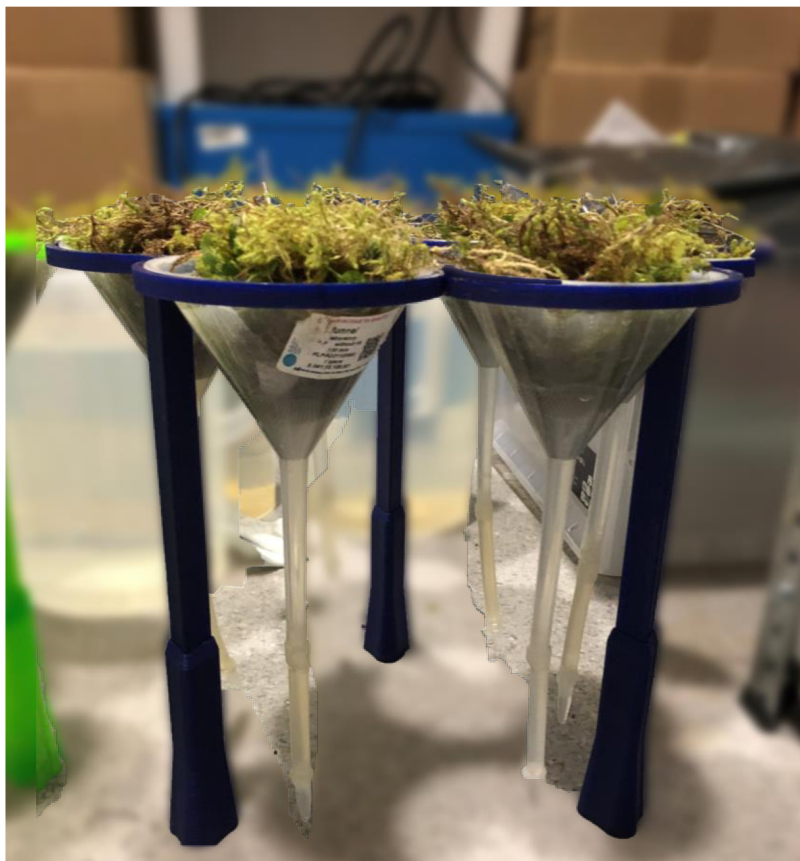
3.4.1 Izolace želvušek z mechu

Vzorky mechu pokrývaly přibližně 10 cm². Pro každý vzorek byly dále zaznamenány tyto informace: datum sběru, GPS souřadnice, údaje o lokalitě, vlhkost mechu a fotky odběrového místa s detailními fotkami mechu, pro jejich možnou identifikaci. Mech byl před doručením do laboratoře uchováván v lednici nebo na chladném místě.

3.4.1.1 Izolace pomocí Baermannových nálevek

Možným způsobem, jak izolovat želvušky z mechu je za použití Baermannových nálevek (obr. 5). Na stopku Baermannovy nálevky byla nasunuta silikonová hadička a na druhý konec hadičky byla připojena mikrozukmavka (spoje byly utěsněny parafilmem). Systém byl minerální vodou zavodněn tak, že hladina dosahovala po spodní okraj sítko Baermannovy nálevky. Bylo třeba se ujistit, zda nebyl přerušen vodní sloupec vzduchovými bublinami. Na sítko byl položen toaletní papír, na který se umístil mech, růstovými vrcholky směrem dolů. Mech byl zalit kohoutkovou vodou. Spodek Baermannovy nálevky byl ponořen do ledové lázně (voda dosahovala po sítko), ze shora byl zahříván izolovanou vyhřívací podložkou, která byla nastavena na 40 °C.

Po dvou dnech byla izolace ukončena. Hadička se ustříhla nad mikrozkuřavkou a obsah mikrozkuřavky byl přenesen do Volvicu do 6 nebo 24jamkové desky. Desky byly uchovávány při 4 °C.



Obrázek 5. Izolace želvušek pomocí Baermannovy nálevky.

3.4.1.2 Izolace pomocí inzertů

Dalším způsobem, jak izolovat želvušky z mechu je za pomoci inzertů. Na 3D tiskárně byly vytisknuty inzerty rozměrem odpovídající jamkám 6jamkového panelu pro kultivaci buněk (obr. 6), do kterých bylo nasazeno sítko s okem 0.5 mm. Při izolaci byl na sítko položen toaletní papír a takové množství mechu, aby vyplnil inzert. Mech se rozebral na malé kousky, aby se usnadnil pohyb želvuškám. Pokud byl mech s hlínou, zelená část vzorku se směřovala dolů. Inzerty byly následně postaveny do 15 cm Petriho misky, ve které byla přibližně 1 cm vysoká vrstva kohoutkové vody a byly tak ponechány minimálně pět minut. Tento krok sloužil k tomu, aby mech přijmul co nejvíce vody. Před vložením inzertů do 6jamkového panelu bylo do jamek napipetováno 5 ml minerální vody Volvic. Inzerty byly vloženy do 6jamkové desky.

Mechy pak ještě byly zality 2 ml minerální vody. Po nasazení víčka byla deska uchována při 17 °C. V této fázi měly želvušky v klidových stádiích možnost rehydratovat se a obnovit aktivitu.

Před vlastní izolací s využitím teplotního gradientu byla přidána voda, tak aby dosahovala horního okraje inzertů. Poté byly desky umístěny na vodní chladič, kterým kolovala voda vychlazená na 17 °C, a z vrchní strany se umístila odizolovaná vyhřívací podložka temperovaná na 40 °C, čímž vznikl teplotní gradient. Izolace probíhala dva dny. Po ukončení izolace byly inzerty vyjmuty a desky uchovávány při 4 °C. Vzhledem k bakteriálnímu nárůstu bylo v některých případech nutno vodu v inzertech částečně nahradit minerální vodou Volvic, případně želvušky pochyťat pomocí mikropipety a přenést do desky (obvykle 24jamkové) s vodou Volvic.



Obrázek 6. Inzerty do 6jamkové desky se sítkem.

3.4.2 Kultivace

Želvušky byly kultivovány v 24jamkových deskách při 4 °C. Kultivačním médiem byla minerální voda Volvic s destilovanou vodou v poměru 1:1. Průběžně byly želvušky krmeny hlísticemi *C. elegans* a řasou *Chlorella vulgaris*.

3.4.3 Optická mikroskopie

Želvušky po izolaci byly pozorovány pomocí světelné mikroskopie (Olympus IX70 s kamerou DP73) v kultivačních deskách, obvykle bylo natočeno video pohybující se želvušky při zvětšení 40x-400x. Další informace o morfologických detailech byly získány pomocí pozorování želvušek v 384jamkových deskách na mikroskopu Voyager 7000 (Yokogawa) ve viditelném světle a po indukci autofluorescence UV zářením. Trvalé preparáty byly pozorovány na skeneru mikroskopických skel VS2000 (Olympus).

3.4.3.1 Příprava trvalých preparátů pro optickou mikroskopii

Želvuška byla z kultury mikropipetou přenesena do kapky destilované vody na Petriho misce. Z kapky byla v 10 µl destilované vody přenesena na podložní sklo. Podložní sklo bylo ze spodu krátce ožiháno zapalovačem, aby došlo k usmrcení želvušky místo vytvoření soudečku. Zároveň se tak objem vody snížil přibližně na 5 µl. Ke vzorku bylo přidáno 5 µl polyvinylalkoholu a vzorek byl překryt krycím sklem. Krycí sklo bylo obtaženo průhledným lakem na nehty.

3.4.4 Ramanova mikroskopie

3.4.4.1 Příprava vzorků pro Ramanovu mikroskopii

Želvušky v kultivačním roztoku byly zcentrifugovány a zakoncentrovány. Následně byla nanесena kapka média obsahující želvušky na speciální podložní sklo pro Ramanovu mikroskopii a k ní byl přidán ethanol v poměru 1:1, čímž došlo k usmrcení želvušek. Po vyschnutí vzorku byl kolem něho na podložní sklo z fluoridu vápenatého nanесen bezbarvý lak na nehty, v přibližném obvodu krycího skla. Poté byla přidána kapka vody na vzorek, který byl následně překryt krycím sklem. Lak byl nanесen z důvodu zpomalení vysychání vody.

3.4.4.2 Analýza na Ramanově mikroskopu

Vzorky byl změřeny na Ramanově mikroskopu 300R+ (Witec Alpha) s laserem o vlnové délce 532 nm a výkonu 5 mW. Doba expozice v každém bodu byla 1 sekunda, rozlišení mapy 1 µm.

3.4.5 Příprava synchronizovaných kultur *Caenorhabditis elegans*

C. elegans se využívá jako potrava pro některé druhy želvušek. Pro získání vajíček z dospělých jedinců se používá technika rozpuštění těl v roztoku chlornanu a hydroxidu sodného („bleaching“). Uvolněná vajíčka pak dají vzniknout věkově synchronizované

populaci. Během procedury dochází i k likvidaci bakterií a případné kontaminaci. Protokol byl převzat wormbooku od Stiernagle, 2006.

Kromě přípravy vajíček probíhala práce za sterilních podmínek. Pracovalo se s kulturami *C. elegans*, které nebyly starší než sedm dní. Z 1-2 Petriho misek byly *C. elegans* smyty 5 ml destilované vody do 15 ml centrifugační zkumavky. Zkumavka byla centrifugována při 280 G po dobu dvou minut. Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 15 ml destilované vody, obsah zkumavky byl promíchán a zcentrifugován při 280 G dvě minuty. Tímto krokem dochází k očištění hlístic od bakterií. Po odebrání supernatantu bylo k *C. elegans* přidáno 5 ml lyzačního roztoku, který byl čerstvě připraven z 2,5 ml chlornanu (v našem případě Savo), 3 ml 3M NaOH a 4,5 ml destilované vody. Inkubace s opakovaným protřepáváním trvala přibližně pět minut. Hlístice byly průběžně kontrolovány pod mikroskopem. Jakmile se uvolnila vajíčka, přidalo se do zkumavky 10 ml M9 média, čímž došlo k neutralizaci. Ihned poté byla provedena centrifugace při 1100 G po dobu dvou minut, poté byl supernatant odlit (je důležité vylít tekutinu naráz, aby nedošlo k uvolnění peletu). Zkumavka byla doplněna 15 ml M9 média a centrifugována při 1100 G dvě minuty, po odlití supernatantu byl sediment resuspendován pomocí 200 µl pipety. Tento krok byl zopakován třikrát. Poté byla zkumavka doplněna 15 ml roztoku S-complete, centrifugována dvě minuty při 1100 G, supernatant byl odlit, pelet resuspendován a objem doplněn na 10 ml roztokem S-complete.

Následně je nutné spočítat množství izolovaných vajíček v suspenzi. Do 384jamkové desky se po dobrém promíchání odebralo 3x 25 µl vzorku. Pod mikroskopem byl zjištěn počet vajíček a přepočítán celkový objem suspenze. Zkumavka byla na závěr umístěna do rotátoru při pokojové teplotě, kde se většina vajíček vylíhne do 24 hodin.

3.4.6 Genotypizace divokých želvušek z mechu

3.4.6.1 Izolace DNA

Při přípravě zpracování biologického materiálu jsem postupovala dle modifikovaného protokolu, který v rámci stáže v laboratoři školitele optimalizovala Sarah Miriam Berger. Pro vlastní izolaci DNA se používal kit Quick-DNA™ Microprep Plus Kit (Zymo Research).

Jednotlivé želvušky vybrané pro genotypování byly dokumentovány pomocí mikroskopie, aby mohla být provedena charakteristika, jak podle fenotypu, tak genotypu. Jedinci byli opakovaným přenášením mezi jamkami s destilovanou vodou očištěni od biologického materiálu, který by mohl interferovat s genotypováním. Nakonec byly vneseny do malé kapky lyzačního pufru a propíchnuty inzulinovou jehlou, aby se uvolnily buňky. Želvuška a buňky byly přidány k 90 µl lyzačního pufru (pufr byl vytvořen smícháním modrým lyzačním pufrem s vodou bez nukleas v poměru 1:1) v PCR mikrozkušavkách.

Mikrozkušavky byly vystaveny teplotě -80 °C v hlubokomrazícím boxu na 15 minut. Poté byly zahřáty na 55 °C v PCR cycleru na 10 minut. Tyto dva kroky se dvakrát zopakovaly, čímž došlo k dalšímu rozrušení tkání želvušek a uvolnění DNA. Poté bylo ke vzorku přidáno 10 µl proteinkinázy K a strip byl vložen do PCR cycleru při teplotě 55 °C na jednu hodinu.

Po inkubaci se přidalo ke vzorku 200 µl Binding pufru, vzorek byl zvortexován a poté centrifugován při 12000 G jednu minutu. Supernatant byl přenesen na průtokovou kolonku Zymo-Spin™ IC-XM, která byla umístěna do sběrné kolonky. Do průtokové kolonky bylo přidáno 200 µl DNA pre-Wash pufru a sestava byla zcentrifugována při 12000 G jednu minutu. Sběrná kolonka byla vyměněna a do průtokové kolonky bylo přidáno 700 µl g-DNA wash pufru, centrifugace probíhala při 12000 G po dobu jedné minuty. Po vylití tekutiny ze sběrné kolonky bylo do průtokové kolonky přidáno 200 µl g-DNA wash pufru a kolonka byla centrifugována při 12000 G jednu minutu. Průtoková kolonka byla přenesena na novou mikrocentrifugační zkumavku. Přímo na matrix kolonky bylo nanášeno 24 µl DNA elučního pufru a vzorek se nechal inkubovat při pokojové teplotě pět minut. Následovala centrifugace při 16000 G po dobu jedné minuty. Eluát obsahující DNA v mikrocentrifugační zkumavce byl zamražen při -20 °C. Po celou dobu izolace bylo třeba si dávat pozor, aby nedošlo k vyschnutí matrixu průtokové kolonky.

3.4.6.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR reakce byly provedeny s primery pro DNA barkódování převzaté z literatury (Massa a kol., 2021). Amplifikované sekvence zahrnovaly geny, které jsou uvedeny v tabulce 1. Do stripů s PCR zkumavkami bylo přidáno 10 µl mastermixu SsoAdvanced Universal

SYBR Green Supermix, 2 µl příslušných primerů (tab. 1) o koncentraci 1 µM, 2 µl DNA a objem byl doplněn na 20 µl vody bez nukleáz. Stripy byly krátce zcentrifugovány a vloženy do termocycleru. PCR reakce obvykle měla 40 cyklů, přehled teplot a dob trvání jednotlivých fází je uveden v tabulce 2. Průběh PCR bylo možné sledovat díky tomu, že SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermixu obsahoval interkalační barvivo.

Tabulka 1. Přehled primerů.

Cílový gen	Přímá sekvence	Opačná sekvence	Počet párů bází sekvence u <i>Hys. exemplaris</i>
	5'-	5'-	
COX1	GGTCAACAAATCATAAAGATA	TAAACTTCAGGGTGACCAAA	727
	TTGG-3'	AAATCA-3'	
	5'-	5'-	
ITS2	GCATCGATGAAGAACGCA	AGTTYTTTTCCTCCGCTTA	534
	G-3'	-3'	
	5'-	5'-GACTTCCCTTACCTACAT-	
28 S	ACCTATTCTCAAACCTTAAAT	3'	934
	GG-3'		
	5'-	3'-	
18 S	GCTTGTCTCAAAGATTAAGC	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG	936
	C-3'	-5'	

Tabulka 2. Podmínky PCR.

Úvodní denaturace	Denaturace	Hybridizace	Elongace	Finální elongace	Uchování
95 °C	94 °C	45 °C	72 °C	72 °C	4 °C
180 sek.	30 sek.	30 sek.	60 sek.	360 sek.	-
1x		39x		1x	-

3.4.6.3 Horizontální agarosová elektroforéza

Pokud se při RT-PCR amplifikovala DNA, bylo nutné ověřit, že reakce poskytla pouze jeden produkt. K tomu byla použita elektroforéza v agarosovém gelu.

Z aparatury na elektroforézu (SUB13 Mini-Plus od značky Hoefer) se vyjmul držák na gel, otočil se o 90° a zasadil se rovnoměrně zpět, aby nedošlo k vylití nebo nerovnoměrnému zatuhnutí gelu. K přípravě gelu bylo naváženo 0,6 g agarosy, která byla smíchána s 60 ml TAE pufru a 0,6 µl barviva GelRed. Agarosa byla rozpuštěna zahříváním v mikrovlnné troubě. Je nutné si dávat pozor na skrytý bod varu. Poté, co vznikla čirá tekutina byla kádinka chlazena za stálého míchání pod proudem studené vody. Při snížení teploty na přibližně 60 °C (je možné udržet ruku na kádince) byl roztok nalit do držáku na gel. Ihned byly do rýh držáku umístěny dva hřebínky. Po zatuhnutí gelu byl držák vrácen o původních 90° a aparatura byla naplněna TAE pufrem.

Ze zkumavek s PCR produkty byly odebrány 4 µl a přeneseny do nových stripů s mikrozukmavkami, kde byly smíchány s 0,67 µl nanášecího pufru. Do první jamky gelu byl přidán 1 µl DNA hmotnostního standardu, do dalších jamek pak 2 µl vzorku. Elektroforéza běžela při 120 V, 400 mA po dobu jedné hodiny. Gel byl zdokumentován na systému LI-COR.

3.4.6.4 Příprava vzorků na sekvenaci DNA

Pokud byly PCR produkty vybrány pro sekvenaci, tak 5 µl DNA bylo přeneseno do nového stripu s mikrozukmavkami a smícháno s 2 µl exonukleasy (ExoCleanUp FAST od VWR), čímž došlo k odbourání nevyužitých nukleotidů a primerů. Stripy byly po přidání exonukleasy zvortexovány a následně centrifugovány. Inkubace probíhala 2 - 5 minut při 37 °C. Pak byl enzym inaktivován zahřátím 3-10 minut na 80 °C. Poté byla změřena na Nanodropu koncentrace a čistota DNA (absorbance 260/280 a 260/230). DNA byla zředěna na finální koncentraci 40 ng/µl vodou bez nukleas. Do nových stripů bylo přeneseno 5 µl zředěné DNA a k ní bylo přidáno 2,5 µl vody bez nukleas a 2,5 µl sekvenačního primeru o koncentraci 10 µM. Vlastní sekvenování (Sangerovo sekvenování) provedla firma Seqme.

3.4.7 Optimalizace PCR pro primer ITS2

Protože primery pro barkódování pomocí sekvence ITS2 (Massa a kol., 2021) neposkytovaly specifický produkt při teplotě dle literatury, optimalizovala jsem PCR program s využitím gradientu teploty pro hybridizační krok. Primer ITS2 byl složen z přímého primeru ITS3F se sekvencí 5'-GCATCGATGAAGAACGCAG-3' a opačného primeru ITS4R se sekvencí 5'-AGTTTYTTTTCTCCGCTTA-3'.

Do PCR stripů bylo přidáno 10 µl SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 2 µl primeru ITS o koncentraci 1 µM, 2 µl standardizované DNA *Hys. exemplaris* a objem byl doplněn na 20 µl vodou bez nukleas. Následně byly stripy vloženy do termocycleru a byla provedena PCR. Reakce trvala po dobu 40 cyklů, přehled teplot a dob trvání jednotlivých fází je uveden v tabulce 3. Ve fázi hybridizace byl vytvořen teplotní gradient od 47,5 °C do 57,5 °C.

Tabulka 3. Podmínky PCR.

Úvodní denaturace	Denaturace	Hybridizace	Elongace	Finální elongace	Uchování
95 °C	94 °C	47,5-57,5 °C	72 °C	72 °C	4 °C
180 sek.	30 sek.	120 sek.	60 sek.	360 sek	-
1x		39x		1x	-

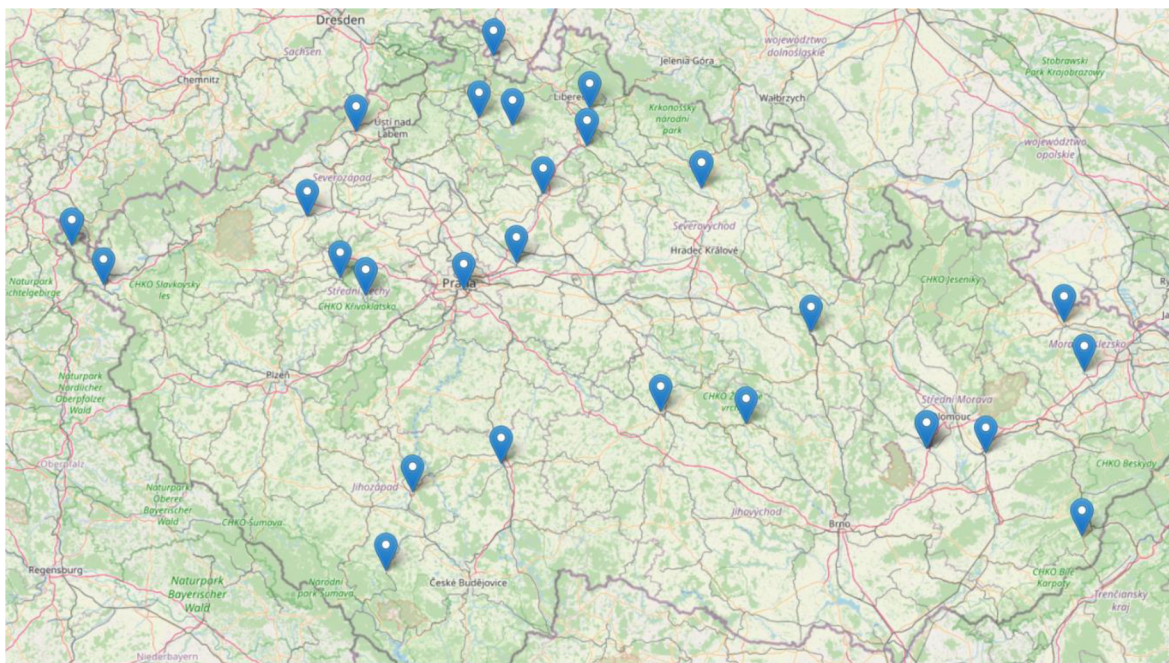
4 Výsledky

4.1 Sběr mechu, izolace

Mech získaný mnou pocházel z Pardubic a Olomouce (N = 31) a byl izolován pomocí Baermannových nálevek. Dalších 203 vzorků pocházelo z oblastí, ve kterých sídlí 27 středních škol, jejichž žáci se zapojili do sběru mechu (obr. 7), a byly izolovány pomocí inzertů se sítky v 6jamkových panelech.

Želvušky byly pozorovány ve všech mnou nasbíraných vzorcích a v 136 (67 %) vzorcích ze středních škol. Distribuci počtu jedinců na vzorek u druhé skupiny vzorků ukazuje tabulka 4.

Vždy se želvušky vyskytovaly s hlísty a velice často i s vířníky. Dále jsem pozorovala různé druhy prvoků včetně krytenek, buchanky a roztoče. Vzhledem k náročnosti určování jsem předběžně izoláty řadila do rodů *Echiniscus*, *Milnesium*, *Hybsibius* a *Ramazzotius*. Dominovaly želvušky patřící do čeledi Macrobiotidae.



Obrázek 7. Mapa ukazující, ve kterých městech se zapojily školy do sběru vzorků.

Tabulka 4. Frekvence výskytu želvušek v mechu.

Počet želvušek na vzorek	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10+	20+
Počet vzorků	67	52	16	16	5	14	2	4	1	17	9
Procento vzorků [%]	33,0	25,6	7,9	7,9	2,5	6,9	1,0	2,0	0,5	8,4	4,4

Pro další studium, tj. pokus o kultivaci, genotypování a fenotypovou charakterizaci bylo vybráno deset vzorků s hojnými počty želvušek předběžně řazeným k Macrobiotidae. Důvodem bylo to, že tyto želvušky jsou často sto dlouhodobě přežívat v minerální vodě Volvic a některé se v těchto podmínkách i množí. Pro tyto vzorky byla provedena izolace z většího objemu mechu pomocí Baermannovy nálevky. Přehled těchto vzorků je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Izoláty vybrané pro bližší studium

Vzorek	Město	Datum sběru	GPS souřadnice	Datum izolace	Velikost populace
GY257	Česká Lípa	29.10.2023	50,42121 °S, 14,32906 °V	6.2.2024	100+
GY258	Česká Lípa	29.10.2023	50,42164 °S, 14,32946 °V	6.2.2024	10+
GY313	Turnov	10.08.2023	50,70359 °S, 14,96659 °V	6.2.2024	100+
GY316	Turnov	10.08.2023	50,30385 °S, 15,14270 °V	6.2.2024	30+
GY385	Nové Město na Moravě	20.10. 2023	49,559411 °S, 16,18068 °V	6.2.2024	100+
GY451	Mladá Boleslav	7.11.2023	50,26234 °S, 14,55525 °V	6.2.2024	70+
GY617	Rakovník	12.11.2023	50,02372 °S, 13,86333 °V	21.2.2024	4
GY618	Rakovník	12.11.2023	50,02095 °S, 13,86102 °V	21.2.2024	8
VH28F	Pardubice	26.11.2023	50,04068 °S, 15,81590 °V	6.2.2024	80+
VH28S	Pardubice	3.3.3024	50,04068 °S, 15,81590 °V	7.3.2024	10+

4.2. Kultivace

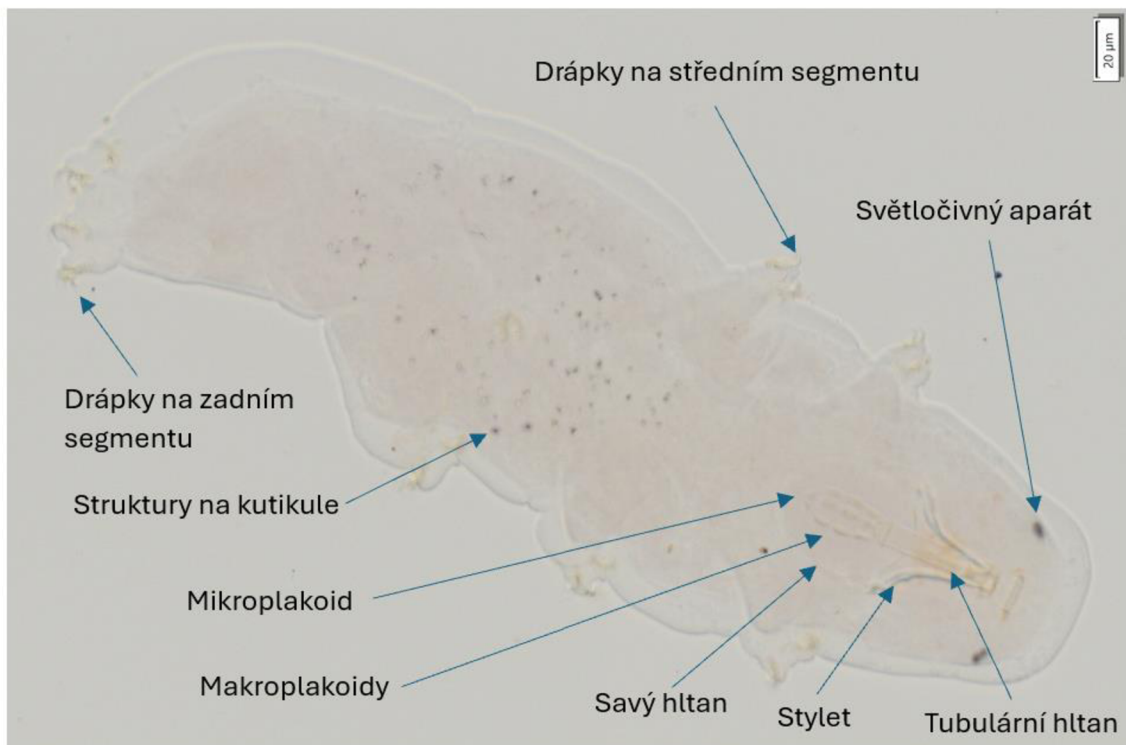
Po třech měsících přežívají izoláty GY257, GY316 (pouze ale dva jedinci), GY385, GY451, VH28F a VH28S (po dvou měsících). V izolátu GY313 bylo mnoho želvušek, všechny však byly ve stavu anoxybiózy. Na obrázku 8 je vyfocena želvuška z izolátu VH28F pojídající potravu.



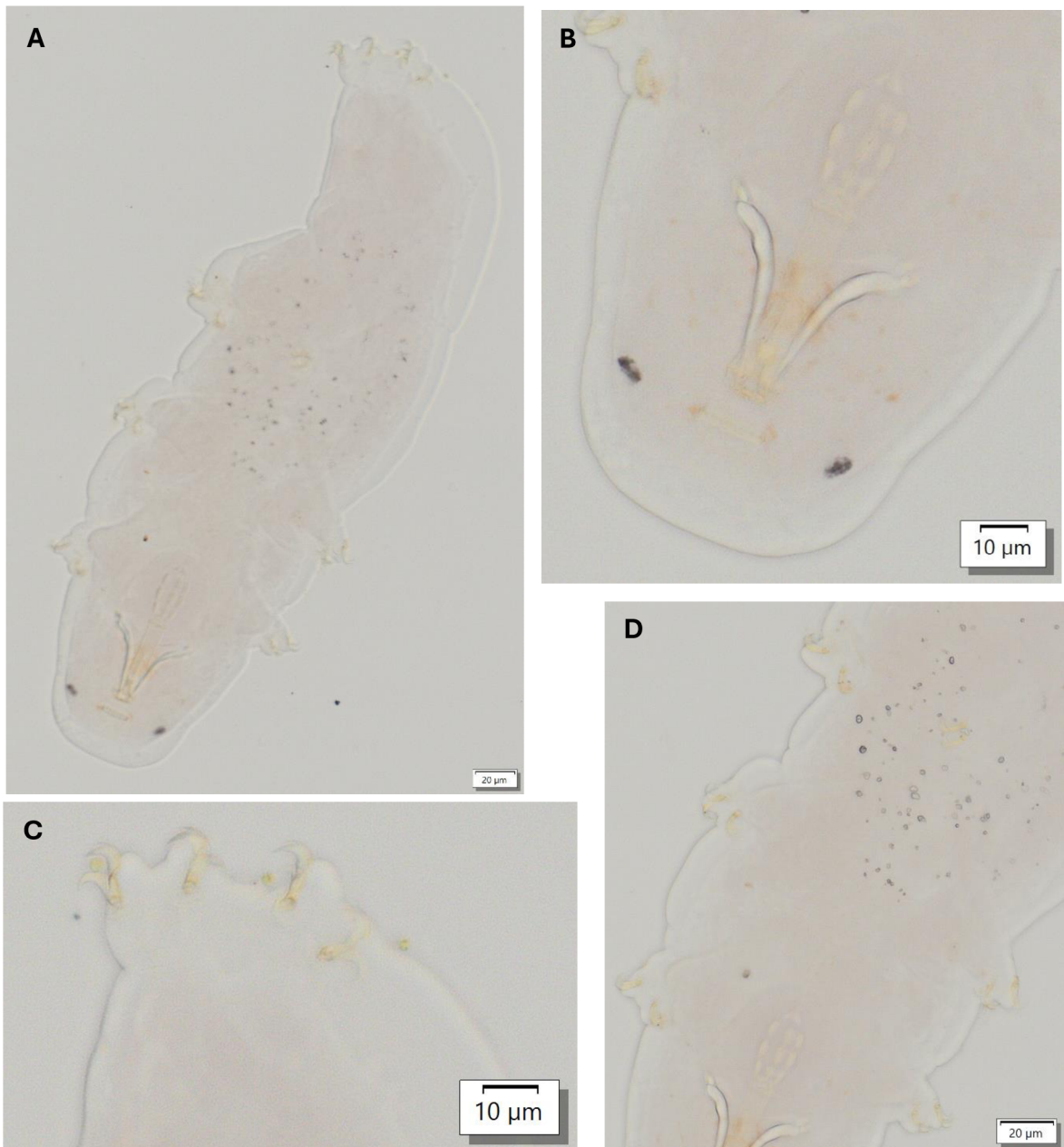
Obrázek 8. Želvušky z izolátu VH28F: A – krmicí se krytenkou (zvětšení 400x), B – krmicí se hlístic (zvětšení 200x).

4.3 Světelná mikroskopie – trvalé preparáty

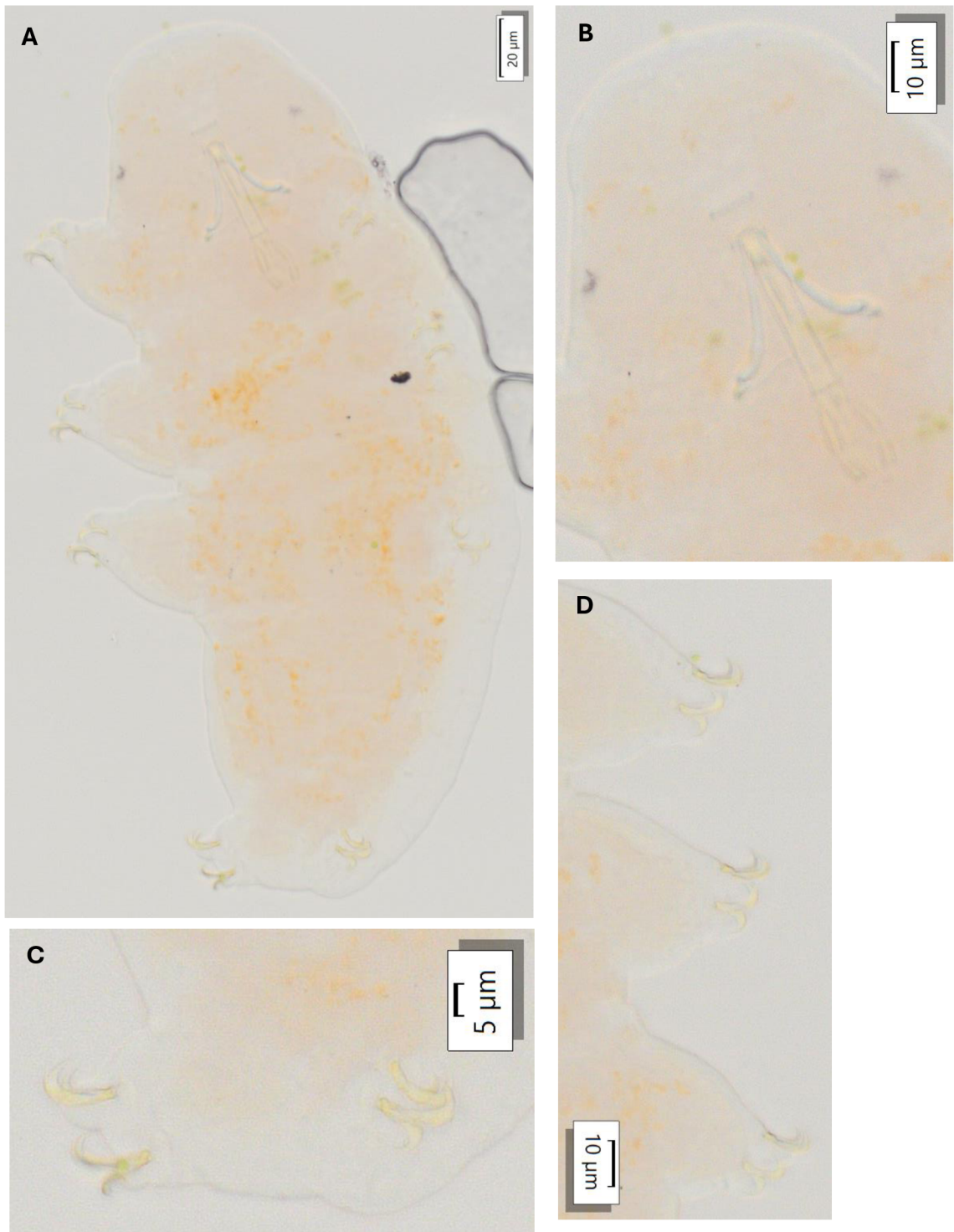
Z každého z deseti izolátů želvušek byly připraveny trvalé preparáty a jedinci byli zdokumentováni na VS200 Research Slide Scanner. Snímky byly pořízeny na několika rovinách ostrosti (obr. 10-19 ukazují vybranou želvušku). Mezi znaky využívané k identifikaci taxonů patří hlavně sklerotizované struktury, jako jsou drápky a bukální aparát. Důležitý je tvar a vzájemná poloha drápků, u bukálního aparátu tvar hltanu, přítomnost a počet makroplakoidů a mikroplakoidu. Dále se pohlíží barvu, tvar, velikost želvušky, přítomnost očních skvrn nebo na pórovitost kutikuly. Některé z těchto prvků byly u želvušek vyhodnoceny (tab. 6) a porovnávány s popisem známých druhů (diagnostickým klíčem). Na obrázku 9 jsou popsány nejdůležitější struktury používané v taxonomii.



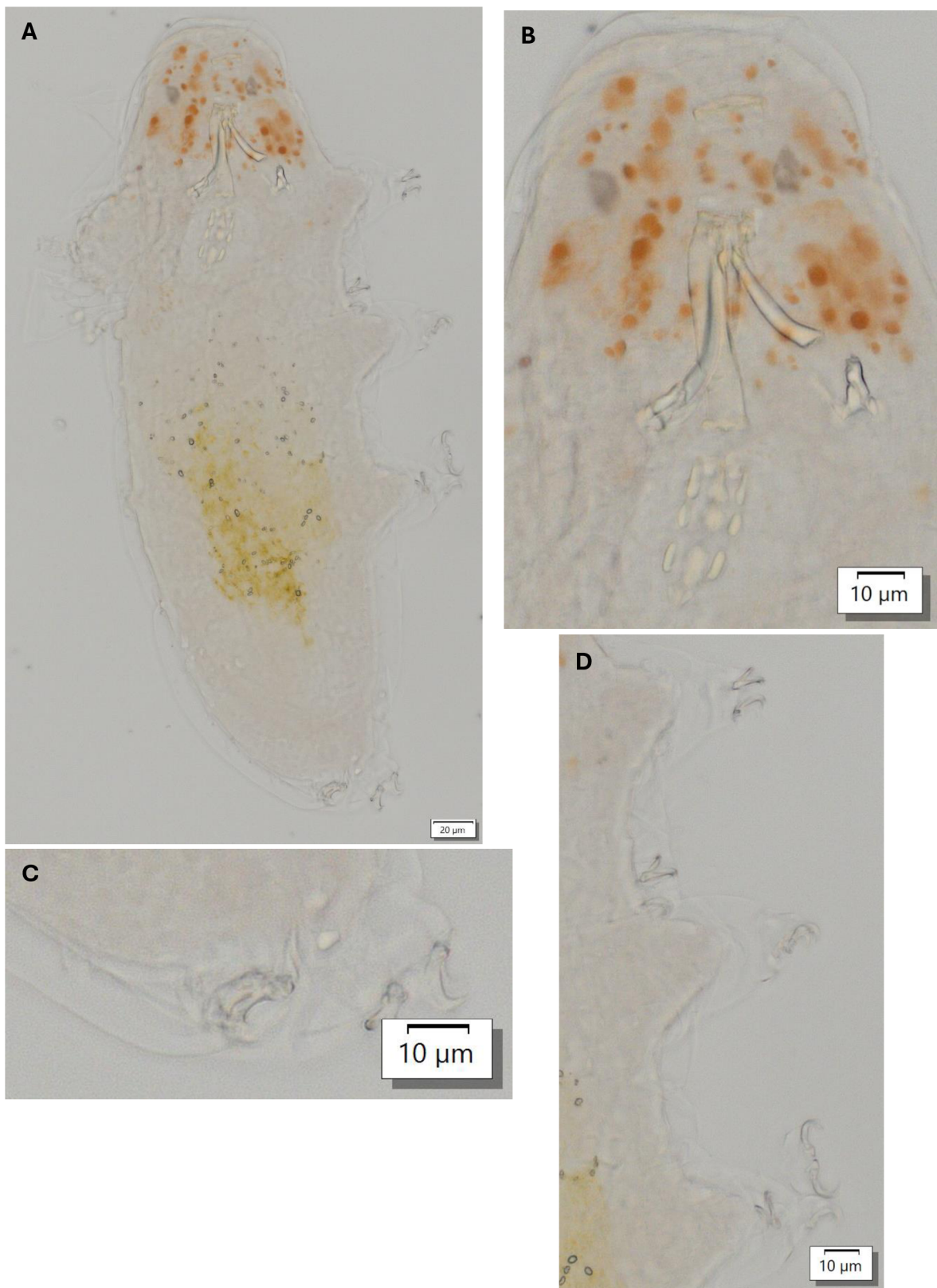
Obrázek 9. Struktury u želvušky (zvětšení 400x). Tubulární hltan, stylet a savý hltan s makroplakoidy a mikroplakoidy tvoří bukální aparát želvušky.



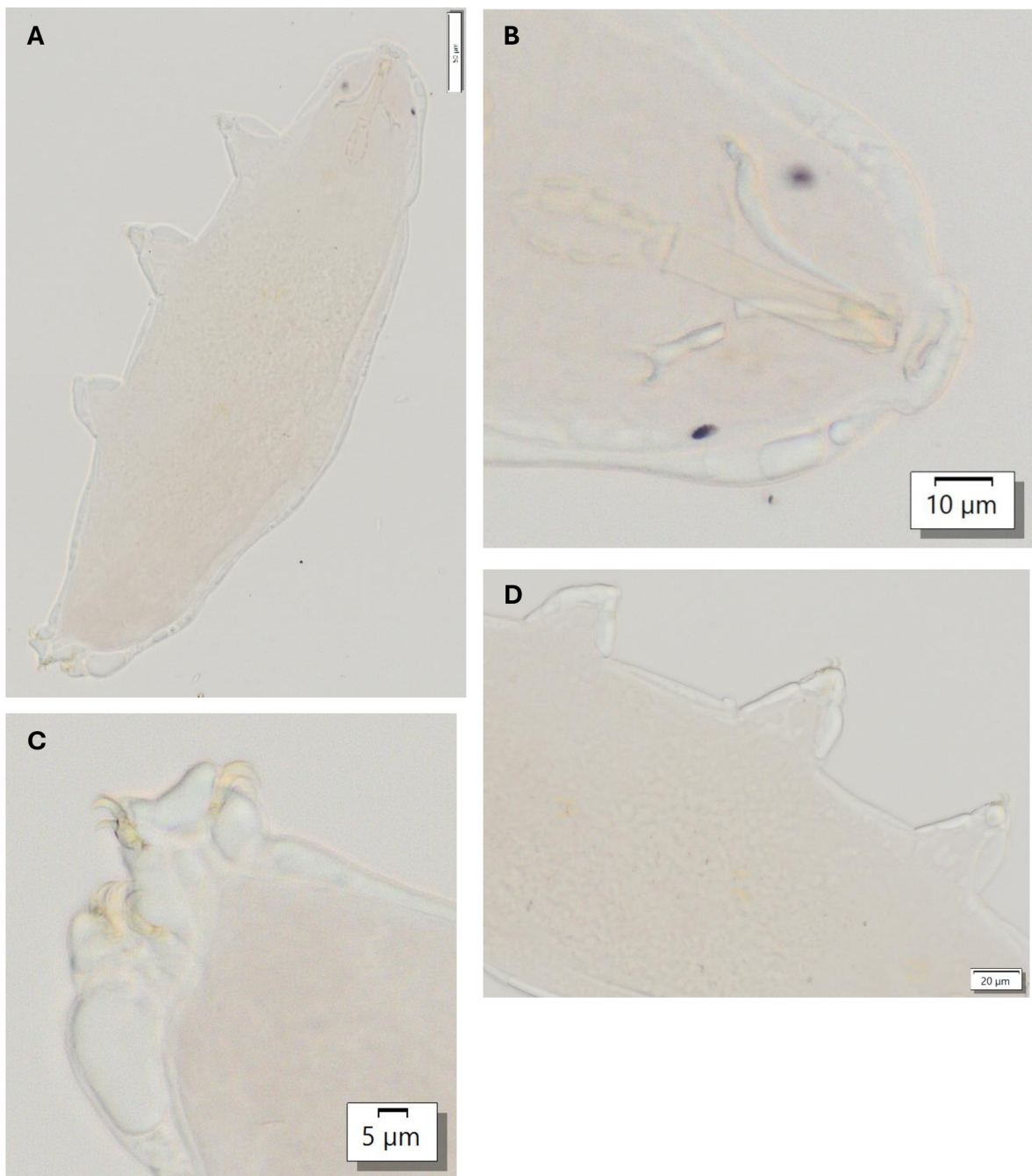
Obrázek 10. Želvuška z izolátu GY257 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



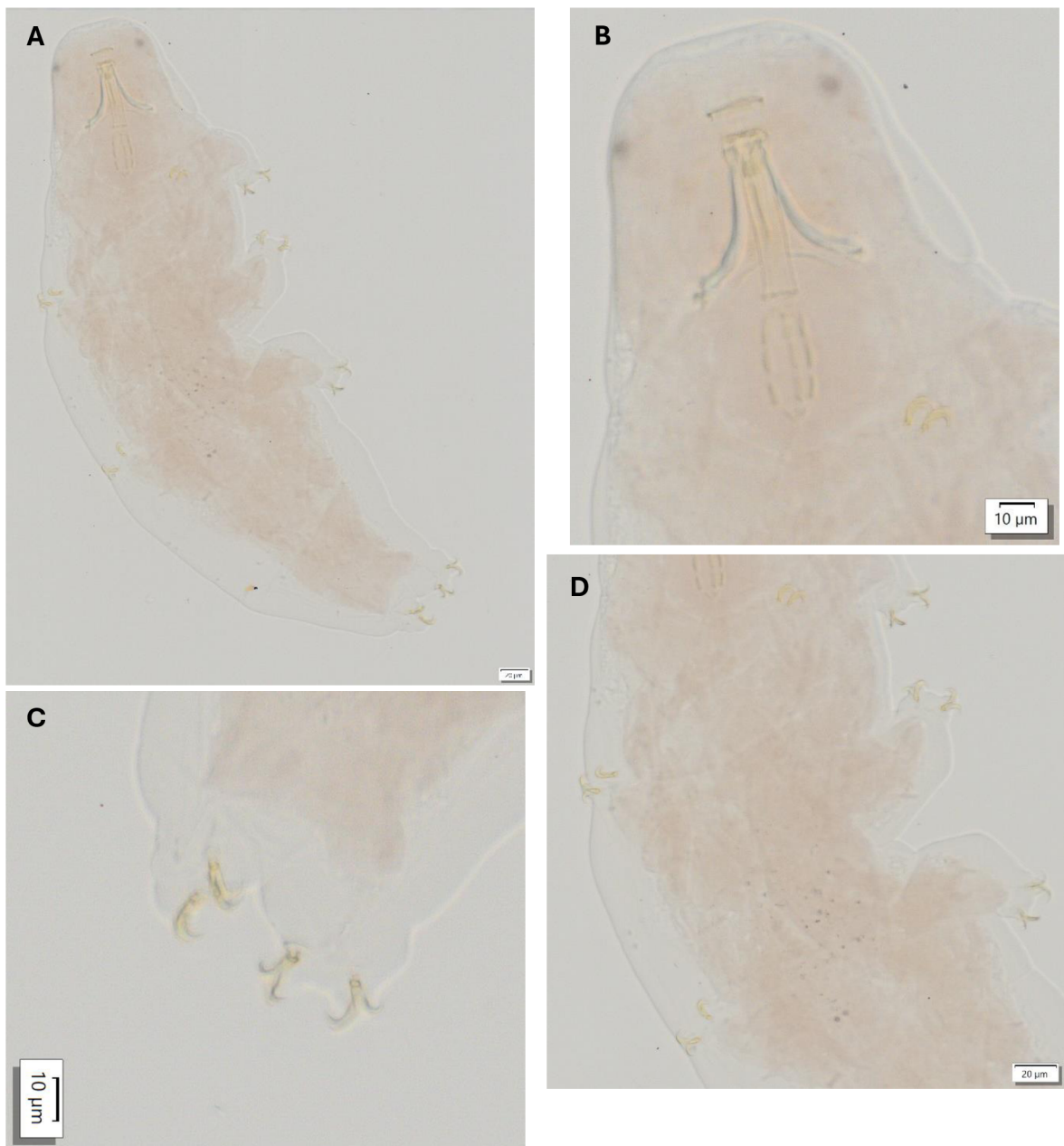
Obrázek 11. Želvuška z izolátu GY258 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



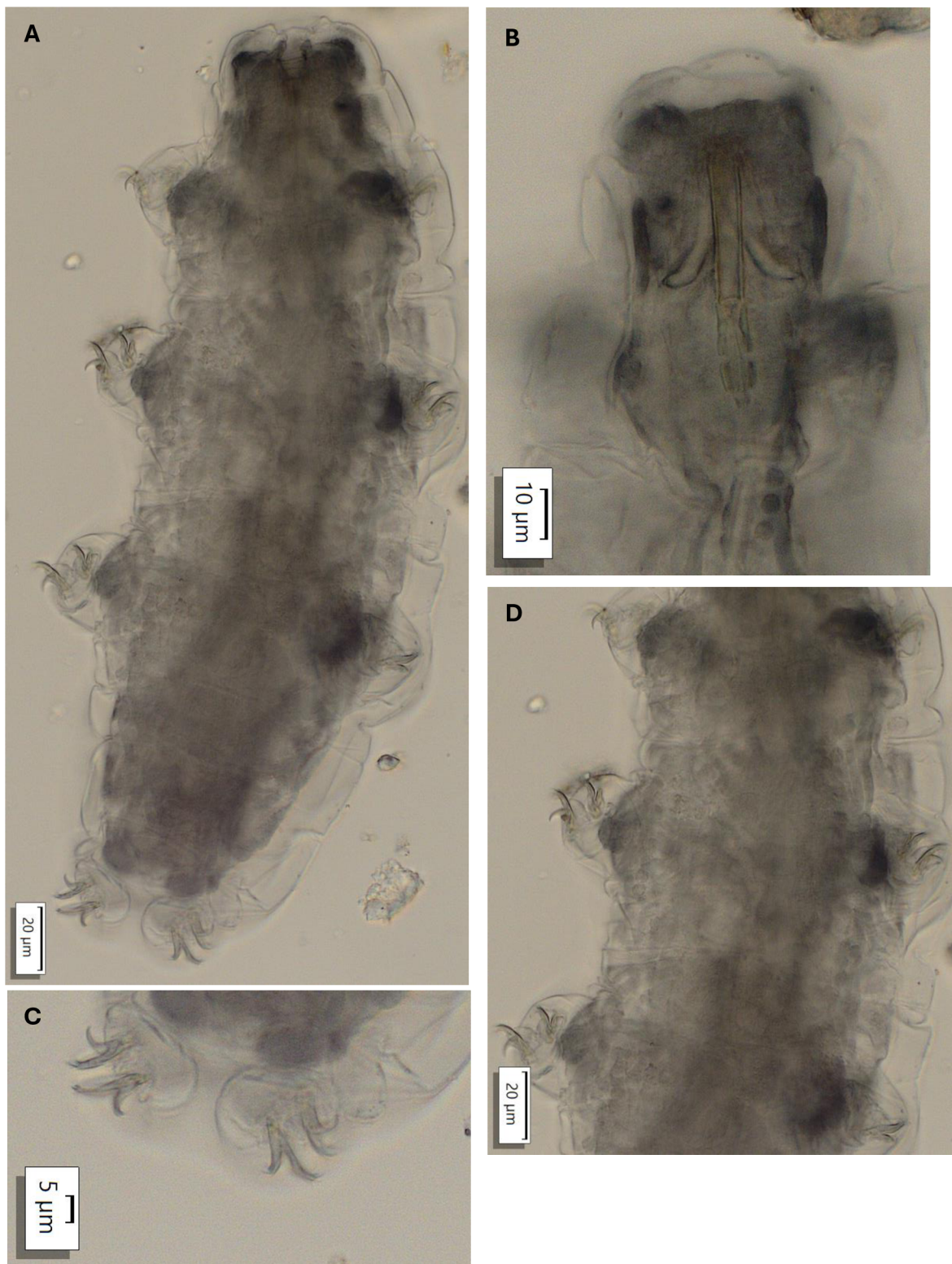
Obrázek 12. Želvuška z izolátu GY313 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



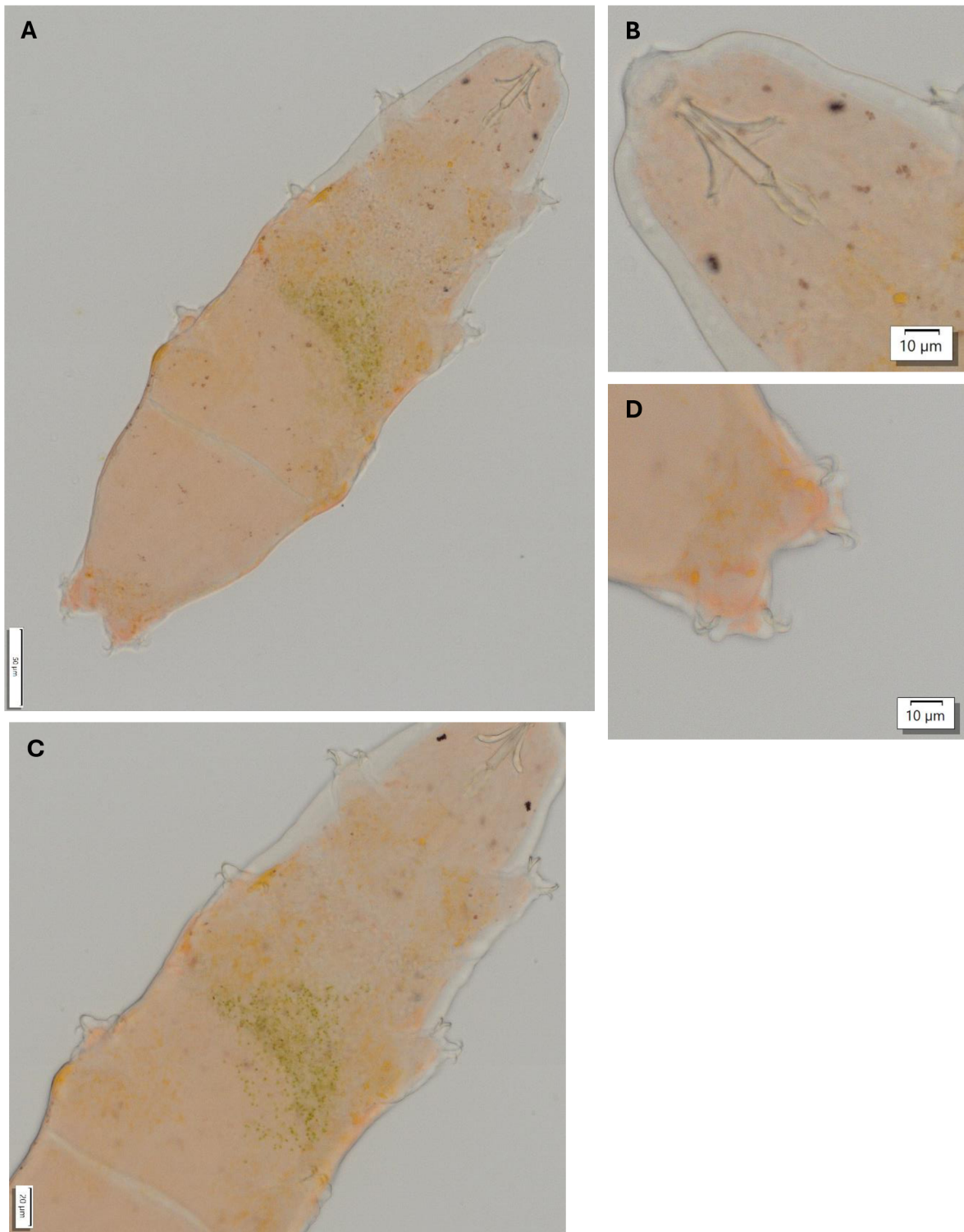
Obrázek 13. Želvuška z izolátu GY316 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



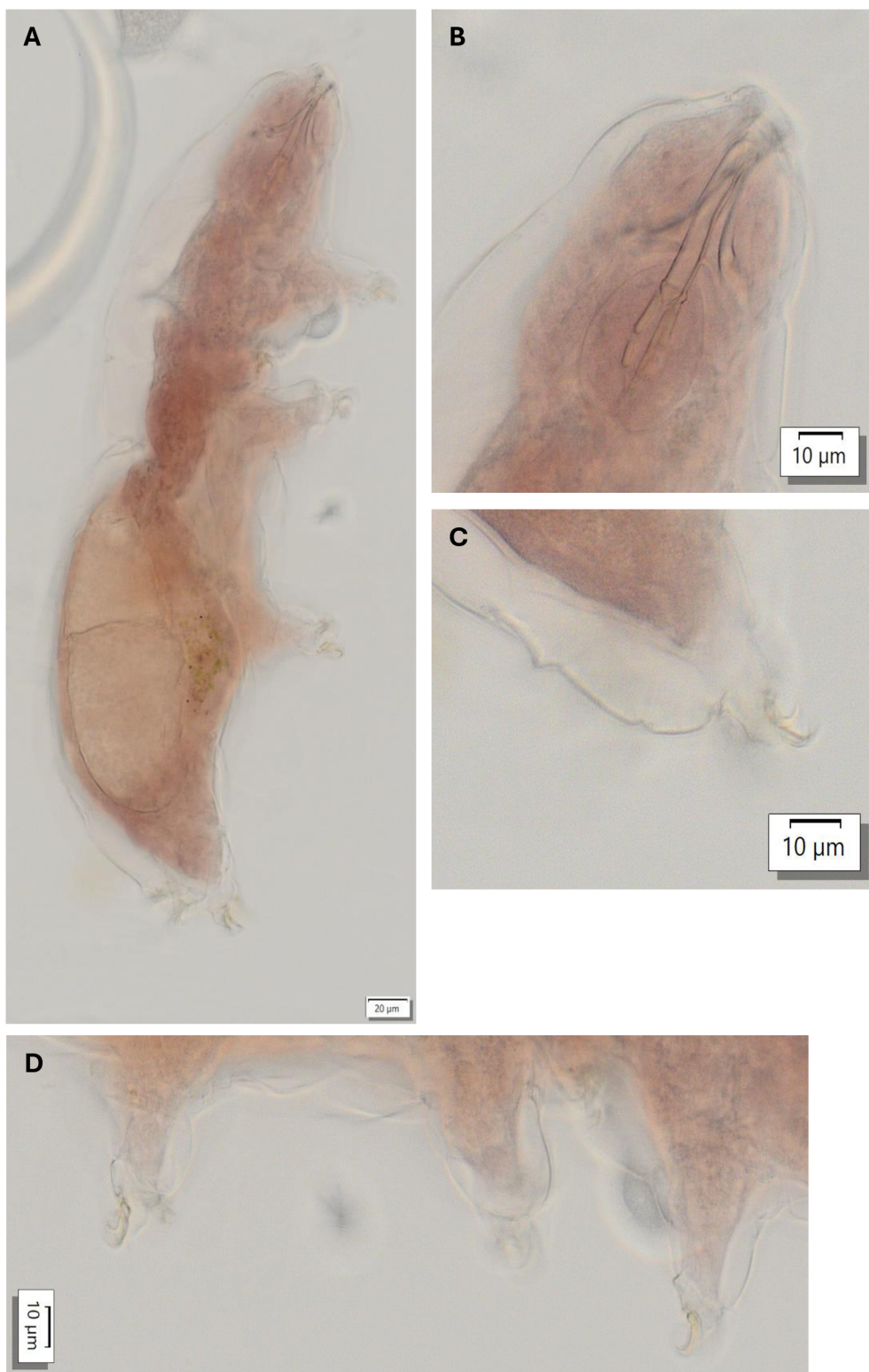
Obrázek 14. Želvuška z izolátu GY385 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



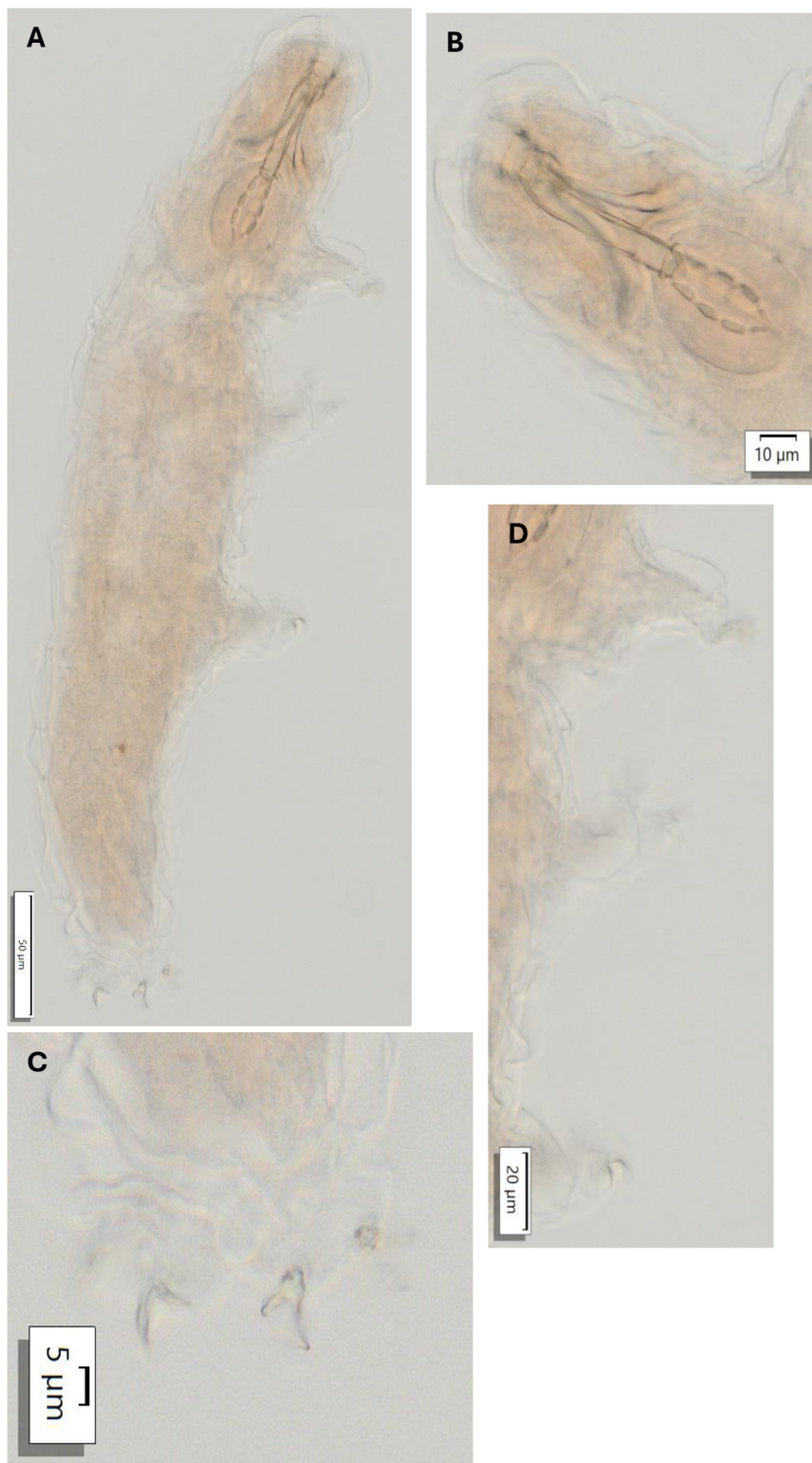
Obrázek 15. Želvuška z izolátu GY451 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



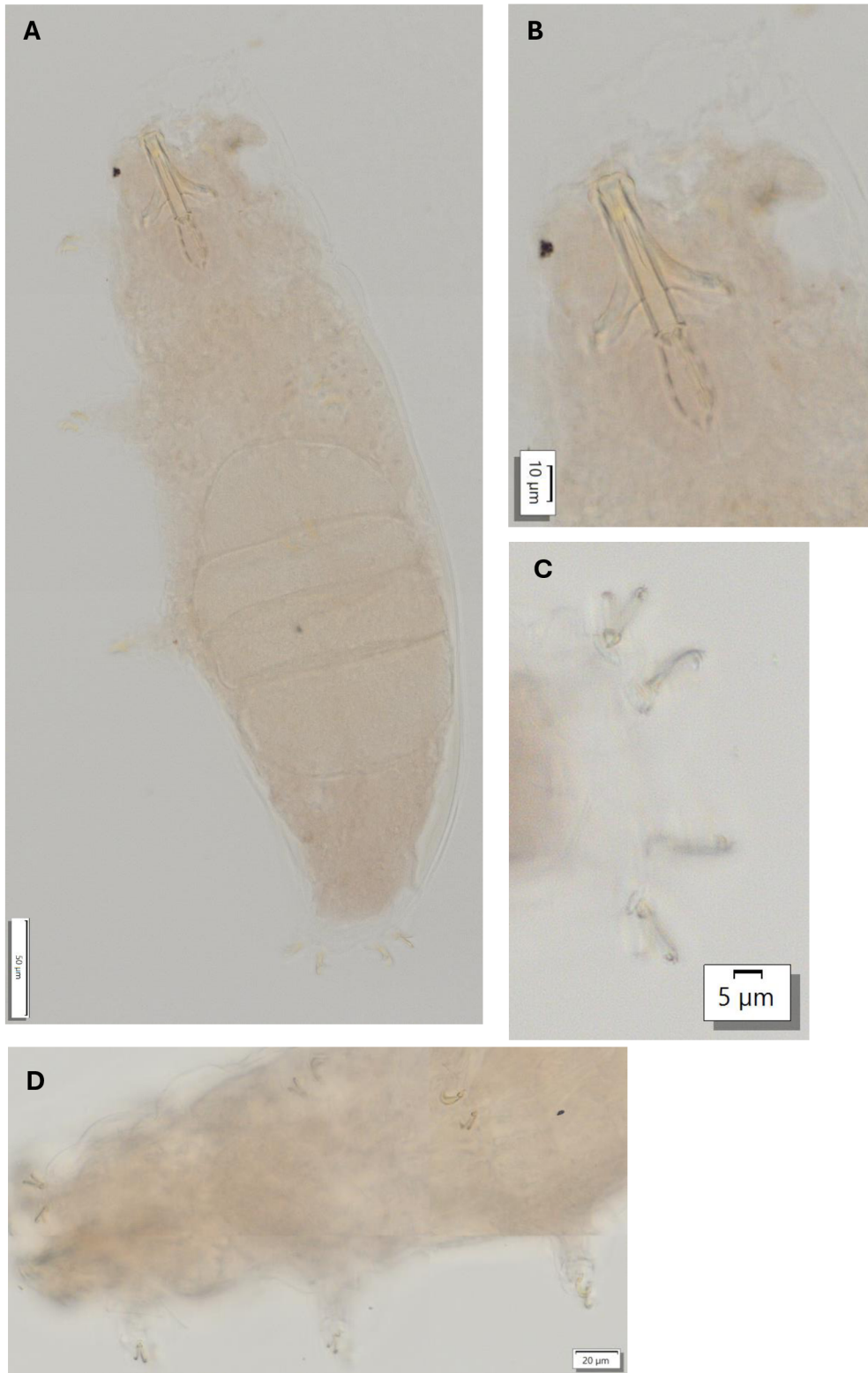
Obrázek 16. Želvuška z izolátu GY617 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



Obrázek 17. Želvuška z izolátu GY618 (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



Obrázek 18. Želvuška z izolátu VH28F (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.



Obrázek 19. Želvuška z izolátu VH28S (zvětšení 400x): A – celkový pohled na želvušku, B – bukální aparát, C – drápky na končetinách na posledním segmentu, D – drápky na končetinách na středním segmentu.

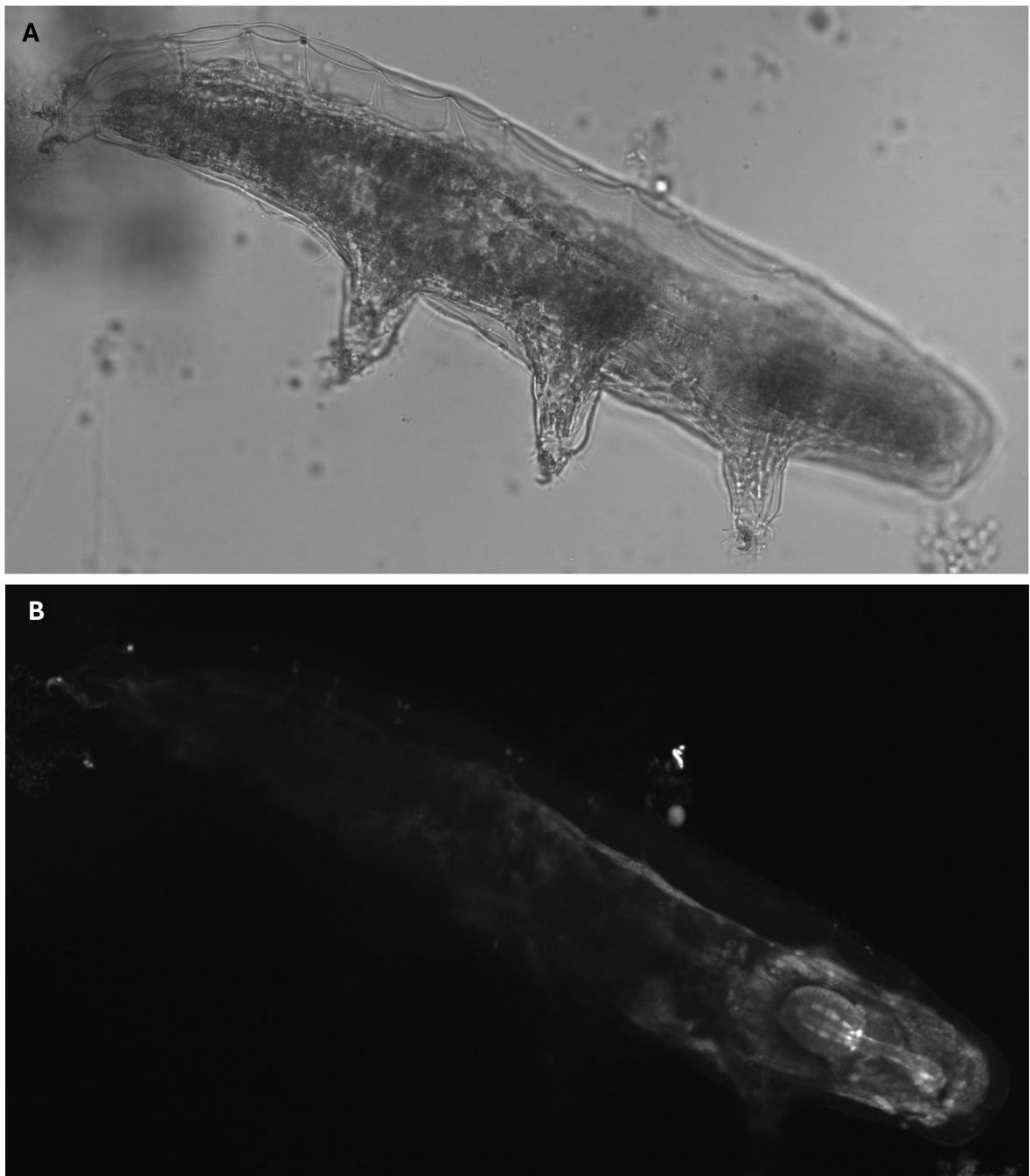
Tabulka 6. Morfologické znaky želvušek. Rod je odhadnut na základě konfigurace třetího makroplakoidu a mikroplakoidu.

Izolát	Velikost [µm]	Barva	Povrch kutikuly	Přítomnost očí	Umístění očí	Počet makroplakoidů + mikroplakoidu	Vzdálenost mikroplakoidu od makroplakoidu	Drápky	Odhadovaný rod
GY257	383	Světle růžová	Póry	+	Za BA	3+1	Malá	Dvojitě typu Y	<i>Mesobiotus</i>
GY258	298	Světle oranžová	Póry	+	Před BA	2+?	-	Dvojitě typu Y	<i>Macrobiotus</i>
GY313	397	Světle béžová	Póry	+	Před BA	3+1	Malá	Dvojitě typu Y	<i>Mesobiotus</i>
GY316	453	Světle béžová	Hladký	+	Za BA	3+1	Malá	Dvojitě typu Y	<i>Mesobiotus</i>
GY385	480	Světle oranžová	Póry	+	Před BA	3+1	Malá	Dvojitě typu Y	<i>Mesobiotus</i>
GY451	384	Černá	Hladký	+	Za BA	2+1	Veliká	Dvojitě typu Y	<i>Macrobiotus</i>
GY617	478	Světle oranžová	Hladký	+	Za BA	2+?	-	Dvojitě typu Y	<i>Macrobiotus</i>
GY618	385	Tmavě růžová, pruhovaná	Hladký	-	-	2+0	-	Dvojitě	<i>Ramazzottius</i>
VH28F	419	Světle oranžová	Hladký	+	Za BA	3+1	Malá	Dvojitě typu Y	<i>Mesobiotus</i>
VH28S	445	Světle oranžová	Hladký	+	Za BA	3+1	Malá	Dvojitě typu Y	<i>Mesobiotus</i>

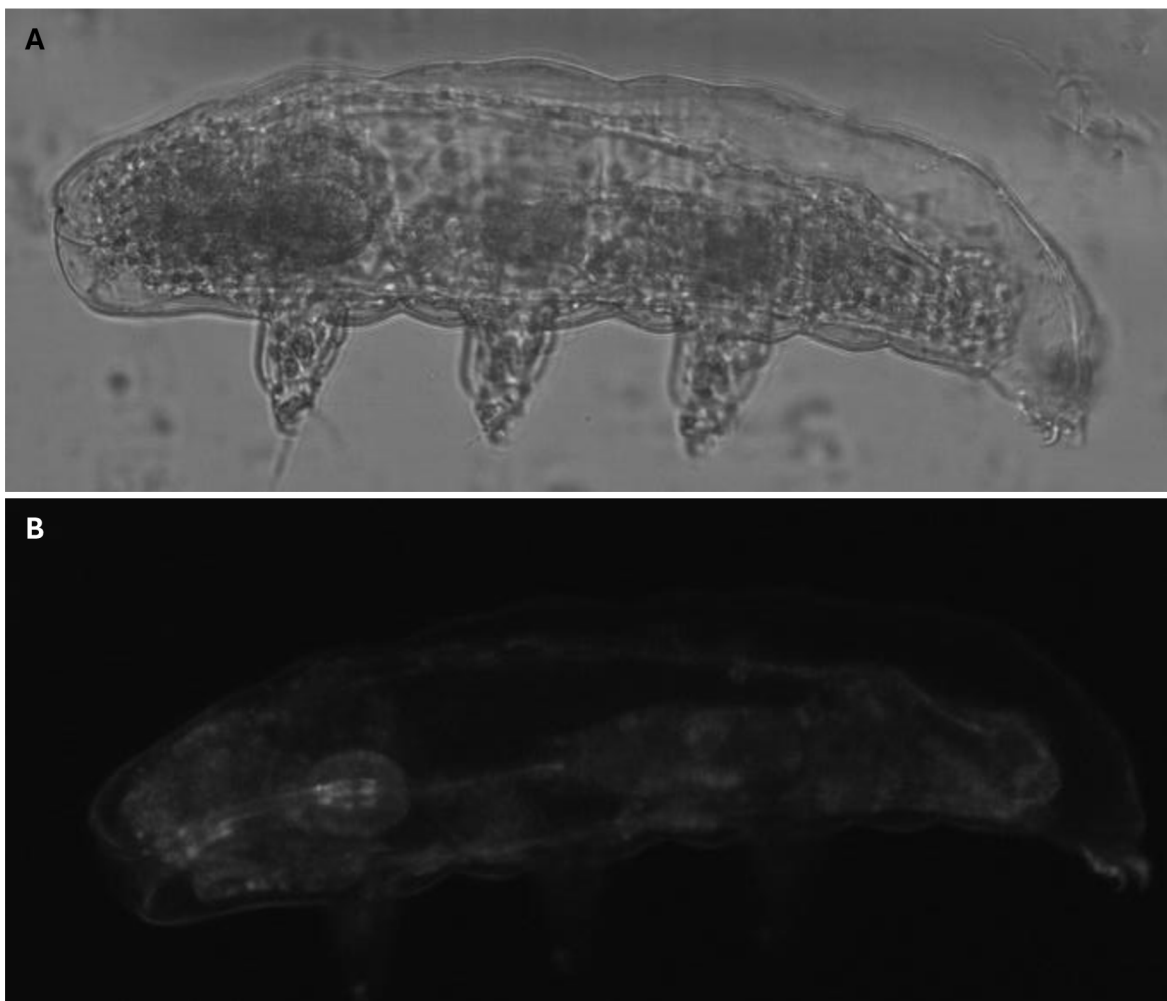
Pozn. BA= bukální aparát, ?= nejasná přítomnost mikroplakoidu.

4.4 Fluorescenční mikroskopie

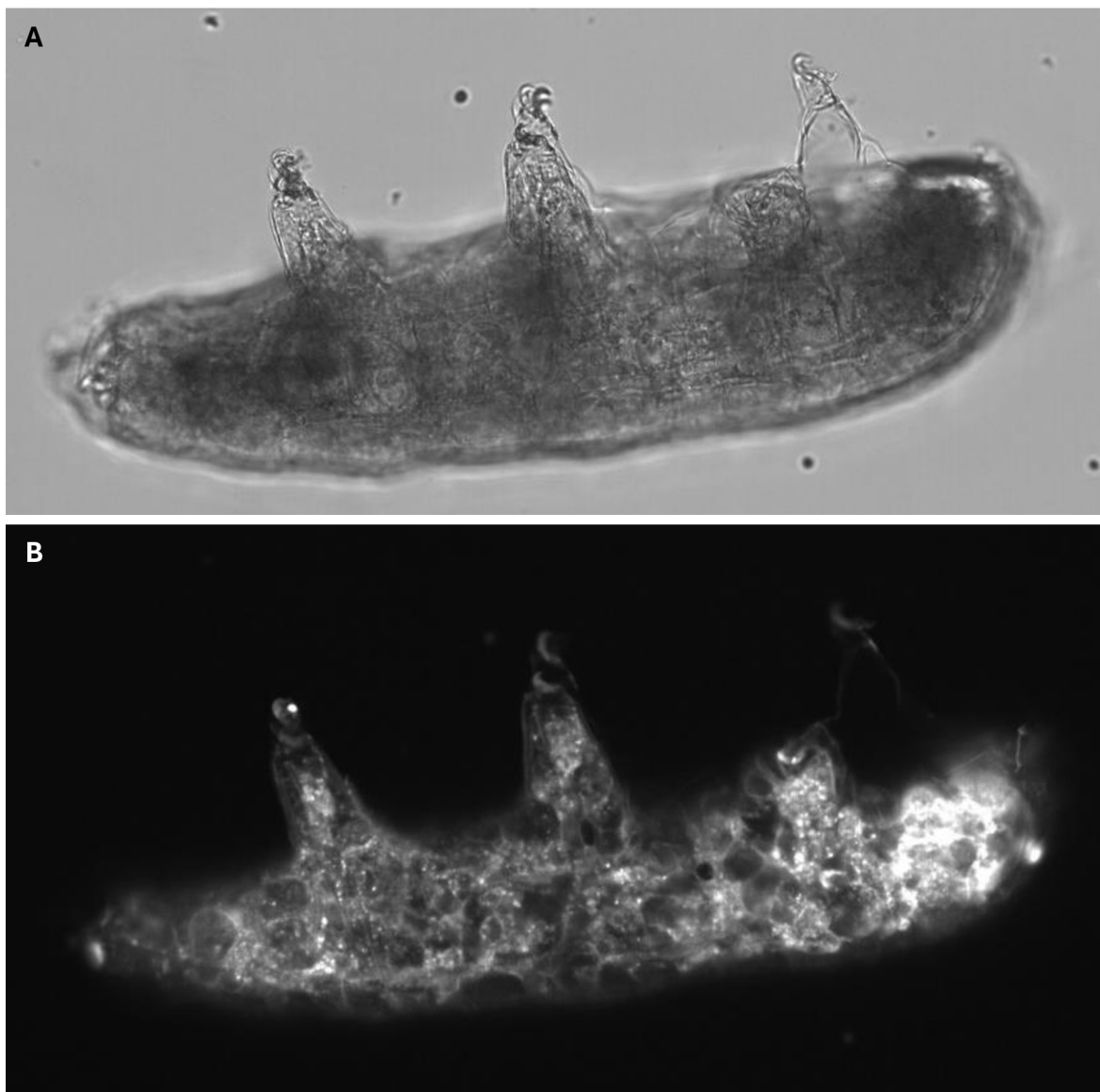
Z každého z deseti izolátů byly vybráni jedinci, kteří byli v 384jamkových deskách zdokumentováni na automatickém mikroskopu CV7000 (Yokogawa) při zvětšení 400x (obr. 20-29). Snímkování bylo provedeno na různých rovinách ostrosti („z-stack“) a to jak pro viditelné světlo, tak pro autofluorescenci na zeleném a červeném kanále indukovanou UV zářením. Délka expozice byla jedna sekunda. U některých jedinců tato technika umožnila pozorovat bukální aparát a drápky, struktury s taxonomickým významem. Níže jsou ukázány vybrané fotografie vždy pro jednu hloubku ostrosti. U izolátu VH28S, ve kterém docházelo k množení, je ukázáno i vajíčko (obr. 30).



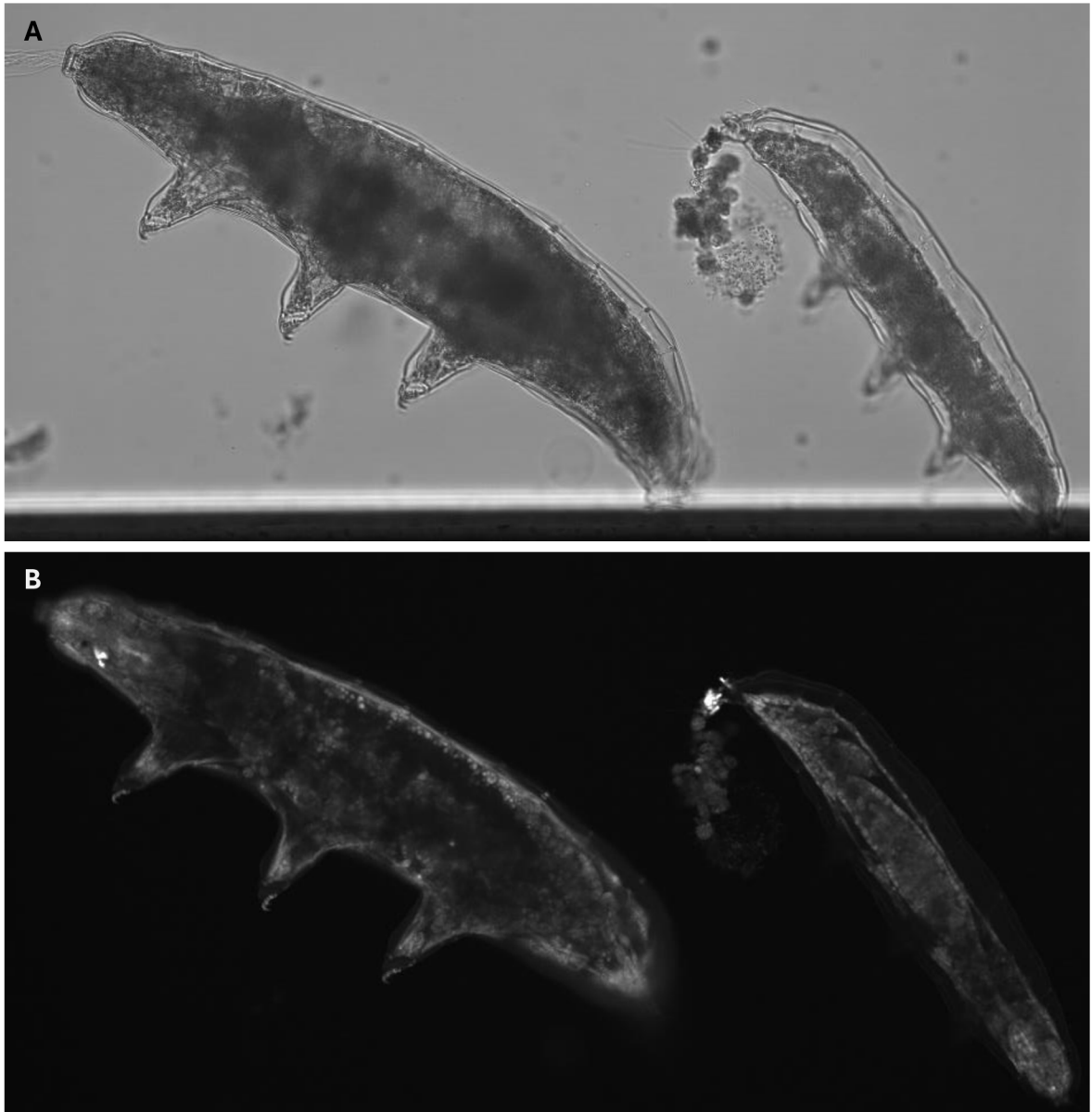
Obrázek 20. Želvuška z izolátu GY257 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



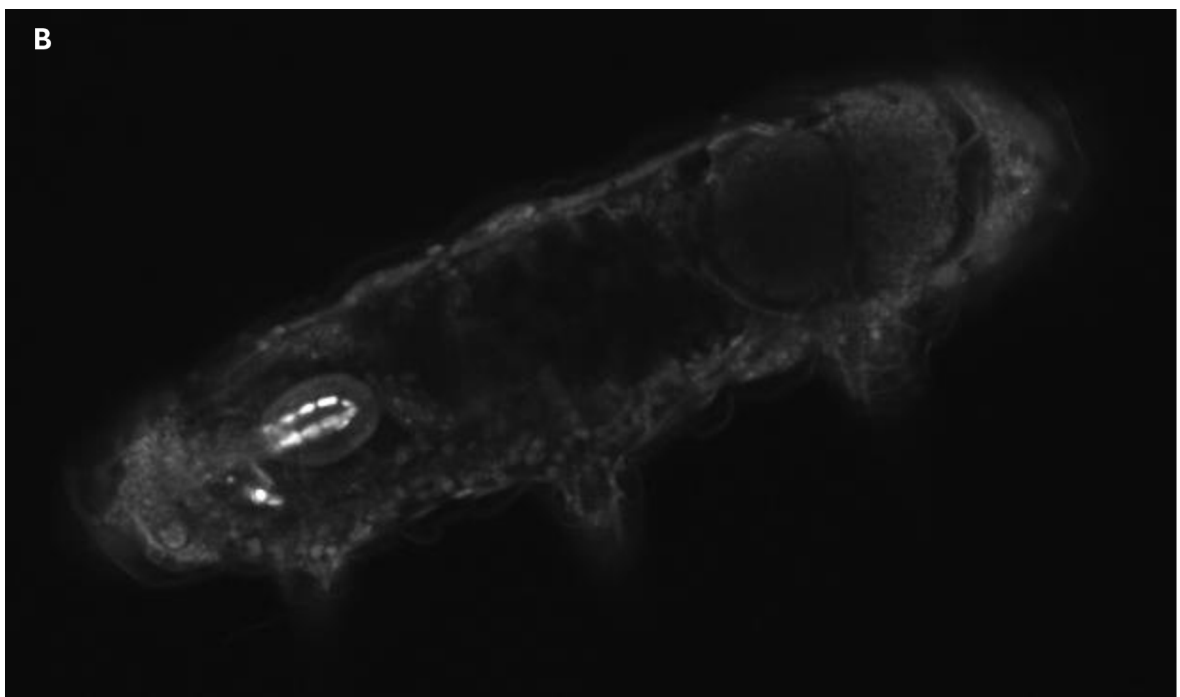
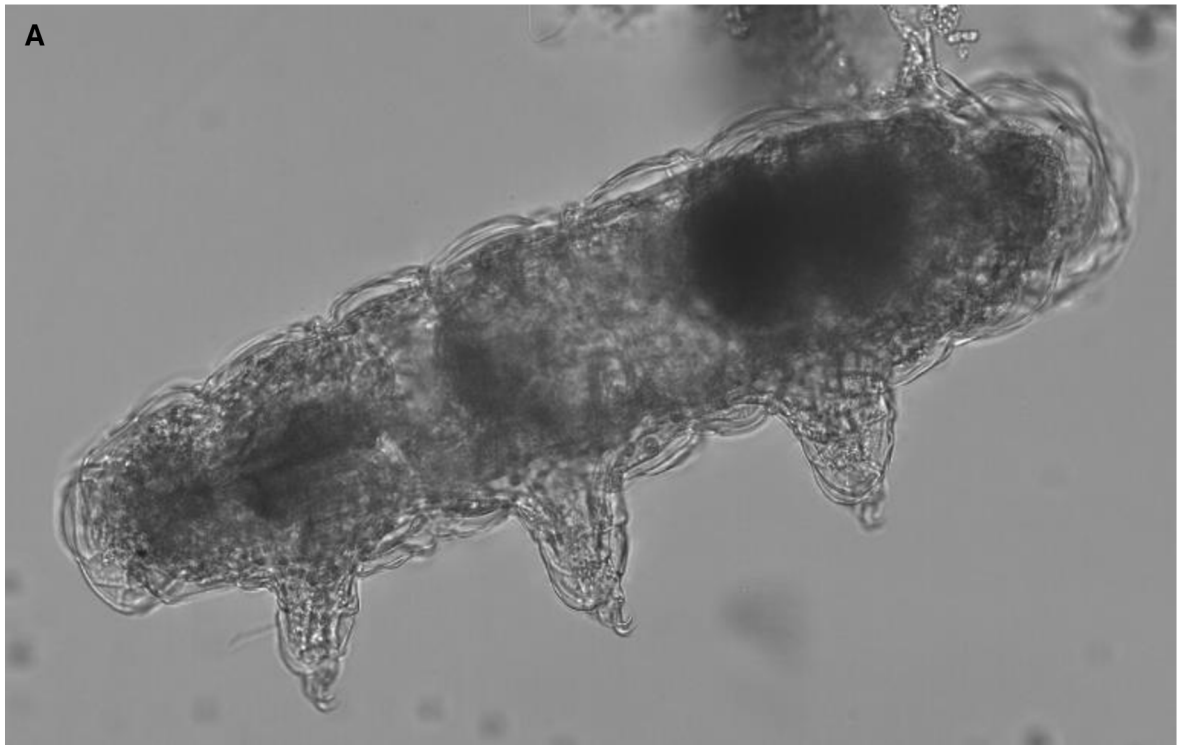
Obrázek 21. Želvuška z izolátu GY258 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



Obrázek 22. Želvuška z izolátu GY313 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



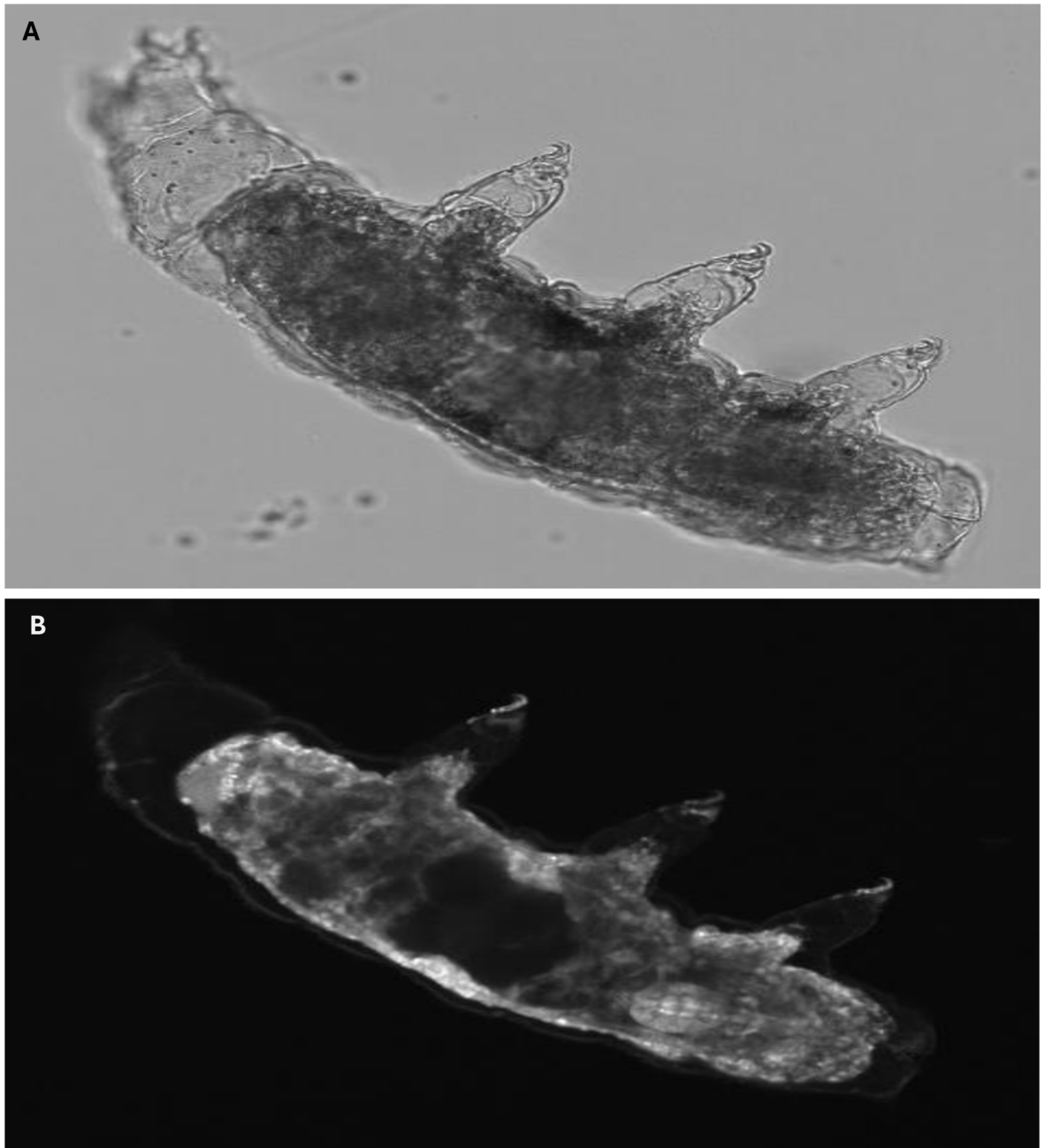
Obrázek 23. Želvuška z izolátu GY316 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



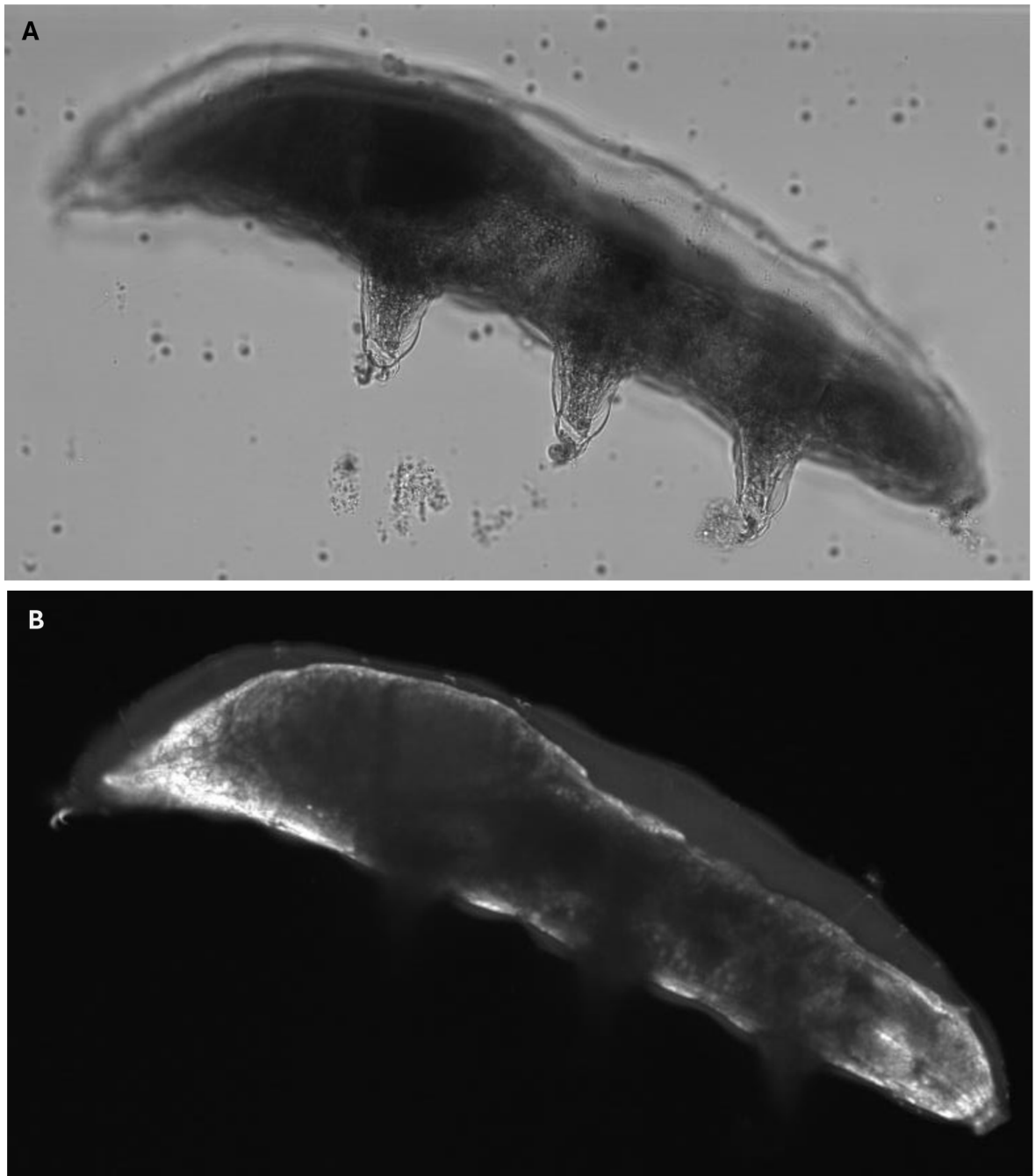
Obrázek 24. Želvuška z izolátu GY385 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



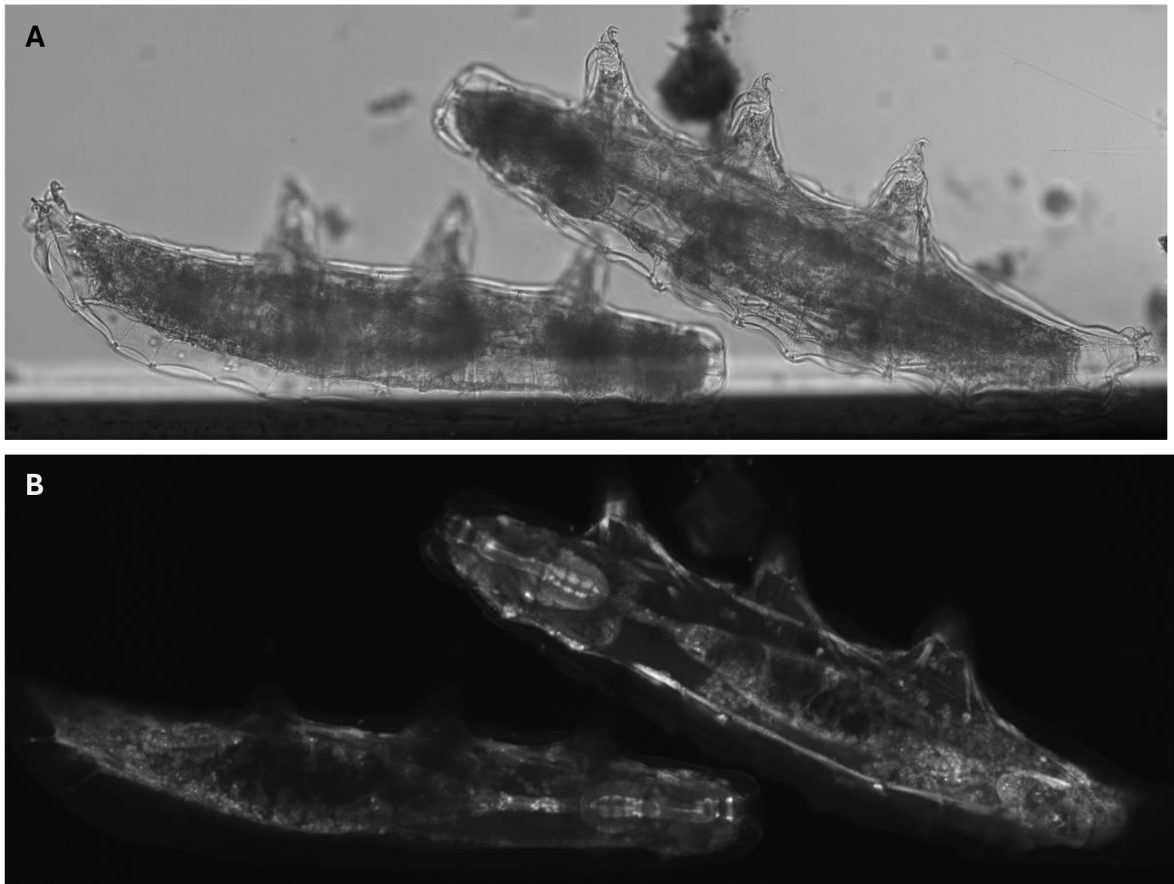
Obrázek 25. Želvuška z izolátu GY451 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



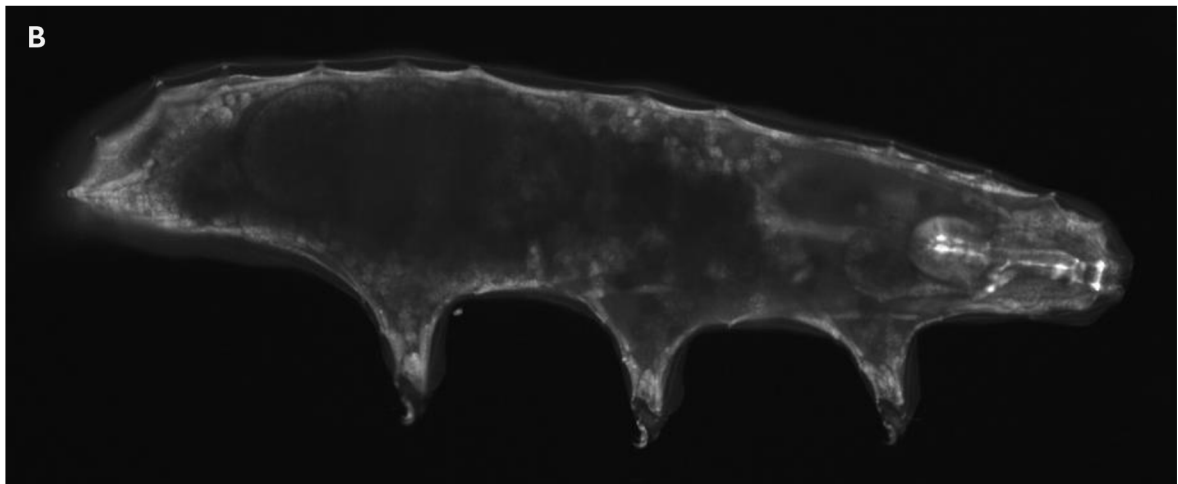
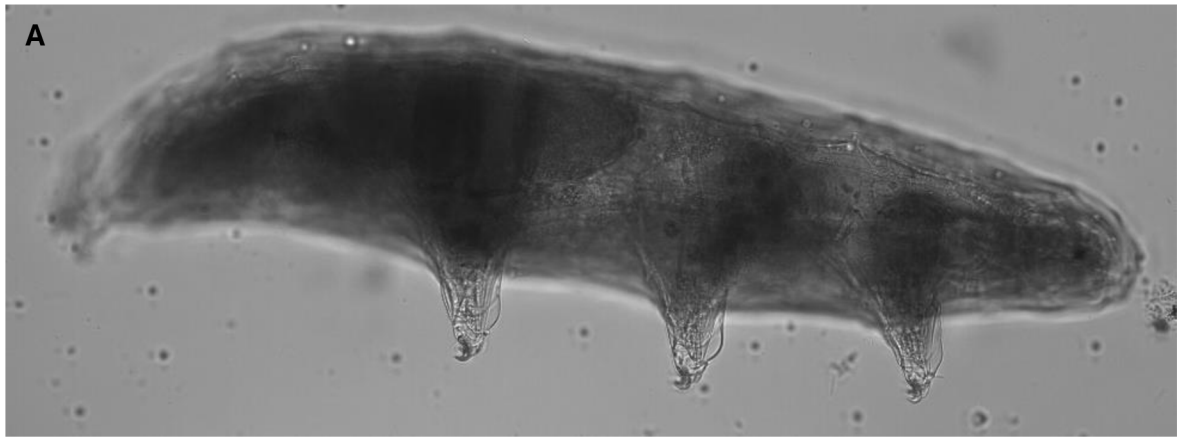
Obrázek 26. Želvuška z izolátu GY617 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



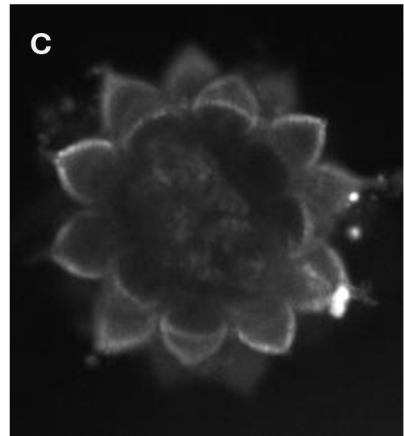
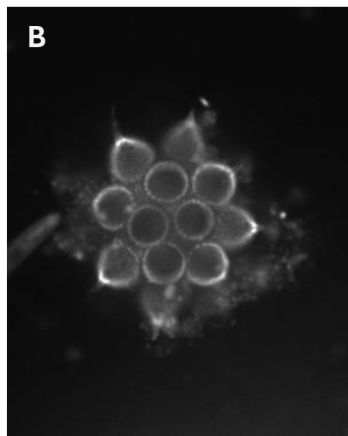
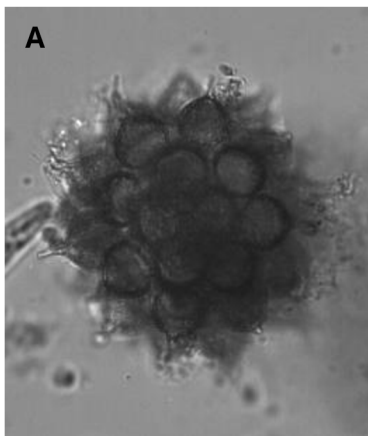
Obrázek 27. Želvuška z izolátu GY618 (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



Obrázek 28. Želvuška z izolátu VH28F (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



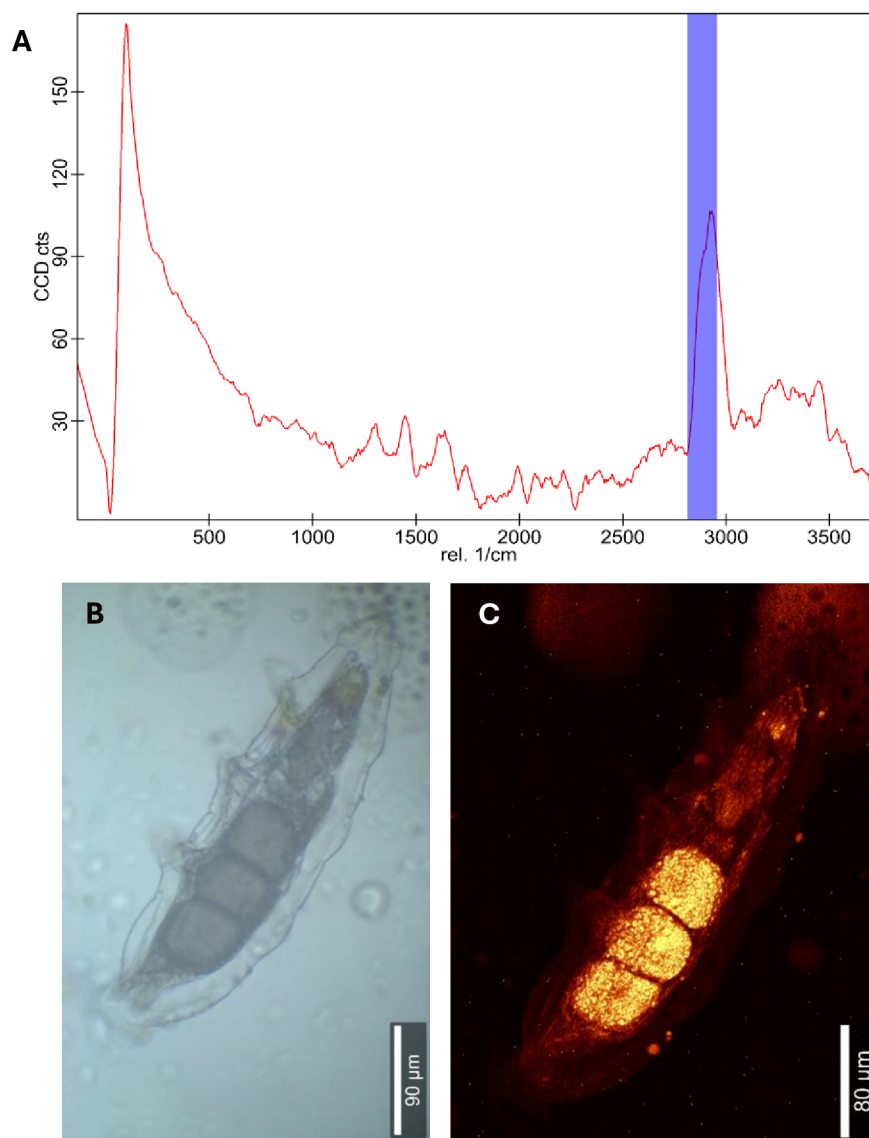
Obrázek 29. Želvuška z izolátu VH28S (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B – fluorescenční mikroskopie.



Obrázek 30. Vajíčko z izolátu VH28S (zvětšení 400x): A – světelná mikroskopie, B a C – fluorescenční mikroskopie.

4.5 Ramanova mikroskopie

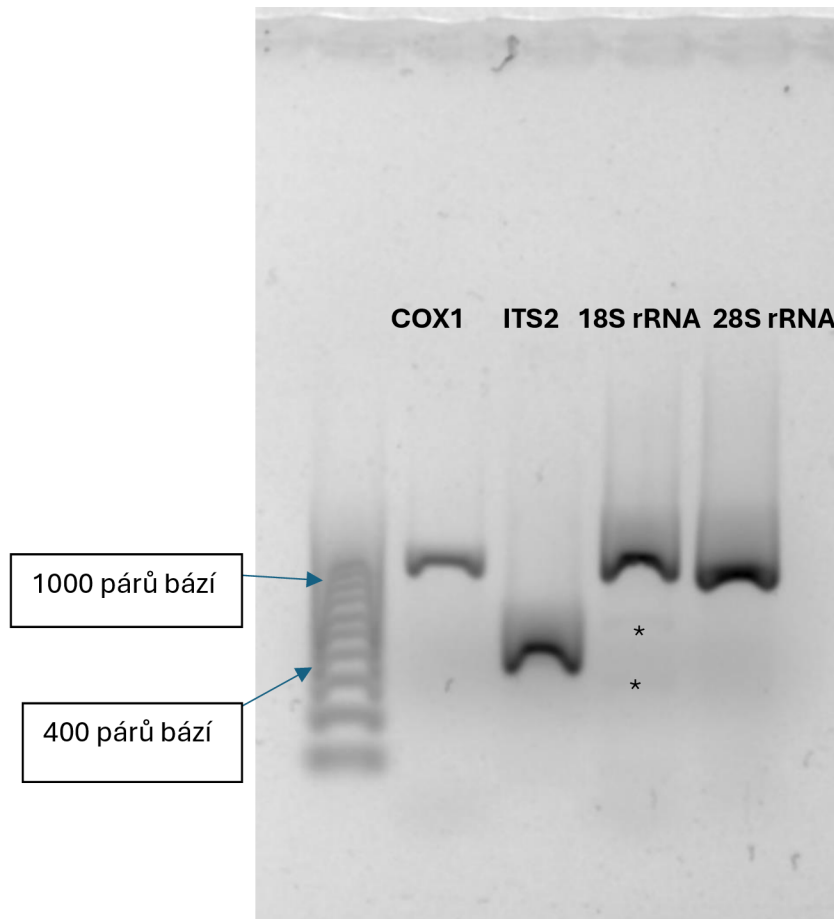
Ramanova mikroskopie byla testována jako metoda potenciálně umožňující využít koncentračních rozdílů látek obsažených v želvuškách k vizualizaci vnitřních i kutikulárních struktur. V pilotním experimentu byl použit *Hys. exemplaris*. Po změření spektra v širokém rozsahu vlnového čísla v jednotlivých bodech vzorku (Obr. 31A) byly vytvořeny obrázky z intenzit signálů v jednotlivých oknech v rozsahu 100 jednotek. Obrázek 31C ukazuje příklad snímku vytvořeného na základě intenzit v rozsahu označeném na obrázku 31A fialovým pásem. V konkrétním případě je vysoký signál ve vajíčcích. Protože je metoda časově náročná a nepřinášela informaci o strukturách, které jsou obvykle využívány v taxonomii, metodu jsme dále nerozvíjeli.



Obrázek 31. Ramanova spektrometrie: A – Ramanův spektrogram, B – želvuška v procházejícím světle, C – želvuška vykreslena pseudobarvami.

4.6 Genotypizace divokých želvušek z mechu

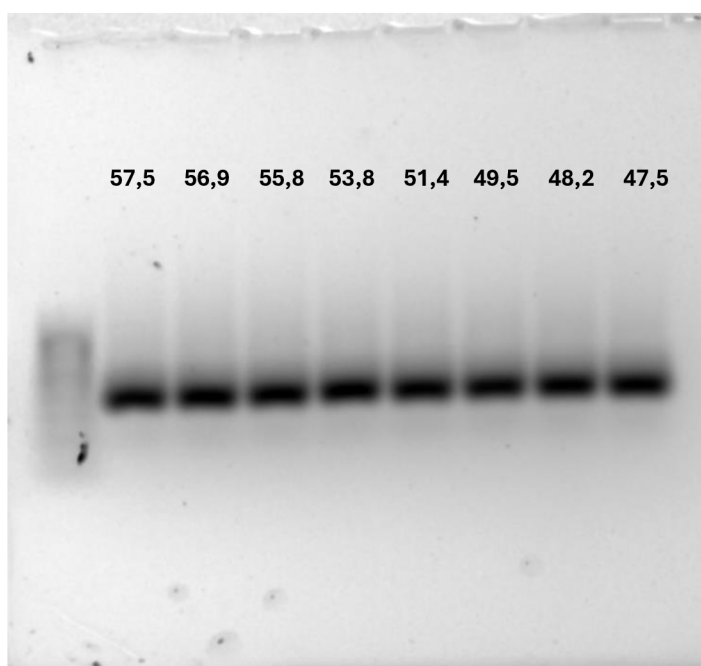
Příklad záznamu agarosové elektroforózy PCR produktů pro všechny cílové geny COX1, ITS2, 28S rRNA a 18S rRNA je na obrázku 32. V tomto případě (vzorek VH28S) při amplifikaci genů COX1, ITS2 a 18S rRNA byly pozorovány pouze specifické produkty. U primeru 28S rRNA byly patrné náznaky nesespecifických produktů.



Obrázek 32. Ukázka PCR produktů vzniklých amplifikací cílových sekvencí pro izolát VH28S. Hvězdičkou jsou označeny stopy nesespecifického produktu.

4.6.1 Optimalizace PCR reakce

V laboratoři již v létě 2023 Sarah Berger optimalizovala PCR pro 3 barkodovací sekvence (COX1, 18S rRNA a 28S rRNA). Protože se ukázalo, že identifikace druhu s jejich využitím nemusí být možná, rozšířila jsem soubor cílových sekvencí o ITS2. Primery byly použity z literatury (Massa a kol., 2021). Obrázek 33 ukazuje agarosový gel s PCR produkty získanými při různých teplotách hybridizace při 40 cyklech. Na gelu nebyly viditelné žádné vedlejší nespecifické produkty. V dalších experimentech jsem volila teplotu 51 °C. Proužky jsou rozostřeny z důvodu nemožnosti vyfotit gel v den, kdy byla elektroforéza provedena.



Obrázek 33. Produkty PCR pro cílový gen ITS2 s teplotním gradientem pro hybridizační krok. Teploty na obrázku jsou uvedeny v stupních Celsia [°C].

4.6.2 Vlastní barkódování

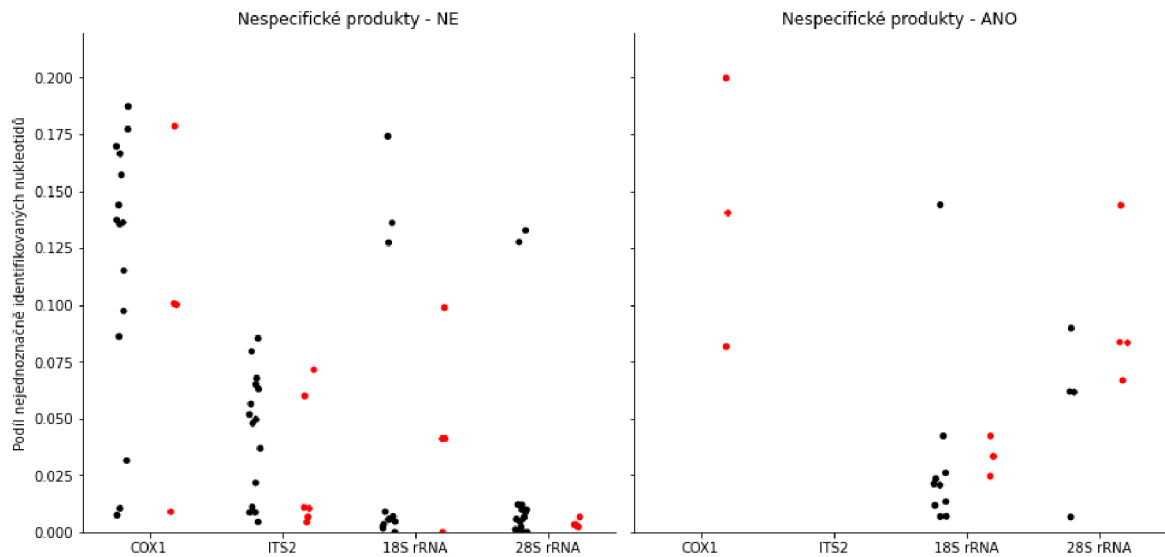
DNA byla izolována pomocí (Quick-DNA™ Microprep Plus Kit od Zymo Research) z 9 izolátů želvušek vybraných pro bližší studium. Pro izolát GY617 nebyla provedena genotypizace z důvodu nízkého počtu jedinců. Při PCR amplifikaci cílových sekvencí byl ve všech případech na agarosovém gelu přítomen jeden jasně dominantní produkt v přibližně očekávané velikosti. Případně vedlejší produkty byly pozorovány jako stopy. Po přečištění exonukleázou (ExoCleanUp FAST od VWR) a naředění byly produkty odeslány na Sangerovo sekvenování do firmy Seqme. Po odstranění úvodních

a koncových sekvencí o nízké kvalitě na základě mnohonásobného srovnání sekvencí (program tCoffee) bylo provedeno srovnání sekvencí se sekvencemi v databázi NCBI pomocí programu megaBLAST. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

Pro 9 studovaných izolátů byla izolována DNA nezávisle z několika jedinců, některé vzorky obsahovaly jedinců více (3-5) kvůli zvýšení výtěžku DNA. V případě vzorku VH28 byla DNA izolována z jedinců v rozmnožující se izolátu založeném na podzim (VH28F) a z nové izolace provedené na jaře (VH28S). Izolovaná DNA sloužila jako templát pro amplifikaci 4 barkódovacích sekvencí COX1, ITS2, 18S rRNA a 28S rRNA.

Celkem bylo sekvenováno 97 vzorků. Kvalita sekvenace se výrazně lišila, jak ukazuje zastoupení kódů pro nejednoznačně určený nukleotid (tab. 7). Důvod není zcela zřejmý. Vzhledem k tomu, že některé izolace byly provedeny z několika jedinců, nelze vyloučit, že směs obsahovala více druhů s podobnou morfologií a sekvenovaný PCR produkt proto nebyl homogenní, ale šlo o směs sekvencí. Podobně mohlo dojít i k amplifikaci DNA dalších organismů odebraných z kultur spolu s želvuškami včetně jejich mikroflóry. Graf (obr. 34) podílu nejednoznačně určených nukleotidů pro jednotlivé cílové sekvence a počet jedinců neumožňuje vyvodit jasné závěry, protože pro některé primery jsou sekvence v průměru kvalitnější ve vzorcích s více jedinci. Nejde ani vyloučit to, že nízká kvalita sekvenování byla způsobena nízkou koncentrací nebo čistotou DNA. To byl problém minimálně tří vzorků, u kterých se sekvenci nepodařilo přečíst vůbec. Nabízí se hypotéza, že nízká kvalita sekvencí COX1, které byly připravovány v jedné dávce je způsobena nízkou kvalitou vzorku.

Ojedinele byly pozorovány na agarosové elektroforéze nespecifické produkty (obr. 34) v malém množství, nejčastěji se tak dělo v případě amplifikací sekvencí 18S rRNA a 28S rRNA, pravděpodobně proto, že jde o univerzálnější barkódovací sekvence. Zde se zdá, že zejména pokud jde o vzorky z jednoho individua, přítomnost nespecifického produktu má vliv na kvalitu sekvenace.



Obrázek 34. Podíl nejednoznačně určených nukleotidů v získaných barkódech. Pozn. Červeně jsou označeny vzorky s více jedinci.

Srovnání přečtených sekvencí databázovými sekvencemi ukazuje tabulka 7, ve které jsou uvedeny tři sekvence patřící nejpodobnějším organizmům podle skóre pro lokální párové srovnání provedené aplikací megaBLAST. Všechny tyto sekvence měly tzv. E hodnotu (číslo udávající, kolik sekvencí se stejným nebo lepším skóre by bylo v databázi nalezeno náhodně) menší než $1E-10$. V tabulce 6 chybí 12 sekvencí, ve 3 případech se nepovedlo sekvenci přečíst, v dalších 3 případech nebyly identifikované organizmy želvušky, ale houba, řasa a améba a pro zbylých 6 sekvencí megaBLAST, který hledá vysoce příbuzné sekvence neposkytl žádné výsledky.

Jednoznačné určení druhů na základě našeho sekvenování není možné z následujících důvodů. Zaprvé je vysoká sekvenční podobnost genů různých druhů želvušek, zejména pokud jde o 18S rRNA a 28S rRNA. Dále pro želvušky v databázi obvykle nebyly použity všechny 4 barkódy, které jsem používala já. Například pro rod *Macrobiotus* jsou v databázi sekvence pro jiný úsek COX1 než pro rod *Mesobiotus* (viz níže). Posledním důvodem je variabilní kvalita mnou získaných barkódů (chybějící barkódy, vysoký podíl nejasně přiřazených nukleotidů). Postiženy jsou především sekvence COX1 a ITS, které vykazují větší diferenciační schopnost než barkódy 18S rRNA a 28S rRNA.

Možné je učinit tato pozorování. Srovnání výsledku vyhledávání příbuzných sekvencí pro konkrétní barkód přečtený z opakovaných izolací DNA z téhož izolátu.

Konkrétní barkódy vzorků z opakovaných izolací obvykle identifikují stejný cílový druh, i když některé mají nízkou kvalitu sekvence. Zdá se tedy, že populace želvušek byly obvykle druhově homogenní.

Výjimkou je izolát GY316, kde replikáty 1 a 2 (jednotlivá zvířata) jsou označeny jako zástupci rodu *Mesobiotus* a replikát 3 (více zvířat) jako rod *Macrobiotus* na základě tří barkódů (ITS2, 18S rRNA a 28S rRNA), které se podařilo získat. U izolátu GY258 jsou replikáty shodné pro tři barkódovací sekvence, odlišné druhy jsou identifikovány pomocí 18S rRNA. Ale blíže příbuzné druhy *Macrobiotus sottilei*, *sapiens* a *kyoukenus* jsou v 5 nejpodobnějších sekvencích všech replikátů. Podobně v izolátu GY451 u sekvence 18S rRNA není shoda na prvním místě, ale ve všech případech mezi nejlépe skórujícími sekvencemi jsou *Macrobiotus sp.* DNA-DT-19, *Macrobiotus dolosus* a *Macrobiotus polonicus*.

Dále je možné srovnání výsledku vyhledávání příbuzných sekvencí pro různé barkódy pocházející z jednoho vzorku DNA. Přestože je pro soubor všech barkódovacích primerů jen výjimečně nalezen jako nejvýše skórující tentýž organizmus, obvykle jde o želvušky z téhož rodu. Platí to pro izoláty GY257, GY313, GY385, VH28F a VH28S, kde je shoda na rodu *Mesobiotus* a izolát GY618, kde je shoda na rodu *Ramazzotius*.

Komplikovanější situace je ve dvou případech, kdy izolát patrně patří k rodu *Macrobiotus*. Pro izolát GY258, který je podle obou ribozomálních sekvencí a ITS2 rod *Macrobiotus*, je nejbližší sekvencí pro COX1 barkód sekvence rodu *Mesocrista* při nízké shodě (asi 75 %). Toto je pozorováno pro všechny 3 vzorky z izolátu, přičemž kvalita sekvencí je poměrně vysoká (0,74-1,04 % nejednoznačně přiřazených nukleotidů). Pro izolát GY451 a barkódy ITS2 a 18S rRNA je rod *Macrobiotus* nejbližší sekvencí. Pro 28S rRNA je *Macrobiotus* na druhém místě (podobnost 97,1 %), přičemž rozdíly v sekvenční podobnosti mezi prvním *Xenobiotus* jsou minimální (podobnost 97,0 %) (čísla jsou pro nejlepší vzorek z izolátu). Pro barkód COX1 ale pochází nejbližší sekvence z několika druhů *Milnesium* (podobnost sekvencí 75-85 %) pro jediný izolát s nízkou kvalitou sekvence (10 % nejednoznačně přiřazených nukleotidů).

Zdá se tedy, že pro *Macrobiotus* jsou v databázi sekvence pro jiný úsek COX1 než amplifikují naše primery, které jsou naopak široce využívané pro rod *Mesobiotus*. Srovnání sekvencí pro všechna naše sekvenování pro COX1 (více jak 3000 sekvencí nalezených pomocí megaBLASTu) obsahují jedinou sekvenci pocházející z rodu *Macrobiotus* (s podobností menší než 80 %).

Pokud jde o bližší určení druhu v rámci rodu *Mesobiotus* pro izoláty GY257, GY313, GY316 (kromě replikátu 3), GY385, VH28F a VH28S je pro 28S rRNA jako několik nejvíce blízkých sekvencí uváděn barkód skupiny *harmsworthi*. Sekvence patří izolátům (druhům) Trento (podobnost 99,208 %), Modena (podobnost 99,193 %) a Messina (podobnost 98,529 %), další druhy *Mesobiotus* následují až s odstupem. Je možné se tedy domnívat, že vzhledem k tomu, že takto vysokou podobnost má hned několik izolátů skupiny *harmsworthi*, budou mé vzorky patřit k této skupině, a ne k homogenní skupině *furciger*.

Barkódovací sekvence pro oba izoláty VH28, tj. vzorky z izolátu i vzorky získané nově z mechu umožní v databázi dohledat stejné organismy. Vzhledem k tomu, že k dispozici bylo několik sekvencí s méně než 2,5 % nejednoznačně určených nukleotidů byla vytvořena konsenzová sekvence. První sekvence vyhledané v databázi jsou ale stejné, čili ani konsenzová sekvence neumožňuje dále zpřesnit taxonomickou identifikaci.

Tabulka 7. Srovnání získaných barkódů se sekvencemi v databázi NCBI. Uvedeny jsou tři organismy s nejvyšším skóre podle programu megaBLAST. V kulatých závorkách je identifikační číslo sekvence. V hranatých závorkách jsou parametry srovnání v tomto pořadí: sekvenační podobnost v procentech, délka podobného úseku sekvence, skóre, E-hodnota. Červeně jsou označeny jiné organismy než želvušky.

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvůšek	Přítomnost nespecific. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
GY257	COX1	2	0	0	652	11,5	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [82,609; 598; 634,0; 9,95e-177]	<i>Evacanthus grandipes</i> (KF920356) [78,146; 151; 106,0; 9,65e-18]	<i>Evacanthus bistigmanus</i> (KY264107) [76,351; 148; 86,1; 1,26e-11]
GY257	ITS2	2	0	0	462	2,2	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [97,561; 287; 503,0; 2,02e-137]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [87,891; 256; 298,0; 1,02e-75]	Mesobiotus sp. (OP696674) [85,259; 251; 259,0; 4,84e-64]
GY257	18S rRNA	1	0	0	873	17,4	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [82,442; 860; 1027,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [81,69; 852; 981,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [81,163; 860; 957,0; 0,0]
GY257	18S rRNA	2	0	0	873	0,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [98,973; 876; 1576,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,276; 870; 1531,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,146; 876; 1487,0; 0,0]
GY257	28S rRNA	1	0	1	906	6,2	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [93,581; 888; 1413,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [92,825; 878; 1362,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [93,364; 859; 1360,0; 0,0]
GY257	28S rRNA	2	0	1	907	0,7	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,343; 905; 1596,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,288; 876; 1543,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,648; 893; 1539,0; 0,0]
GY257	28S rRNA	3	1	1	904	14,4	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [84,828; 903; 1140,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [83,987; 893; 1090,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [84,325; 874; 1086,0; 0,0]
GY258	COX1	1	0	0	672	0,7	Mesocrista revelata (KU495935) [76,596; 658; 363,0; 5,35e-95]	nan (nan) [76,311; 591; 313,0; 547-80]	<i>Phytomyza minuscula</i> (EU367522) [75,415; 663; 313,0; 547-80]
GY258	COX1	2	0	0	671	1,0	Mesocrista revelata (KU495934) [76,596; 658; 364,0; 1,49e-95]	<i>Phytomyza minuscula</i> (EU367522) [75,415; 663; 315,0; 1,52e-80]	nan (nan) [76,311; 591; 313,0; 5,46e-80]
GY258	COX1	3	1	0	673	0,9	Mesocrista revelata (KU495935) [76,48; 659; 361,0; 1,93e-94]	<i>Phytoliriomyza robiniae</i> (EF104722) [76,421; 598; 318,0; 1,18e-81]	nan (nan) [76,351; 592; 315,0; 1,52e-80]
GY258	ITS2	1	0	0	453	7,9	Macrobiotus cf. sapiens S12.1 (OK663215) [84,195; 329; 333,0; 2,75e-86]	Macrobiotus sottilei (MW247179) [84,984; 313; 331,0; 9,89e-86]	Macrobiotus sapiens (GQ403680) [82,867; 286; 267,0; 2,83e-66]

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvušek	Přítomnost nespecif. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
GY258	ITS2	2	0	0	454	1,1	Macrobiotus cf. sapiens S12.1 (OK663215) [95,153; 392; 623,0; 1,46e-173]	Macrobiotus sottilei (MW247179) [96,063; 381; 623,0; 1,46e-173]	Macrobiotus papei (MH063921) [91,872; 406; 566,0; 2,5e-156]
GY258	ITS2	3	1	0	451	0,7	Macrobiotus cf. sapiens S12.1 (OK663215) [95,408; 392; 627,0; 1,12e-174]	Macrobiotus sottilei (MW247179) [96,325; 381; 627,0; 1,12e-174]	Macrobiotus papei (MH063921) [92,118; 406; 569,0; 1,92e-157]
GY258	18S rRNA	1	0	1	875	14,4	Macrobiotus sottilei (MW247178) [87,418; 763; 1044,0; 0,0]	Macrobiotus papei (MH063881) [87,418; 763; 1040,0; 0,0]	Macrobiotus shonaicus (MG757132) [87,287; 763; 1038,0; 0,0]
GY258	18S rRNA	2	0	1	875	4,2	Macrobiotus sapiens (DQ839601) [95,103; 878; 1448,0; 0,0]	Macrobiotus scoticus (KY797265) [94,533; 878; 1421,0; 0,0]	Macrobiotus kyoukenus (ON818312) [94,804; 866; 1415,0; 0,0]
GY258	18S rRNA	3	1	1	875	4,2	Macrobiotus sapiens (DQ839601) [95,216; 878; 1454,0; 0,0]	Macrobiotus scoticus (KY797265) [94,647; 878; 1426,0; 0,0]	Macrobiotus kyoukenus (ON818312) [94,919; 866; 1421,0; 0,0]
GY258	28S rRNA	1	0	0	870	12,8	Macrobiotus kyoukenus (ON818311) [80,0; 880; 843,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi (MH079484) [79,909; 876; 832,0; 0,0]	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [78,636; 880; 765,0; 0,0]
GY258	28S rRNA	2	0	0	902	0,9	Macrobiotus kyoukenus (ON818311) [97,531; 891; 1533,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi (MH079484) [97,146; 876; 1489,0; 0,0]	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [95,398; 891; 1419,0; 0,0]
GY258	28S rRNA	3	1	0	901	0,7	Macrobiotus kyoukenus (ON818311) [97,643; 891; 1533,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi (MH079484) [97,26; 876; 1491,0; 0,0]	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [95,511; 891; 1421,0; 0,0]
GY313	COX1	1	0	0	649	17,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [79,31; 580; 560,0; 1,7e-154]	Evacanthus grandipes (KF920075) [78,378; 148; 108,0; 2,67e-18]	Evacanthus bistigmanus (KY264107) [76,0; 150; 87,9; 3,48e-12]
GY313	COX1	2	0	0	649	15,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [83,908; 522; 617,0; 9,97e-172]	Evacanthus grandipes (KF920356) [78,231; 147; 100,0; 4,47e-16]	Evacanthus bistigmanus (KY264107) [78,899; 109; 75,0; 2,71e-08]
GY313	COX1	3	1	0	644	17,9	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [84,58; 441; 534,0; 1,02e-146]	Evacanthus grandipes (KF920075) [78,313; 166; 113,0; 5,69e-20]	Ceylonthelphusa diva (GQ289626) [76,582; 158; 95,3; 2,06e-14]
GY313	ITS2	1	0	0	461	5,6	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [94,077; 287; 468,0; 7,36e-127]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [83,594; 256; 259,0; 4,82e-64]	-
GY313	ITS2	2	0	0	464	0,9	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [99,652; 287; 527,0; 1,21e-144]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,453; 256; 315,0; 1,02e-80]	Mesobiotus sp. (OP696674) [79,104; 469; 291,0; 172-73]

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvušek	Přítomnost nespecif. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
GY313	ITS2	3	1	0	462	0,4	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [100,0; 287; 531,0; 9,28e-146]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,844; 256; 318,0; 7,87e-82]	Mesobiotus sp. (OP696674) [79,14; 465; 287,0; 2,22e-72]
GY313	18S rRNA	1	0	0	895	0,9	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [98,775; 898; 1607,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,161; 870; 1530,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [96,993; 898; 1519,0; 0,0]
GY313	18S rRNA	2	0	1	896	2,3	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [97,327; 898; 1559,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [96,782; 870; 1487,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [95,657; 898; 1476,0; 0,0]
GY313	18S rRNA	3	1	1	896	2,5	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [97,216; 898; 1557,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [96,667; 870; 1483,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [95,434; 898; 1469,0; 0,0]
GY313	28S rRNA	1	0	0	883	0,0	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [99,208; 884; 1592,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [99,193; 867; 1561,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,529; 884; 1557,0; 0,0]
GY313	28S rRNA	2	0	0	883	0,5	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,756; 884; 1578,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,731; 867; 1546,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,077; 884; 1543,0; 0,0]
GY313	28S rRNA	3	1	0	883	0,2	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,982; 884; 1585,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,962; 867; 1554,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,303; 884; 1550,0; 0,0]
GY316	COX1	1	0	0	657	18,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [84,096; 415; 479,0; 4,97e-130]	Ochlerotatus communis (KP942762) [78,238; 193; 124,0; 2,69e-23]	Digamasellidae sp. BIOUG17847-B02 (MF918312) [78,571; 168; 110,0; 7,52e-19]
GY316	COX1	2	0	0	655	16,6	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [78,435; 524; 449,0; 3,89e-121]	Ochlerotatus communis (KP942762) [77,714; 175; 108,0; 2,7e-18]	Digamasellidae sp. BIOUG17847-B02 (MF918312) [79,054; 148; 102,0; 1,25e-16]
GY316	ITS2	1	0	0	458	6,8	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [99,303; 287; 521,0; 553-143]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,453; 256; 315,0; 1,01e-80]	Mesobiotus sp. (OP696674) [87,251; 251; 279,0; 3,68e-70]
GY316	ITS2	2	0	0	462	0,9	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [98,955; 287; 520,0; 2,01e-142]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,453; 256; 316,0; 282-81]	Mesobiotus sp. 2 DVT-2023b (OR805173) [79,121; 455; 287,0; 2,22e-72]
GY316	ITS2	3	1	0	451	6,0	Macrobiotus hufelandi (OK663210) [93,197; 441; 697,0; 0,0]	Macrobiotus aff. wandae (MW588430) [79,526; 464; 340,0; 1,64e-88]	Macrobiotus wandae (MN435120) [81,503; 346; 294,0; 1,29e-74]
GY316	18S rRNA	1	0	1	895	1,3	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [98,218; 898; 1589,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [97,701; 870; 1513,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [96,659; 898; 1509,0; 0,0]

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvůšek	Přítomnost nespecif. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
GY316	18S rRNA	2	0	0	879	0,6	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,205; 881; 1596,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,393; 871; 1539,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,389; 881; 1507,0; 0,0]
GY316	18S rRNA	3	1	0	875	4,1	Macrobiotus hufelandi (OP596302) [95,538; 874; 1461,0; 0,0]	Macrobiotus sp. Macro_06_139 (EU266936) [95,723; 865; 1458,0; 0,0]	Macrobiotus sp. Macro_07_077 (EU266935) [95,723; 865; 1458,0; 0,0]
GY316	28S rRNA	1	0	0	883	0,6	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,643; 884; 1574,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,731; 867; 1546,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,964; 884; 1539,0; 0,0]
GY316	28S rRNA	2	0	0	882	0,2	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,869; 884; 1578,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [99,077; 867; 1557,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,19; 884; 1544,0; 0,0]
GY316	28S rRNA	3	1	1	874	8,4	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [86,364; 858; 1040,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi group sp. NG-2008 (FJ435751) [86,364; 858; 1040,0; 0,0]	Xerobiotus gretae (MW588440) [85,93; 860; 1020,0; 0,0]
GY385	COX1	1	0	0	672	17,0	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [83,191; 470; 531,0; 1,39e-145]	Digamasellidae sp. BOLD:ACI5517 (KR096994) [80,405; 148; 113,0; 5,95e-20]	Drawida ghilarovi (OL785717) [75,497; 151; 76,8; 7,81e-09]
GY385	COX1	2	0	0	664	13,6	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [82,676; 583; 640,0; 2,18e-178]	Ochlerotatus communis (KP942762) [78,68; 197; 130,0; 5,84e-25]	Digamasellidae sp. BIOUG17847-B02 (MF918312) [79,167; 168; 113,0; 5,88e-20]
GY385	COX1	3	1	1	641	20,0	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [80,81; 469; 494,0; 172-134]	-	-
GY385	ITS2	1	0	0	462	6,5	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [98,258; 287; 512,0; 3,36e-140]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,062; 256; 313,0; 3,66e-80]	Mesobiotus sp. (OP696674) [86,853; 251; 276,0; 479-69]
GY385	ITS2	2	0	0	461	6,3	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [99,652; 287; 525,0; 4,31e-144]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,844; 256; 318,0; 784-82]	Mesobiotus sp. (OP696674) [87,251; 251; 279,0; 3,7e-70]
GY385	ITS2	3	1	0	462	1,1	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [100,0; 287; 531,0; 9,28e-146]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [89,844; 256; 318,0; 7,87e-82]	Mesobiotus sp. (OP696674) [87,251; 251; 279,0; 3,71e-70]
GY385	18S rRNA	1	0	1	878	0,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [98,978; 881; 1585,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,274; 869; 1528,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,162; 881; 1496,0; 0,0]
GY385	18S rRNA	2	0	0	879	0,2	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,433; 882; 1602,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,622; 871; 1543,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,619; 882; 1513,0; 0,0]

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvušek	Přítomnost nespecific. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
GY385	18S rRNA	3	1	0	878	0,0	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,659; 881; 1607,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,852; 871; 1550,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,843; 881; 1519,0; 0,0]
GY385	28S rRNA	1	0	0	908	0,7	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,453; 905; 1602,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,402; 876; 1548,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,76; 893; 1546,0; 0,0]
GY385	28S rRNA	2	0	0	909	1,0	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,232; 905; 1598,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,174; 876; 1544,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,536; 893; 1541,0; 0,0]
GY385	28S rRNA	3	1	0	906	0,3	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,564; 905; 1600,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,63; 876; 1554,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,984; 893; 1550,0; 0,0]
GY451	COX1	3	1	0	686	10,1	Milnesium sp. C3209 France (MN847761) [86,576; 663; 846,0; 0,0]	Milnesium tardigradum (OP009210) [86,405; 662; 839,0; 0,0]	Milnesium sp. C3282 BernoldalT (MN847757) [86,275; 663; 833,0; 0,0]
GY451	ITS2	1	0	0	446	8,5	Macrobiotus polonicus (MW588427) [88,923; 325; 431,0; 932-116]	Macrobiotus aff. polonicus S165 (MW588020) [85,032; 314; 340,0; 1,62e-88]	Macrobiotus cf. polonicus (MW588429) [84,356; 326; 340,0; 1,62e-88]
GY451	ITS2	2	0	0	449	0,4	Macrobiotus polonicus (MW588427) [99,769; 432; 791,0; 0,0]	Macrobiotus cf. polonicus (MW588429) [95,381; 433; 682,0; 0,0]	Macrobiotus dolosus (OQ548104) [98,86; 351; 625,0; 4,01e-174]
GY451	ITS2	3	1	0	588	7,1	Macrobiotus polonicus (MW588427) [87,037; 432; 556,0; 1,99e-153]	Macrobiotus cf. polonicus (MW588429) [84,065; 433; 475,0; 572-129]	Macrobiotus dolosus (OQ548104) [85,96; 349; 425,0; 5,84e-114]
GY451	18S rRNA	1	0	0	875	13,6	Macrobiotus dolosus (OP596292) [86,486; 851; 1147,0; 0,0]	Macrobiotus sp. DNA-DT-19 (MN927135) [86,316; 855; 1142,0; 0,0]	Macrobiotus polonicus (HM187580) [86,199; 855; 1136,0; 0,0]
GY451	18S rRNA	2	0	1	269	2,6	Macrobiotus sp. DNA-DT-19 (MN927135) [97,727; 264; 460,0; 677-125]	Macrobiotus dolosus (OP596292) [97,727; 264; 460,0; 677-125]	Macrobiotus polonicus (HM187580) [97,727; 264; 460,0; 677-125]
GY451	18S rRNA	3	1	0	861	9,9	Macrobiotus sp. DNA-DT-19 (MN927135) [84,681; 816; 937,0; 0,0]	Macrobiotus dolosus (OP596292) [84,681; 816; 937,0; 0,0]	Macrobiotus polonicus (HM187580) [84,681; 816; 935,0; 0,0]
GY451	28S rRNA	1	0	0	874	13,3	Xerobiotus gretae (MW588440) [84,06; 872; 1038,0; 0,0]	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [83,849; 873; 1020,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi group sp. NG-2008 (FJ435751) [83,849; 873; 1020,0; 0,0]
GY451	28S rRNA	2	0	0	835	1,2	Xerobiotus gretae (MW588440) [97,55; 694; 1195,0; 0,0]	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [97,118; 694; 1177,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi group sp. NG-2008 (FJ435751) [96,974; 694; 1171,0; 0,0]

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvušek	Přítomnost nespecific. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
GY451	28S rRNA	3	1	1	869	6,7	Xerobiotus gretae (MW588440) [92,184; 870; 1332,0; 0,0]	Macrobiotus sp. 1 MC-2021 (MW695453) [92,184; 870; 1327,0; 0,0]	Macrobiotus hufelandi group sp. NG-2008 (FJ435751) [92,078; 871; 1317,0; 0,0]
GY618	COX1	1	0	0	686	8,6	Ramazzottius aff. oberhaeuseri 7 DS-2018 (MG573246) [89,312; 552; 789,0; 0,0]	Ramazzottius cf. oberhaeuseri (EU251382) [74,964; 687; 405,0; 8,96e-108]	Ramazzottius rupeus (MG432810) [76,408; 568; 370,0; 3,27e-97]
GY618	ITS2	1	0	0	464	5,2	Ramazzottius varieornatus (AP013352) [80,992; 484; 399,0; 2,74e-106]	Ramazzottius sp. DE.002 (MG432815) [81,069; 449; 379,0; 3,57e-100]	Ramazzottius kretschmanni (OM402520) [80,778; 463; 377,0; 1,29e-99]
GY618	18S rRNA	1	0	1	848	1,2	Ramazzottius oberhaeuseri (FJ435728) [97,877; 848; 1483,0; 0,0]	Ramazzottius sabatiniae (MK879540) [96,938; 849; 1439,0; 0,0]	Ramazzottius groenlandensis (OR600266) [96,938; 849; 1439,0; 0,0]
GY618	28S rRNA	1	0	1	881	9,0	Ramazzottius sabatiniae (MK879546) [89,035; 839; 1127,0; 0,0]	Cryoconicus cataphractus (MH079508) [88,902; 838; 1122,0; 0,0]	Ramazzottius varieornatus (AP013352) [88,544; 838; 1101,0; 0,0]
VH28F	COX1	1	0	0	658	9,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [79,823; 565; 507,0; 2,29e-138]	Ochlerotatus communis (KP942762) [78,286; 175; 113,0; 5,82e-20]	Digamasellidae sp. BIOUG17847-B02 (MF918312) [79,487; 156; 110,0; 7,53e-19]
VH28F	COX1	2	0	0	648	13,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [86,578; 529; 678,0; 0,0]	Evacanthus grandipes (KF920356) [77,64; 161; 106,0; 9,59e-18]	Ceylonthelphusa diva (GQ289626) [75,949; 158; 91,6; 2,68e-13]
VH28F	18S rRNA	2	0	0	874	0,3	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,316; 877; 1589,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,507; 871; 1539,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,491; 877; 1500,0; 0,0]
VH28F	18S rRNA	3	0	0	875	0,5	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,423; 867; 1570,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,616; 867; 1531,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,578; 867; 1482,0; 0,0]
VH28F	18S rRNA	4	0	0	876	0,0	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,658; 878; 1602,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,853; 872; 1552,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [97,836; 878; 1513,0; 0,0]
VH28F	18S rRNA	5	0	0	609	0,2	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [99,183; 612; 1101,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,693; 612; 1085,0; 0,0]	Mesobiotus occultatus (MH197147) [98,671; 602; 1068,0; 0,0]
VH28F	28S rRNA	2	0	0	883	0,0	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [99,208; 884; 1592,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [99,193; 867; 1561,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,529; 884; 1557,0; 0,0]
VH28F	28S rRNA	3	0	0	883	0,0	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [99,208; 884; 1592,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [99,193; 867; 1561,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,529; 884; 1557,0; 0,0]

Izolát	Cílová sekvence	Replikát	Více želvušek	Přítomnost nespecific. produktu	Délka sekvence [bp]	Nejednoznačné nukleotidy [%]	1	2	3
VH28F	28S rRNA	4	0	0	883	0,1	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [99,095; 884; 1589,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [99,193; 867; 1561,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,416; 884; 1554,0; 0,0]
VH28F	28S rRNA	5	0	0	883	0,1	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [99,095; 884; 1589,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [99,077; 867; 1557,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [98,416; 884; 1554,0; 0,0]
VH28S	COX1	2	0	0	667	14,4	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP825091) [82,474; 582; 640,0; 2,19e-178]	Evacanthus grandipes (KF920075) [79,054; 148; 108,0; 2,75e-18]	Ceylonthelphusa diva (GQ289626) [77,305; 141; 89,8; 9,95e-13]
VH28S	ITS2	1	0	0	460	4,8	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [94,774; 287; 473,0; 157-128]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [84,766; 256; 270,0; 2,22e-67]	-
VH28S	ITS2	2	0	0	462	3,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829058) [96,167; 287; 490,0; 1,58e-133]	Mesobiotus sp. FI (OQ974696) [86,905; 252; 285,0; 7,98e-72]	Mesobiotus sp. (OP696674) [84,0; 250; 250,0; 2,91e-61]
VH28S	18S rRNA	1	0	1	863	0,7	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [98,845; 866; 1552,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [98,037; 866; 1513,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [96,998; 866; 1463,0; 0,0]
VH28S	18S rRNA	2	0	1	896	2,1	Mesobiotus sp. m MM-2022 (OP829144) [97,547; 897; 1559,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226074) [97,241; 870; 1498,0; 0,0]	Mesobiotus philippinicus (KX129793) [95,875; 897; 1476,0; 0,0]
VH28S	28S rRNA	1	0	0	908	1,0	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [98,122; 905; 1591,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [98,174; 876; 1541,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,534; 892; 1537,0; 0,0]
VH28S	28S rRNA	2	0	0	907	1,2	Mesobiotus harmsworthi group sp. Trento (KT226081) [97,901; 905; 1583,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Modena (KT226085) [97,831; 876; 1530,0; 0,0]	Mesobiotus harmsworthi group sp. Messina (KT226084) [97,2; 893; 1528,0; 0,0]

5 Diskuse

Želvušky se v posledních letech staly populárním modelem v biologii stresu, zejména radiobiologii. Studium odpovědi želvušek na stres významně usnadňuje, pokud je k dispozici homogenní laboratorní kultura. Protokolů bylo publikováno několik desítek a rešeršní část je jejich aktuálním přehledem. Narozdíl od existujících přehledových článků se snaží zahrnout všechny detaily týkající se kultivačních podmínek zmíněné v původních člancích včetně kultivačního média, teplotních a světelných podmínek, složení potravy, typu kultivační nádoby a čištění kultury.

Experimentální část práce měla za cíl prozkoumat možnosti vedoucí k založení kultur pro stresové studie, zabývá se tedy izolací želvušek z mechu, dokumentací pomocí světelné, fluorescenční a Ramanovy mikroskopie a následnou identifikací druhů podle morfologických znaků a DNA barkódování.

Zkoumané vzorky pocházely především ze sběru mechu studenty (N=203) z 27 škol po celé republice, co se zapojily do mapování želvušek. Soubor jsem doplnila o 31 vzorků z Olomouce a Pardubic. Vlastní vzorky jsem izolovala pomocí Baermannových nálevek, vzorky od středoškoláků pomocí inzertů se sítkem v 6jamkové desce. To se ukázalo jako velice efektivní krok pro izolaci z malého množství mechu (15 cm³) se podařilo izolovat želvušky v 67 % případech. Ve 12,8 % byl počet jedinců 10 a vyšší. Pozorované rody zahrnovaly eutardigrádní rody *Milnesium*, *Macrobotus*, *Mesobotus*, *Hypsibius* a *Ramazzottius*. Pro deset vybraných vzorků jsem provedla izolaci z většího množství pomocí Baermannovy nálevky a následně detailní charakterizaci izolovaných druhů. Vybrány byly jednak mechy VH28, kde jsem pozorovala, že želvušky živící se krytenkami pocházejícími z mechu a nabídnutou *C. elegans* tvoří viabilní vajíčka. Potom dalších osm vzorků, kde první pilotní izolace poskytla 10+ jedinců a, kde želvušky přežily po izolaci alespoň dva měsíce v minerální vodě Volvic.

Takto získané izoláty byly dokumentovány pomocí mikroskopie v procházejícím světle (trvalý preparát) a fluorescenční mikroskopie sledující autofluorescenci vnitřních struktur po ozáření UV při zvětšení 400x. Želvušky se určují obvykle při větších zvětšeních (600-1000x), často je využívána elektronová mikroskopie. Důležitým

určovacím parametrem jsou vajíčka. Pro zvýšení spolehlivosti se analyzují snímky většího množství jedinců, měří se morfometrické parametry a sleduje se jejich variabilita. K dispozici jsem měla snímky několika málo jedinců při zvětšení 400x s použitím několika rovin ostrosti, vajíčka jen pro izolát VH28S. Ambicí proto bylo určit izoláty na úrovni rodu s tím, že k zpřesnění bylo použito DNA barkódování. Posuzované parametry zahrnovaly celkovou morfologii, jako je velikost želvušky, barva, povrch kutikuly, přítomnost a umístění očí, počet a poloha makroplakoidů a mikroplakoidu a počet a tvar drápků. K určování byly používány diagnostické klíče (Kaczmarek a kol., 2020a; Pilato a Binda, 2010). Taxonomie želvušek se díky studiu sekvencí DNA bouřlivě rozvíjí. Např. původní rod *Macrobiotus* byl rozdělen do několika rodů včetně *Macrobiotus*, *Paramacrobiotus* a *Mesobiotus* (Stec a kol., 2021). V rámci každého byla identifikována řada druhů, např. *Mesobiotus* teď zahrnuje dvě hlavní homogenní skupiny: skupinu *harmsworthi* a skupinu *furciger*, které mají dohromady 75 druhů (Kaczmarek a kol., 2020a; Degma a kol., 2023). Důležitým parametrem byl v našem případě počet a konfigurace makroplakoidů a mikroplakoidu, což umožnilo předběžně řadit izoláty k rodům *Macrobiotus* (konfigurace 2+1) a *Mesobiotus* (konfigurace 3+1, mikroplakoid v těsné blízkosti k poslednímu makroplakoidu, což je rozdíl oproti rodu *Paramacrobiotus*, u kterého pokud se mikroplakoid nachází, tak ve větší vzdálenosti od třetího makroplakoidu) (Pilato a Binda, 2010).

Řazení k rodu *Mesobiotus* ovšem zcela nesesedělo s dalším typickým znakem tohoto rodu, a to hladkou kutikulou. V jednom případě, izolátu GY313 odhadovaném jako *Mesobiotus*, jsem pozorovala červené pigmentové skvrny v oblasti hlavy. Překvapivě tento znak se nepodařilo najít v klíči ani novější literatuře (hledání příbuzných termínů v Google scholar, který umožňuje plnotextové vyhledávání).

Ve spolupráci s doc. Václavem Rancem byla také testována Ramanova mikroskopie, která umožňuje převést signály v oblasti infračerveného spektra odpovídající chemickému složení vzorku na umělý obraz. Pilotní experimenty ale ukázaly, že v žádné části spektra intenzita signálu nedovoluje zobrazit taxonomicky zajímavé struktury. Jasnou nevýhodou byla nutnost připravit vždy čerstvé vzorky na měření, které trvá mezi 6-8 hodinami.

Pro DNA barkódování byly použity 4 sekvence převzaté z literatury (Massa a kol., 2021) a často používané ke studiu želvušek. Sekvence pro ribozomální RNA se široce používají v taxonomii napříč eukaryoty, konkrétní fragment COX1 se používá často ke studiu členovců. Pro každou izolaci jsem se pokusila získat barkódy pro několik samostatných jedinců (cílem bylo zajištění čistoty vzorku) a z většího množství jedinců (cílem bylo větší množství DNA). Z celkem 97 sekvenačních reakcí byla čitelná sekvence získána v 94 případech. Pro 85 barkódů srovnání sekvencí v databázi NCBI pomocí online verze programu megaBLAST našlo jako nejvíce podobnou sekvenci pocházející z želvušek. Výsledky srovnání potvrdily řazení želvušek k rodům *Ramazzotius*, *Macrobiotus* a *Mesobiotus* založeném na mikroskopii. Je tedy možné, že požadavek na hladkou kutikulu u posledního z rodů je neopodstatněný. Nemůžeme ale zcela vyloučit, že se pro přípravu mikroskopických preparátů a DNA použili jedinci různých druhů z téže kultury.

6 Závěr

V rámci této práce jsem testovala efektivitu izolace želvušek z malého množství materiálu pomocí inzertů se sítkem v 6jamkových panelech. Metoda je vhodná pro zpracování velkého množství vzorků, zejména pokud jde o to vytipovat vzorky s velkými populacemi želvušek. Podařilo se mi také najít podmínky ve kterých se rozmnožovala populace jednoho izolátu rodu *Mesobiotus*. Otestovala jsem také limity mikroskopů dostupných na pracovišti pro užití v taxonomii želvušek. Při zvětšení 400x, byť se snímkováním v různých rovinách ostrosti, je možné zařazení na úrovni rodu. Limitem provedeného DNA barkódování a následného srovnání sekvencí, získaných Sangerovým sekvenováním byla nejen proměnlivá kvalita barkódů, která je alespoň v některých případech řešitelná např. sekvenací paralelně s oběma primery. Problémem byla i vysoká podobnost sekvencí želvušek v databázi, jejich nedostatečné určení na úroveň druhu, a také i a to, že v publikacích jsou používány různé barkódovací sekvence v rámci téhož genu. Zde by na naší straně pomohlo rozšíření barkódovací sady. Spolehlivě je možné říct, že zkoumané izoláty patřily k rodům *Macrobiotus*, *Mesobiotus* a *Ramazzottius*.

Zajímavé je pozorování, že želvušky řazené s vysokou mírou spolehlivosti k rodu *Mesobiotus* vykazovaly některé znaky pro rod typické (konfigurace třetího makroplakoidu a mikroplakoidu), ale také znak, který při definici rodu byl explicitně vyloučen (hladká kutikula bez pórů a bradaviček).

7 Použitá literatura

1. Altiero, T., A.C. Suzuki a L. Rebecchi. 2018. "Reproduction, Development and Life Cycles. " In: Schill RO, editor. Water Bears: The Biology of Tardigrades. Zoological Monographs 2. Springer Nature Switzerland. s. 211–242. ISBN 9783319957029. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_8
2. Altiero, T., R. Bertolani a L. Rebecchi. 2010. "Hatching phenology and resting eggs in tardigrades." *Journal of Zoology* 280 (3): 290-296. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2009.00664.x>.
3. Altiero, T. a L. Rebecchi. 2001. "Rearing tardigrades: Results and problems." *Zoologischer Anzeiger* 240 (3-4): 217-221. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00028>.
4. Arakawa, K. 2022. "Examples of Extreme Survival: Tardigrade Genomics and Molecular Anhydrobiology." *Annual Review of Animal Biosciences* 10: 17-37. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083711>.
5. Arakawa, K., Y. Yoshida a M. Tomita. 2016. "Genome sequencing of a single tardigrade *Hypsibius dujardini* individual." *Scientific Data* 3. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.63>.
6. Blaxter, M. L. 2004. "The promise of a DNA taxonomy." *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 359 (1444): 669-679. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>.
7. Bonifacio, A., R. Guidetti, T. Altiero, V. Sergio a L. Rebecchi. 2012. "Nature, Source and Function of Pigments in Tardigrades: In Vivo Raman Imaging of Carotenoids in *Echiniscus blumi*." *Plos One* 7 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050162>.
8. Bryndová, M., D. Stec, R. O. Schill, L. Michalczyk a M. Devetter. 2020. "Dietary preferences and diet effects on life-history traits of tardigrades." *Zoological Journal of the Linnean Society* 188 (3): 865-877. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz146>.
9. Das, R.S. a Y.K. Agrawal. 2011. "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications." *Vibration Spectroscopy* 57 (2): 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.08.003>.

10. Degma, P. a R. Guidetti. 2023. "Actual checklist of Tardigrada species." DOI: 10.25431/11380_1178608.
11. Erdmann, W., B. Idzikowski, W. Kowalski, J. Z. Kosicki a L. Kaczmarek. 2021. "Tolerance of two anhydrobiotic tardigrades *Echiniscus testudo* and *Milnesium inceptum* to hypomagnetic conditions." Peerj 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.10630>.
12. Erdmann, W., B. Idzikowski, W. Kowalski, B. Szymanski, J. Z. Kosicki a L. Kaczmarek. 2017. "Can the tardigrade *Hypsibius dujardini* survive in the absence of the geomagnetic field?" Plos One 12 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183380>.
13. Florianciová, K. N., A. Baltzis, J. Smejkal, M. Czerneková, L. Kaczmarek, J. Maly, C. Notredame a S. Vinopal. 2023. "Phylogenetic and functional characterization of water bears (Tardigrada) tubulins." Scientific Reports 13 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31992-z>.
14. Förster, F., C. G. Liang, A. Shkumatov, D. Beisser, J. C. Engelmann, M. Schnölzer, M. Frohme, T. Müller, R. O. Schill a T. Dandekar. 2009. "Tardigrade workbench: comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades." BMC Genomics 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-469>.
15. Gabriel, W. N. a B. Goldstein. 2007. "Segmental expression of Pax3/7 and Engrailed homologs in tardigrade development." Development Genes and Evolution 217 (6): 421-433. <https://doi.org/10.1007/s00427-007-0152-5>.
16. Gabriel, W. N., R. McNuff, S. K. Patel, T. R. Gregory, W. R. Jeck, C. D. Jones a B. Goldstein. 2007. "The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development." Developmental Biology 312 (2): 545-559. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.055>.
17. Gross, V., R. Bährle a G. Mayer. 2018. "Detection of cell proliferation in adults of the water bear *Hypsibius dujardini* (Tardigrada) via incorporation of a thymidine analog." Tissue & Cell 51: 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.005>.

18. Guidetti, R., T. Altiero a L. Rebecchi. 2011. "On dormancy strategies in tardigrades." *Journal of Insect Physiology* 57 (5): 567-576. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.003>.
19. Hara, Y., R. Shibahara, K. Kondo, W. Abe a T. Kunieda. 2021. "Parallel evolution of trehalose production machinery in anhydrobiotic animals via recurrent gene loss and horizontal transfer." *Open Biology* 11 (7). <https://doi.org/10.1098/rsob.200413>.
20. Hashimoto, T., D. D. Horikawa, Y. Saito, H. Kuwahara, H. Kozuka-Hata, T. Shin-I, Y. Minakuchi, K. Ohishi, A. Motoyama, T. Aizu, A. Enomoto, K. Kondo, S. Tanaka, Y. Hara, S. Koshikawa, H. Sagara, T. Miura, S. Yokobori, K. Miyagawa, Y. Suzuki, T. Kubo, M. Oyama, Y. Kohara, A. Fujiyama, K. Arakawa, T. Katayama, A. Toyoda a T. Kunieda. 2016. "Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein." *Nature Communications* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12808>.
21. Hengherr, S., A. G. Heyer, H. R. Köhler a R. O. Schill. 2008. "Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades -: evidence for divergence in responses to dehydration." *Febs Journal* 275 (2): 281-288. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06198.x>.
22. Hohberg, K. 2006. "Tardigrade species composition in young soils and some aspects on life history of *Macrobiotus richtersi* J. Murray, 1911." *Pedobiologia* 50 (3): 267-274. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.02.004>.
23. Holzbecher, Z., J. Churáček a kol. 1987. "Analytická chemie." SNTL Praha. s. 335-338.
24. Horikawa, D. D., T. Kunieda, W. Abe, M. Watanabe, Y. Nakahara, F. Yukuhiro, T. Sakashita, N. Hamada, S. Wada, T. Funayama, C. Katagiri, Y. Kobayashi, S. Higashi a T. Okuda. 2008. "Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*:: A new model animal for astrobiology." *Astrobiology* 8 (3): 549-556. <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0139>.
25. Horikawa, D. D., T. Sakashita, C. Katagiri, M. Watanabe, T. Kikawada, Y. Nakahara, N. Hamada, S. Wada, T. Funayama, S. Higashi, Y. Kobayashi, T. Okuda a M. Kuwabara. 2006. "Radiation tolerance in the tardigrade

- Milnesium tardigradum*." International Journal of Radiation Biology 82 (12): 843-848. <https://doi.org/10.1080/09553000600972956>.
26. Hyra, M., I. Poprawa, A. Włodarczyk, S. Student, L. Sonakowska, M. Kszuk-Jendrysik a M. M. Rost-Roszkowska. 2016. "Ultrastructural changes in the midgut epithelium of *Hypsibius dujardini* (Doyere, 1840) (Tardigrada, Eutardigrada, Hypsibiidae) in relation to oogenesis." Zoological Journal of the Linnean Society 178 (4): 897-906. <https://doi.org/10.1111/zoj.12467>.
27. Jørgensen, A., R.M. Kristensen a N. Møbjerg. 2018. "Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada." In: Schill RO, editor. Water Bears: The Biology of Tardigrades. Zoological Monographs 2. Springer Nature Switzerland. s. 95–107. ISBN 9783319957029. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_3.
28. Kaczmarek, L., T. Bartylak, D. Stec, A. Kulpa, M. Kepel, A. Kepel a M. Roszkowska. 2020. "Revisiting the genus *Mesobiotus* Vecchi et al., 2016 (Eutardigrada, Macrobiotidae) - remarks, updated dichotomous key and an integrative description of new species from Madagascar." Zoologischer Anzeiger 287: 121-146. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2020.05.003>.
29. Kaczmarek, L., M. Roszkowska, I. Poprawa, K. Janelt, H. Kmita, M. Gawlak, E. Fialkowska a M. Mioduchowska. 2020. "Integrative description of bisexual *Paramacrobiotus experimentalis* sp. nov. (Macrobiotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis." Molecular Phylogenetics and Evolution 145. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106730>.
30. Kayastha, P., D. Stec, L. Slugocki, M. Gawlak, M. Mioduchowska a L. Kaczmarek. 2023. "Integrative taxonomy reveals new, widely distributed tardigrade species of the genus *Paramacrobiotus* (Eutardigrada: Macrobiotidae)." Scientific Reports 13 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28714-w>.
31. Klouda, P. 2016. "Moderní analytické metody." Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko. ISBN 978-80-86369-22-8. s. 90-91.
32. Kosztyła, P., D. Stec, W. Morek, P. Gasiorek, K. Zawierucha, K. Michno, K. Ufir, D. Malek, K. Hlebowicz, A. Laska, M. Dudziak, M. Frohme, Z. M. Prokop, L. Kaczmarek a L. Michalczyk. 2016. "Experimental taxonomy confirms the environmental stability of morphometric traits in a taxonomically challenging

- group of microinvertebrates." *Zoological Journal of the Linnean Society* 178 (4): 765-775. <https://doi.org/10.1111/zoj.12409>.
33. Kress, W. J. a D. L. Erickson. 2008. "DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (8): 2761-2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>.
 34. Kumagai, H., Kondo K. a Kunieda T. 2022. "Application of CRISPR/Cas9 system and the preferred no-indel end-joining repair in tardigrades. " *Biochemical and Biophysical Research Communications* 623: 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.060>.
 35. Lemloh, M. L., F. Brümmer a R. O. Schill. 2011. "Life-history traits of the bisexual tardigrades *Paramacrobiotus tonollii* and *Macrobiotus sapiens*." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49: 58-61. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00599.x>.
 36. Massa, E., L. Rebecchi a R. Guidetti. 2023. "Effects of synthetic acid rain and organic and inorganic acids on survival and CaCO₃ piercing stylets in tardigrades." *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological and Integrative Physiology* 339 (6): 578-589. <https://doi.org/10.1002/jez.2701>.
 37. Massa, E., R. Guidetti, M. Cesari, L. Rebecchi a K. I. Jönsson. 2021. "Tardigrades of Kristianstads Vattenrike Biosphere Reserve with description of four new species from Sweden." *Scientific Reports* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83627-w>.
 38. McFatter, M. M., H. A. Meyer a J. G. Hinton. 2007. "Nearctic freshwater tardigrades: a review." *Journal of Limnology* 66: 84-89. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2007.s1.84>.
 39. McNuff, R. 2018. "Laboratory Culture of *Hypsibius exemplaris*." *Cold Spring Harbor protocols* 11. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102319>
 40. Momeni, S., J. Fuentes-González a J. Pienaar. 2022. "How to culture limnoterrestrial heterotardigrades." *Invertebrate Biology* 141 (1). <https://doi.org/10.1111/ivb.12360>. <Go to ISI>://WOS:000746477200001.
 41. Morek, W., B. Blagden, R. M. Kristensen a L. Michalczyk. 2020. "The analysis of inter- and intrapopulation variability of *Milnesium eurystomum* Maucci,

- 1991 reveals high genetic divergence and a novel type of ontogenetic variation in the order Apochela." *Systematics and Biodiversity* 18 (6): 614-632. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1771469>.
42. Morek, W., P. Gasiorek, D. Stec, B. Blagden a L. Michalczyk. 2016. "Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium* Doyere, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela)." *Contributions to Zoology* 85 (2): 173-200. <https://doi.org/10.1163/18759866-08502003>.
43. Møbjerg, N., A. Jørgensen a R. C. Neves. 2018. "Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada." In: Schill RO, editor. *Water Bears: The Biology of Tardigrades. Zoological Monographs* 2. Springer Nature Switzerland. s. 57-63. ISBN 9783319957029. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_2.
44. Møbjerg, N. a R. C. Neves. 2021. "New insights into survival strategies of tardigrades." *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 254. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110890>.
45. Nelson, D. R. 2002. "Current status of the Tardigrada: Evolution and ecology." *Integrative and Comparative Biology* 42 (3): 652-659. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.652>.
46. Nelson, D. R., R. Guidetti a L. Rebecchi. 2010. "Tardigrada." *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, 3rd Edition*: 455-484. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374855-3.00014-5>.
47. Nelson, D. R., R. Guidetti a L. Rebecchi. 2015. "Phylum Tardigrada." Online. In: Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates*. Elsevier, s. 363-369. ISBN 9780123850263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6>.
48. Neves, R. C., L. K. B. Hvidepil, T. L. Sorensen-Hygum, R. M. Stuart a N. Møbjerg. 2020. "Thermotolerance experiments on active and desiccated states of *Ramazzottius varieornatus* emphasize that tardigrades are sensitive to high temperatures." *Scientific Reports* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56965-z>.
49. Němcová, I., L. Čermáková, P. Rychlovský. 1997. "Spektrometrické analytické metody I." *Univerzita Karlova, vydavatelství Karolinum*. s. 147-151.

50. Nirody, J. A., L. A. Duran, D. Johnston a D. J. Cohen. 2021. "Tardigrades exhibit robust interlimb coordination across walking speeds and terrains." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (35). <https://doi.org/10.1073/pnas.2107289118>.
51. Pilato, G. a M. G. Binda. 2010. "Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification." *Zootaxa* (2404): 1-54. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2404.1.1>.
52. Reuner, A., S. Hengherr, F. Brümmer a R. O. Schill. 2010. "Comparative studies on storage cells in tardigrades during starvation and anhydrobiosis." *Current Zoology* 56 (2): 259-263. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.2.259>.
53. Roszkowska, M., D. Wojciechowska, H. Kmita, S. Cerbin, M. K. Dziuba, E. Fialkowska, R. Sobkowiak, W. Szydło a L. Kaczmarek. 2021. "Tips and tricks how to culture water bears: simple protocols for culturing eutardigrades (Tardigrada) under laboratory conditions." *European Zoological Journal* 88 (1): 449-465. <https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1881631>.
54. Schill, R. O. 2013. "Life-history traits in the tardigrade species *Paramacrobiotus kenianus* and *Paramacrobiotus palaui*." *Journal of Limnology* 72: 160-165. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e20>.
55. Schill, R. O. a G. B. Fritz. 2008. "Desiccation tolerance in embryonic stages of the tardigrade." *Journal of Zoology* 276 (1): 103-107. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00474.x>.
56. Sieger, J., F. Brümmer, H. Ahn, G. Lee, S. Kim a R. O. Schill. 2022. "Reduced ageing in the frozen state in the tardigrade *Milnesium inceptum* (Eutardigrada: Apochela)." *Journal of Zoology* 318 (4): 253-259. <https://doi.org/10.1111/jzo.13018>.
57. Stec, D., M. Vecchi, S. Calhim a L. Michalczyk. 2021. "New multilocus phylogeny reorganises the family Macrobiotidae (Eutardigrada) and unveils complex morphological evolution of the *Macrobiotus hufelandi* group." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 160. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106987>.
58. Stiernagle T. 2006. "Maintenance of *C. elegans*." *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*. doi/10.1895/wormbook.1.101.1.

59. Stoeckle, M. 2003. "Taxonomy, DNA, and the bar code of life." *Bioscience* 53 (9): 796-797. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0796:tdatbc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0796:tdatbc]2.0.co;2).
60. Stone, J. a T. Vasanthan. 2020. "Life History Traits for the Freshwater Tardigrade Species *Hypsibius Exemplaris* Reared under Laboratory Conditions." *Journal of Wildlife and Biodiversity* 4 (2):65-72. <https://doi.org/10.22120/jwb.2020.96855.1037>.
61. Sugiura, K. a M. Matsumoto. 2021. "Sexual reproductive behaviours of tardigrades: a review." *Invertebrate Reproduction & Development* 65 (4): 279-287. <https://doi.org/10.1080/07924259.2021.1990142>.
62. Sugiura, K., H. Minato, M. Matsumoto a A. C. Suzuki. 2020. "<i>Milnesium</i> (Tardigrada: Apochela) in Japan: The First Confirmed Record of <i>Milnesium tardigradum</i> s.s. and Description of <i>Milnesium pacificum</i> sp. nov." *Zoological Science* 37 (5): 476-495. <https://doi.org/10.2108/zs190154>.
63. Sugiura, K., H. Minato, A. C. Suzuki, K. Arakawa, T. Kunieda a M. Matsumoto. 2019. "Comparison of Sexual Reproductive Behaviors in Two Species of Macrobiotidae (Tardigrada: Eutardigrada)." *Zoological Science* 36 (2): 120-127. <https://doi.org/10.2108/zs180103>.
64. Suma, H. R., P. Swathi a E. Sandeep M. 2020. "Naturally occurring fluorescence protects the eutardigrade *Paramacrobiotus* sp. from ultraviolet radiation." *Biology letters* 16: 1-6. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0391>.
65. Suriya, J., M. Krishnan, S. Bharathiraja, V. Sekar a V. Sachithanandam. 2020. "Implications and Utility of DNA Barcoding." In: Trivedi, S., Rehman, H., Saggi, S., Panneerselvam, C., Ghosh, S. (eds) *DNA Barcoding and Molecular Phylogeny*. Springer, Cham.: 3-22. ISBN 9783030500757. https://doi.org/10.1007/978-3-030-50075-7_1
66. Suzuki, A. C. 2003. "Life history of <i>Milnesium tardigradum</i> Doyere (Tardigrada) under a rearing environment." *Zoological Science* 20 (1): 49-57. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.49>.
67. Suzuki, A. C., K. Sugiura, M. Tsujimoto, R. Nakai, S. J. McInnes, H. Kagoshima a S. Imura. 2023. "A New Species of Bisexual <i>Milnesium</i> (Eutardigrada: Apochela) Having Aberrant Claws From Innhovde, Dronning Maud Land, East

- Antarctica." *Zoological Science* 40 (3): 246-261.
<https://doi.org/10.2108/zs220085>.
68. Tumanov, D. V. 2020. "Integrative redescription of *Hypsibius pallidoides* Pilato *et al.*, 2011 (Eutardigrada: Hypsibioidea) with the erection of a new genus and discussion on the phylogeny of Hypsibiidae." *European Journal of Taxonomy* 681: 1-37. <https://doi.org/10.5852/ejt.2020.681>.
69. Vlasov, A. V., N. L. Maliar, S. V. Bazhenov, E. I. Nikelshparg, N. A. Brazhe, A. D. Vlasova, S. D. Osipov, V. V. Sudarev, Y. L. Ryzhykau, A. O. Bogorodskiy, E. V. Zinovev, A. V. Rogachev, I. V. Manukhov, V. I. Borshchevskiy, A. I. Kuklin, J. Pokorny, O. Sosnovtseva, G. V. Maksimov a V. I. Gordeliy. 2020. "Raman Scattering: From Structural Biology to Medical Applications." *Crystals* 10 (1). <https://doi.org/10.3390/cryst10010038>.
70. Wojciechowska, D., A. Karachitos, M. Roszkowska, W. Rzezniczak, R. Sobkowiak, L. Kaczmarek, J. Z. Kosicki a H. Kmita. 2021. "Mitochondrial alternative oxidase contributes to successful tardigrade anhydrobiosis." *Frontiers in Zoology* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00400-5>.
71. Yoshida, Y., G. Koutsovoulos, D.R. Laetsch, L. Stevens a S. Kumar. 2017. "Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*." *PLOS Biology* 15 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002266>
72. Yoshida, Y., K. Sugiura, M. Tomita, M. Matsumoto a K. Arakawa. 2019. "Comparison of the transcriptomes of two tardigrades with different hatching coordination." *Bmc Developmental Biology* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12861-019-0205-9>.

8 Přílohy

8.A Publikované kultivační metody – detailní přehled

8.A.A Kultivační metody pro rod *Hypsibius*

McNuff, 2018 kultivoval *Hys. exemplaris* v Erlenmayerových baňkách v Chalkleyově médiu s přidavkem půdního extraktu ve sterilních podmínkách. Chalkleyovo medium se připravuje ze tří zásobních roztoků a půdního extraktu (tab. 8). Půdní extrakt byl získán smícháním jednoho dílu vysušené zeminy ideálně obohacené o humus se dvěma díly kohoutkové vody. Extrakt byl autoklávován a ponechán několik dní odstát. Suspenze želvušek (1 ml) a řasy *Chlorococum* (3-5 ml) byla přidána k 150 ml média v 250 ml Erlenmeyrově baňce. Baňka byla zakryta potravinářskou fólií nebo parafilmem, čímž se zabránilo kontaminaci sporamai hub nebo roztoči. Kultivace probíhala při teplotě 10-20 °C při fotoperiodě 14 hodin světla/10 hodin tmy, nebo při nepřetržité tmě. Výměna média byla prováděna každých 4-6 týdnů. V podstatě stejný protokol použil i Gabriel a kol., 2007 a Nirody a kol., 2021, který ale volí teplotu mezi 20 až 25 °C a světelný cyklus 16 hodin světlo/8 hodin tma.

Tabulka 8. Příprava kultivačního média podle McNuffa, 2018.

Složka	Zásobní roztok	Objem [ml]
Chalkleyovo médium	NaCl – 2 g na 100 ml dH ₂ O	5
	KCl – 0,08 g na 100 ml dH ₂ O	5
	CaCl ₂ – 0,12 g na 100 ml dH ₂ O	5
Půdní extrakt		20

Pozn. Pro přípravu konečného média smíchali 5 ml každého zásobního roztoku s 20 ml půdního extraktu a doplnili dH₂O na 1 l.

Gabriel a Goldstein, 2007 pěstovali *Hys. exemplaris* v 60 mm skleněných Petriho miskách s minerální vodou Crystal Geysler nebo Deer Park při pokojové teplotě. Každých 10 dní se měnilo médium a přidávala řasa *Chlorococum* v poměru 1:4 s minerální vodou. Světelné podmínky publikace neuvádí.

Arakawa, Yoshida a Tomita, 2016 ke kultivaci používali Petriho misky, s 2% agarem převrstveným minerální vodou Volvic. Kultivace probíhala při 18 °C

za konstantní tmy. Jako potrava sloužila řasa *Chlorella vulgaris*. Kultury byly každých 7-8 dní přeneseny na novou misku.

Agar (1,5%), tentokrát v 24jamkových plastových deskách použil ke kultivaci také Hyra a kol., 2016. Médiem byla směs destilované vody s minerální vodou Żywiec Zdrój v poměru 1:1. Kultivace probíhala při teplotě 16 °C. Kultury byly krmeny řasou *Chlorococcum sp.*

Úspěšně byl také kultivován druh *Hys. pallidoides*. Kultivace probíhala ve směsi destilované a filtrované kohoutkové vody v poměru 3:1 na Petriho miskách s poškrábaným dnem při 16 °C. Světelné podmínky nejsou v práci uvedeny (Tumanov a kol., 2020).

Při kultivaci *Hys. exemplaris* dle Kosztyly a kol., 2016 bylo poškrábáno dno Petriho misky jemným brusným papírem, aby se usnadnil pohyb želvušek. Kultivační médium bylo vytvořeno z minerální vody Żywiec Zdrój v poměru 1:3 s dvakrát destilovanou vodou a se sladkovodními řasami *Chlorococcum sp.* a *Chlorella sp.* v poměru 1:1. Kultury byly uchovávány při 16 °C v temném prostředí. Médium bylo měněno jednou za dva týdny.

Další možností je kultivace *Hys. exemplaris* v 250 ml průhledných plastových lahvích s 130 ml kultivačního média, které je složeno z destilované vody a směsi dvou druhů řas *Chlorella sp.* a *Chlorococcum sp.* Médium bylo měněno každé dva měsíce. Při výskytu více než 2000 jedinců na láhev byla část kultury separována a přenesena do nové nádoby, čímž se zamezilo přemnožení želvušek a následné vyšší úmrtnosti (Erdmann a kol., 2017). Tepelné a světelné podmínky nebyly v publikaci uvedeny.

Další metodou kultivace je uchovávání *Hys. exemplaris* v plastových miskách naplněných minerální vodou Volvic při 21 °C. Želvušky byly krmeny řasami *Chlorococcum sp.* Výměna média a krmiva byla prováděna jednou za měsíc (Gross, Bährle a Mayer, 2018).

Jinou možností je kultivovat *Hys. exemplaris* na 3,5 cm Petriho miskách pokrytých 1,2% bactoagarem, který byl vytvořen smísením agaru s minerální vodou Volvic. Potravou byla řasa *Chlorella vulgaris*. Kultura byla uchovávána za tmy při 25 °C a byla přenesena na čistou misku každých sedm dní (Yoshida a kol., 2019).

V následující metodě kultivace *Hys. exemplaris* bylo využito Petriho misek o průměru 55 mm s poškrábaným dnem. Dále byla přidána tenká vrstva kultivačního média, které bylo vytvořeno smícháním dvakrát destilované vody s minerální vodou Żywiec Zdrój v poměru 3:1. Podmínky byly následující: fotoperioda 12h světlo/12h tma, 20 °C, relativní vlhkost 50 %. Misky byly čištěny jednou týdně. Následně byly krmeny řasou *Chlorella vulgaris* (Roszkowska a kol., 2021).

Dalším způsobem kultivace *Hys. exemplaris* je poškrábání dna 90 mm plastových Petriho miskách. Dále bylo na misku přidáno 10 ml Chalkeyova média (0,004 g/l KCl, 0,1 g/l NaCl, 0,006 g/l CaCl₂ a 20 ml/l půdního extraktu). Půdní extrakt byl autoklávován s vodou v poměru 1:2. Po usazení extraktu byl přefiltrován a smíchán s 50 ml minerální vody Rajec. Želvušky byly krmeny každých 7-14 dní řasami *Chlorococcum sp.* v poměru s želvuškami 1:4 (Floriančíčová a kol., 2023).

Další metodou kultivace *Hys. exemplaris* je nanesení želvušek na 1,2% agarovou desku. Deska byla následně doplněna vodou Elix Advantege 3 UV, Milipore, s přídatkem *Chlorelly*. Kultura byla udržována při 18 °C. Médium s potravou bylo měněno jednou týdně. Jednou do měsíce byla kultura přenesena na novou desku (Kumagai a kol., 2022). Světelné podmínky protokol neuvádí.

Jiným způsobem je kultivace *Hys. exemplaris* na 1,2% agaru potaženém na 8 cm Petriho miskách. Jako kultivační médium byla použita destilovaná voda při pH 8. Želvušky byly krmeny *Chlorococcum sp.* a byly udržovány při 14 °C s fotoperiodou 12 hodin světlo a 12 hodin tma. (Massa, Rebecchi, a Guidetti, 2023). Záznamy o čištění nebyly v publikaci uvedeny.

8.A.B Kultivační metody pro rod *Ramazzottius*

Horikawa a kol., 2008, použili 35 mm Petriho misky, pokryté 2 ml 1,5% agarového gelu a destilovanou vodou jako kultivačním médiem. Misky byly uchovávány zakryté ve vlhké komoře za konstantní tmy při 25 °C. Každých 3-6 dní byly želvušky přeneseny na novou misku a nakrmeny 30 µl řasy (Horikawa a kol., 2008).

Hashimoto a kol., 2016 použili 2% agar. Voda, sloužící jako kultivační médium byla ošetřena chlornanem. Kultivace probíhala při 22 °C, světelné podmínky nejsou v protokolu uvedeny (Hashimoto a kol., 2016).

Yoshida a kol., 2017 použili 2% bactoagar převrstvený minerální vodou Volvic. Kultura byla udržována ve tmě při 22 °C. Po týdnu byly želvušky přeneseny na novou misku (Yoshida a kol., 2017).

Netradiční kultivační metodou, která se nedá nazývat kultivací v pravém smyslu slova je zamražení vzorku (včetně listů, mechu, rostlinného odpadu atd.) a skladování při -20 °C. Po rozmrazení byl vzorek naředěn v destilované vodě Millipore Milli-Q a uchován v chladničce při 5 °C. Živiny *Ram. varieornatus* získával z prostředí, se kterým byl nasbírán (Neves a kol., 2020).

8.A.C Kultivační metody pro rod *Milnesium*

V protokolu dle Suzukiho a kol., 2003 byl *Mil. tardigradum* kultivován v plastových miskách o průměrech 3 cm a 6 cm, které byly potaženy 2% agarem v roztoku KCM, gel byl převrstven 2-3 mm vody (Milli-Q, Millipore). Jako potrava pro želvušky byli využiti vířníci *L. inermis*. S úpravou podmínek se přišlo o 20 let později, kdy kultivace probíhala při 4 °C nebo 10 °C a fotoperiodě 16h světlo a 8h tma (Suzuki a kol., 2023).

Při kultivaci *Mil. tardigradum* dle Horikawy a kol., 2006 byly využity plastové misky, které byly potaženy 1,5% agarem. Kultivačním médiem byla voda, do které byli přidáváni bdelloidní vířníci, jenž sloužili jako potrava. Kultivační podmínky nebyly v protokolu uvedeny.

Dalším kultivačním protokolem je chování *Mil. tardigradum*, *Mil. tonolli* a *Mil. richtersi* na miskách pokrytých 3% agarem, v tenké vrstvě vody. Potravou byli bdelloidní vířníci *P. citrina*, kteří byli pěstováni na zelené řase *Chlorogonium elongatum* (Hengherr a kol., 2008).

V protokolu dle Schilla a Fritze, 2008 byl *Mil. tardigradum* kultivován v plastových kultivačních nádobách, které byly potaženy 4 mm 3% agaru. Substrát byl převrstven 3 mm minerální vody Volvic. Potrava *P. citrina*, která byla pěstována na zelené řase *Chlorogonium sp.*, byla podávána dvakrát týdně. Kultury byly uchovávány při 20 °C při 12 hodinách světla a 12 hodinách tmy. Další metodou je kultivování *Mil. tardigradum* v Petriho miskách o průměru 9,4 cm potažených 3% agarem a překrytých vrstvou minerální vody Volvic. Potravicí byli vířníci *P. citrina* a hlístice *Panagrellus sp.*, juvenilní jedinci byli krmeni i zelenou řasou *Chlorogonium*

elongatum. Kultivace probíhala při 18-22 °C ve světelném cyklu 12 hodin světla a 12 hodin tmy (Förster a kol., 2009; Reuner a kol., 2010).

Jinou metodou je kultivace *Mil. alpigenum* na Petriho miskách s poškrábaným dnem a kultivačním médiem minerální vodou Żywiec Zdrój smíchanou s dvakrát destilovanou vodou v poměru 1:3. Jako potrava byli využiti vířníci *L. intermis*, ke kterým byla přidávána směs z řas, aby se zachovala delší životnost vířníků. Podmínky pro kultivaci byly 16 °C při úplné tmě. Médium bylo měněno každé dva týdny (Kosztyla a kol., 2016). Z tohoto protokolu vychází i Morek a kol., 2020, kteří krmili *Mil. eurytomum* nejenom vířníky, ale i želvuškami *Hys. exemplaris* a kultivovali je při 10 °C.

Morek a kol., 2016 kultivovali *Mil. variefidum* na 24jamkových deskách, přičemž v každé jamce se nacházelo 165 µl 2% agaru a 1 ml kultivačního média (minerální voda Żywiec Zdrój s dvakrát destilovanou vodou v poměru 3:1). Do média byli přidáni vířníci *L. inermis*, kteří sloužili jako potrava a řasy *Chlorococcum sp.* a *Chlorella sp.* v poměru 1:1. Kultivace probíhala při 16 °C za tmy.

Dalším způsobem kultivace *Mil. pacifikum* a *Mil. tardigradum* je využití plastových misek o průměru 3,2 cm, které byly potaženy 1,2% agarem a jako médium byla využita minerální voda Volvic. Potravou byli vířníci *L. inermis*. Kultivace probíhala při 20 °C, světelné podmínky nebyly v protokolu definovány. Výměna média probíhala každý den, misky byly měněny po týdnu (Sugiura a kol., 2020).

Metodou kultivace *Mil. inceptum* dle Roszkowska a kol., 2021, je využití 35 mm, 55 mm nebo 90 mm Petriho misek s poškrábaným dnem smirkovým papírem. Kultivačním médiem byla směs minerální vody Żywiec Zdrój s dvakrát destilovanou vodou v poměru 1:3, krmivem pro želvušky byli vířníci a hlístice. Kultivace probíhala při 17 °C, 40% relativní vlhkosti a za stálé tmy.

Wojciechowska a kol., 2021 a Erdmann a kol., 2021 využívali ke kultivaci *Mil. inceptum* Petriho misky s průměrem 5,5 cm a s poškrábaným dnem. Kultivačním médiem byla směs minerální vody Żywiec Zdrój a dvakrát destilované vody v poměru 1:3. Jako potrava byli využiti vířníci *L. inermis* a hlístice *C. elegans*. Kultivace probíhala při 18 °C za konstantní tmy. Médium bylo měněno každý týden.

Další možností je kultivace *Mil. inceptum* na 3% agaru s minerální vodou Volvic, jako kultivačním médiem. Želvušky byly krmeny vířníky *P. citrina*, čerstvě vylíhnutí jedinci byli krmeni *Chlorogonium elongatum* (Sieger a kol., 2022). Další podmínky pro kultivaci nebyly uvedeny.

8.A.D Kultivační metody pro rod *Paramacrobiotus*

Pro kultivaci *Pam. fairbanksi* byly využity Petriho misky (d=15 cm) pokryté 0,6 ml 1,2% bactoagarem. Kultivačním médiem byla minerální voda San Benedetto, do které byly přidány fyloidy mechu a hlístice *Pristionchus iheritierii*, *Panagrolaimus rigidus* nebo *C. elegans*, které sloužily jako potrava. Podmínky kultivace byly 14 °C nebo 20 °C při fotoperiodě 12 hodin světlo a 12 hodin tmy (Altiero a Rebecchi, 2001).

Ke kultivaci *Pam. richtersi* je možné využít skleněné Petriho misky (d=7 cm), které jsou potaženy přibližně 0,5 cm vrstvou 2% agaru a následně tenkou vrstvou kohoutkové vody. Do misek byl přidány částice půdy, které byly zbaveny veškeré fauny vyvařením částic ve vodě po dobu tří hodin. *Pam. richtersi* byl krmen hlísticemi *Pelodera teres*. Petriho misky byly uzavřeny a zafilmovány, aby nedocházelo k odpařování, uchovávány byly při 16 °C za konstantní tmy (Hohberg, 2006).

Další možnou kultivací *Pam. tonollii* a *Pam. richtersi* je chování želvušek na 3% agaru převrstveným tenkou vrstvou vody. Jako potrava je možné využít vířníky *P. citrina*, kteří byli vypěstováni na zelené řase *Chlorogonium elongatum* (Hengherr a kol., 2008). Podmínky pro kultivaci nebyly v protokolu uvedeny.

Jednou z možností pro kultivaci *Pam. fairbanksi* je uchovávání v Petriho miskách o průměru 1,5 cm pokrytých 2% bactoagarem. Kultivačním médiem byla minerální voda (0,2 ml; pH 7,68, 46 mg L⁻¹ Ca²⁺), potravou bakteriofágní hlístice, které byly přidávány při výměně média, které probíhalo každé dva dny. Kultury byly uchovávány při 14 °C a při fotoperiodě 12 hodin světla/12 hodin tma (Altiero, Bertolani a Rebecchi, 2010).

Dalším způsobem kultivace *Pam. tonollii* je využití Petriho misek potažených 3% agarem, s minerální vodou Volvic, která sloužila jako kultivační médium. Potravou pro *Paramacrobiota* byli vířníci *P. citrina* a hlístice *Panagrellus* sp. Tepelné podmínky

pro kultivaci byly 20 ± 1 °C, světelné podmínky byly 12 hodin světla a 12 hodin tmy (Reuner a kol., 2010).

Kultivace *Pam. tonollii* dle Lemloha, Brümmera a Schilla, 2011 probíhala v multijamkových deskách pokrytých agarem. Jako kultivační médium byla využita minerální voda Volvic, potravou byli vířníci *P. citrina* a řasy *Chlorogonium elongatum*. Podmínky pro kultivaci byly 20 °C při 12 hodinách světla a 12 hodinách tmy.

V protokolu dle Schilla a kol., 2013 byly *Pam. palaui* a *Pam. kenianus* kultivovány v plastových miskách potažených 3% agarem a 3 mm vysokou vrstvou minerální vody Volvic. Vířníci *P. citrina* byli do kultury přidáváni dvakrát týdně. Kultury byly udržovány při 20 °C při fotoperiodě 12 hodina světla a 12 hodin tmy (Schill, 2013).

V následujícím protokolu na kultivaci *Pam. fairbanksi* se používali plastové Petriho misky s poškrábaným dnem. Kultivačním médiem byla směs minerální vody Żywiec Zdrój s dvakrát destilovanou vodou v poměru 1:3. Do média byla přidána potrava stávající se z řas *Chlorococcum sp.* a *Chlorella sp.* v poměru 1:1 a z vířníků *L. inermis*. Kultivace probíhala při 16 °C za stálé tmy. Médium bylo měněno každé dva týdny (Kosztyla a kol., 2016).

V protokolu dle Sugiury a kol., 2019 byl *Pam. sp.* chován na 90 mm plastových miskách potažených 1,2% agarem převrstveným minerální vodou Volvic. Do média byli přidáváni vířníci *L. inermis* a zelené řasy *C. vulgaris*. Kultivace probíhala při 20 °C za konstantní tmy. Médium bylo měněno dvakrát do týdne, jedinci byli každý měsíc přesazeni na novou misku.

Kaczmarek a kol., 2020b kultivují *Pam. experimentalis* v Petriho miskách s poškrábaným dnem, kultivačním médiem byla směs minerální vody Żywiec Zdrój a dvakrát destilované vody v poměru 1:3. Kultivace probíhala při 20 °C, potravou byly 2 ml kultury vířníků *L. inermis*. Kultivační médium bylo měněno jednou za týden.

Další protokol pro kultivaci *Pam. sp.* využívá 25 mm Petriho misky pokryté 2% agarem. Kultivačním médiem byl roztok KCM složen z 7 mg KCl, 8 mg CaCl₂ a 8 mg MgSO₄ · 7H₂O rozpuštěných v 1 litru vody. *Pam. sp.* byl uchováván při 20 °C, za konstantní tmy, krmem byl hlísticemi *C. elegans* (Suma a kol., 2020).

Dalším způsobem je kultivace *Pam. sp.* na 1,2% agarových plotnách převrstvených tenkou vrstvou vody, do které se přidávala směs vířníků *L. inermis* a řas *Chlorella vulgaris*. Kultivační podmínky byly při 22 °C (Hara a kol., 2021).

Dalším způsobem kultivace *Pam. gadabouti sp. nov.* je v plastových miskách s poškrábaným dnem a kultivačním médiem, vniklým smícháním minerální vody Zywiec Zdroj s dvakrát destilovanou vodou v poměru 1:3. Jednou týdně byly do kultury přidávány 2 ml vířníků *L. inermis*. Kultura byla uchovávána při 18 °C, médium bylo měněno každý týden (Kayastha a kol., 2023).

8.A.E Přehled publikovaných kultivačních metod

Tabulka 9. Přehled publikovaných kultivačních metod. *Hys.* – *Hypsibius*, *Ram.* – *Ramazzottius*, *Mil.* – *Milnesium*, *Pam.* –

Paramacrobotus, *Echi* – *Echiniscus*, *Pse.* – *Pseudoechiniscus*, *Vir.* – *Viridiscus*, *C.* – *Caenorhabditis*, *L.* – *Lecane*, *P.* – *Philodina*.

Citace	Druh	Substrát	Kultivační médium	Potrava	Tep- lota [°C]	Světlo	Nádoba	Výměna média
Gabriel a kol., 2007	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Chalkeyovo médium s 2% půdním extraktem	<i>Chlorococcum sp.</i>	10 - 18	14S/10T	Erlenmeyerova baňka (250 ml)	ND
Gabriel a Goldstein, 2007	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Crystal Geyser/ Deer Park	<i>Chlorococcum sp.</i>	Poko- jová	ND	Skleněná Petriho miska (60 mm)	10 dní
Arakawa, Yoshida a Tomita, 2016	<i>Hys. exemplaris</i>	2% agar	Volvic	<i>Chlorella vulgaris</i>	18	Tma	Petriho miska	7-8 dní
Hyra a kol., 2016	<i>Hys. exemplaris</i>	1,5% agar	Žywiec Zdrój v poměru 1:1 s dH ₂ O	<i>Chlorococcum sp.</i>	16	ND	24jamková plastová deska	ND
Kosztyla a kol., 2016	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Žywiec Zdrój v poměru 1:3 s ddH ₂ O	<i>Chlorococcum sp.</i> a <i>Chlorella sp.</i> v poměru 1:1	16	Tma	Petriho miska s poškrábaným dnem	2 týdny
Erdmann a kol., 2017	<i>Hys. exemplaris</i>	-	dH ₂ O	<i>Chlorella sp.</i> a <i>Chlorococcum sp.</i>	ND	ND	Průhledná plastová láhev (250 ml)	2 měsíce
Gross, Bährle a Mayer, 2018	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Volvic	<i>Chlorococcum sp.</i>	21	ND	Plastová miska	Měsíc
McNuff, 2018	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Chalkeyovo médium s půdním extraktem	<i>Chlorococcum sp.</i>	10 - 20	14S/10T	Erlenmeyerová baňka (250 ml)	4-6 týdnů
Yoshida a kol., 2019	<i>Hys. exemplaris</i>	1,2% agar	Volvic	<i>Chlorella vulgaris</i>	25	Tma	Petriho misky (35 mm)	7 dní
Nirody a kol., 2021	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Chalkeyovo médium s 2% půdním extraktem	<i>Chlorococcum sp.</i>	20 - 25	16S/8T	Erlenmeyerová baňka (250 ml)	ND

Citace	Druh	Substrát	Kultivační médium	Potrava	Tep- lota [°C]	Světlo	Nádoba	Výměna mé- dia
Roszkowska a kol., 2021	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Żywiec Zdrój v poměru 1:3 s ddH ₂ O	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	12S/12T	Petriho miska s poškábaným dnem (55 mm)	týdně
Kumagai a kol., 2022	<i>Hys. exemplaris</i>	1,2% agar	Elix Adventege 3 UV, Milipore	<i>Chlorella</i>	18	ND	Deska	týdně
Massa, Rebecchi a Guidetti, 2023	<i>Hys. exemplaris</i>	1,2% agar	dH ₂ O, pH=8	<i>Chlorococcum sp.</i>	14	12S/12T	Petriho miska (80 mm)	ND
Florianciová a kol., 2023	<i>Hys. exemplaris</i>	-	Chalkeyova média s půdním extraktem	<i>Chlorococcum sp.</i>	ND	ND	Petriho miska s poškábaným dnem (90 mm)	ND
Tumanov, 2020	<i>Hys. pallidoides</i>	-	směs dH ₂ O a filtrované kohoutkové H ₂ O v poměru 3:1	<i>Chlorella sp.</i>	16	ND	Petriho miska s poškábaným dnem	ND
Horikawa a kol., 2008	<i>Ram. varieornatus</i>	1,5% agar	dH ₂ O	<i>Chlorella vulgaris</i>	25	Tma	Petriho miska (35 mm)	Přenos na novou desku 3-6 dní
Hashimoto a kol., 2016	<i>Ram. varieornatus</i>	2% agar	H ₂ O ošetřena chlornanem	<i>Chlorella vulgaris</i>	22	ND	Agarová miska	ND
Yoshida a kol., 2017	<i>Ram. varieornatus</i>	2% agar	Volvic	<i>Chlorella vulgaris</i>	22	Tma	Agarová miska	Přenos na novou desku 3-6 dní
Suzuki, 2003	<i>Mil. tardigradum</i>	2% agar v KCM	H ₂ O Milli-Q, Millipore	<i>L. inermis</i>	ND	ND	Plastová miska (30 mm/60 mm)	ND
Horikawa a kol., 2006	<i>Mil. tardigradum</i>	1,5% agar	H ₂ O	<i>L. inermis</i>	ND	ND	Plastová miska (24 mm)	ND
Hengherr a kol., 2008	<i>Mil. tardigradum, tonolli, richtersi</i>	3% agar	H ₂ O	<i>P. citrina</i> a <i>Chlorogonium elongatum</i>	ND	ND	Plastová miska	ND
Schill a Fritz, 2008	<i>Mil. tardigradum</i>	3% agar	Volvic	<i>P. citrina</i> (2x týdně)	20	12S/12T	Kultivační plastová miska	ND
Förster a kol., 2009; Reuner a kol., 2010	<i>Mil. tardigradum</i>	3% agar	Volvic	<i>P. citrina</i> a <i>Panagrellus sp.</i>	20+-2	12S/12T	Petriho miska (94 mm)	ND

Citace	Druh	Substrát	Kultivační médium	Potrava	Tep- lota [°C]	Světlo	Nádoba	Výměna mé- dia
Morek a kol., 2016	<i>Mil. variefidum</i>	2% agar	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	<i>L. inermis</i> , <i>Chlorococcum sp.</i> a <i>Chlorella sp.</i> , 1 : 1	16	Tma	24jamkové deska	ND
Kosztyla a kol., 2016	<i>Mil. alpigenum</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	<i>L. inermis</i>	16	Tma	Petriho miska s poškrábaným dnem	Dva týdny
Sugiura a kol., 2020	<i>Mil. pacificum</i> , <i>tardigradum</i>	1,2% agar	Volvic	<i>L. inermis</i>	20	ND	Plastová miska (32 mm)	médium denně, nádoba týdně
Morek a kol., 2020	<i>Mil. eurystomum</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	<i>L. inermis</i> , <i>Hys. exemplaris</i>	10	ND	ND	ND
Roszkowska a kol., 2021	<i>Mil. inceptum</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	vířníci a hlístice	17	Tma	Petriho miska (35 mm/55 mm/90 mm)	ND
Wojciechowska a kol. 2021; Erdmann a kol., 2021	<i>Mil. inceptum</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	<i>C. elegans</i> a <i>L. inermis</i>	18	Tma	Petriho miska (55 mm)	Týdně
Sieger a kol., 2022	<i>Mil. inceptum</i>	3% agar	Volvic	<i>P. citrina</i> , čerstvě vylíhlé tardigrady byly krmeny i <i>Chlorogonium elongatum</i>	ND	ND	ND	ND
Suzuki a kol., 2023	<i>Mil. tardigradum</i>	2% agar v KCM	dH ₂ O Milli- Q, Millipore	<i>L. inermis</i>	4 nebo 10	16S/8T	Plastová kulturační miska (30 mm/60 mm)	ND
Altiero a Rebecchi, 2001	<i>Pam. fairbanksi</i>	1,2% bacto agar s fyloidy mechu	San Benedetto	<i>Pristionchus iheritieri</i> , <i>Panagrolaimus rigidus</i> nebo <i>C. elegans</i>	14 nebo 20	12S/12T	Plastová Petriho miska (15 mm)	ND
Hohberg, 2006	<i>Pam. richtersi</i>	2% agar s defaunizovanou zeminou	Kohoutková voda	<i>Pelodera teres</i>	16	Tma	Skleněná Petriho miska (70 mm)	ND
Hengherr a kol., 2008	<i>Pam. tonollii</i> , <i>richtersi</i>	3% agar	H ₂ O	<i>P. citrina</i>	ND	ND	ND	ND

Citace	Druh	Substrát	Kultivační médium	Potrava	Tep- lota [°C]	Světlo	Nádoba	Výměna mé- dia
Altiero, Bertolani a Rebecchi, 2010	<i>Pam. fairbanksi</i>	2% agar	Minerální voda (0.2 mL; pH 7.68, 46 mg L1 Ca2+)	Hlístice	14	12S/12T	Petriho miska (15 mm)	2 dny
Reuner a kol., 2010	<i>Pam. tonollii</i>	3% agar	Volvic	<i>P. citrina</i> a <i>Panagrellus sp.</i>	20 +-1	12S/12T	Petriho miska	ND
Lemloh, Brümmer a Schill, 2011	<i>Pam. tonollii</i>	agar	Volvic	<i>P. citrina</i> a <i>Chlorogonium elongatum</i>	20	12S/12T	Deska s jamkami	ND
Schill, 2013	<i>Pam. palaui, kenianus</i>	3% agar	Volvic	<i>P. citrina</i> (2x týdně)	20	12S/12T	Petriho miska	ND
Kosztyla a kol., 2016	<i>Pam. fairbanksi</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s dd ₂ O v poměru 1:3	<i>L. inermis</i> a <i>Chlorococcum sp.</i> a <i>Chlorella sp.</i>	16	Tma	Petriho miska s poškrábaným dnem	2 týdny
Sugiura a kol., 2019	<i>Pam. sp.</i>	1,2% agar	Volvic	<i>L. inermis</i> a <i>Chlorella vulgaris</i>	20	Tma	Petriho miska (90 mm)	Médium každé 3 dny, nádoba měsíčně
Kaczmarek a kol., 2020b	<i>Pam. experimentalis</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	2 ml <i>L. inermis</i> jednou za týden	20	ND	Petriho miska s poškrábaným dnem	Týdně
Suma a kol., 2020	<i>Pam. sp.</i>	2% agar	Roztok KCM v H ₂ O	<i>C. elegans</i>	20	Tma	Petriho miska (35 mm)	ND
Hara a kol., 2021	<i>Pam. sp.</i>	1,2% agar	H ₂ O	<i>L. inermis</i> a <i>Chlorella vulgaris</i>	22	ND	ND	ND
Kayastha a kol., 2023	<i>Pam. gadabouti sp. nov.</i>	-	Směs Žywiec Zdrój s ddH ₂ O v poměru 1:3	<i>L. inermis</i>	18	ND	Petriho miska s poškrábaným dnem	Týdně
Momeni, Fuentes-González a Pienaar, 2022	<i>Echi. sp., Pse. ramazzotti a Vir. viridianus</i>	1,2% agar v KCM s mechem	Dešťová/ minerální voda	<i>Chlorella vulgaris</i>	20-25	12S/12T	Petriho miska	2-3 měsíce

8.B Seznam škol, které se zapojily do sběru vzorků

Tabulka 10. Seznam škol, které se zapojily do sběru vzorků.

Škola	Vyučující
Gymnázium Česká Lípa	Mgr. Alice Čechová Mgr. Lenka Tulková
Gymnázium Žatec	Mgr. Andrea Koníčková Mgr. Eva Požárová
Gymnázium Česká Třebová	Mgr. Daniela Fricová
Cyrlometodějské gymnázium, ZŠ a MŠ v Prostějově	Mgr. Eliška Hubáčková
Gymnázium Čelakovice	Mgr. Eva Sobotová
Gymnázium Vincence Makovského Nové Město na Moravě	PhDr. Hana Hronová
Gymnázium Cheb	Mgr. Hedvika Millionová
Gymnázium Aš	Mgr. Hedvika Millionová
Gymnázium Prachatice	Mgr. Ivana Lukášková
Gymnázium Turnov	Mgr. Iveta Vavřichová
Gymnázium, Mladá Boleslav, Palackého 191/1	Mgr. Jana Kašparová Mgr. Lada Macháčová
Gymnázium Jakuba Škody, Přerov	Jakub Pavlík
Masarykova střední škola zemědělská a přírodovědná, Opava	Mgr. Jana Stříbná
Gymnázium Zikmunda Wintra, Rakovník	Mgr. Jitka Matyášová
Biskupské gymnázium Varnsdorf	Mgr. Lenka Foberová
Gymnázium Písek	Mgr. Lenka Vašíčková
Gymnázium Jiřího Wolкера, Prostějov	Mgr. Libor Marčan
Gymnázium Dr. Antona Randy	Mgr. Miloň Podoubský
Střední lesnická škola a Střední odborné učiliště, Křivoklát	Ing. Monika Cyrusová
Základní škola Rakovského, Praha	Mgr. Nikol Obdržálková
Gymnázium Dvůr Králové nad Labem	Mgr. Šárka Rutrllová
Gymnázium Valašské Klobouky	Mgr. Gabriela Kozubíková
Gymnázium Teplice	Mgr. Pavla Bergmanová
Gymnázium Havlíčkův Brod	Mgr. Pavla Kotnová
Gymnázium Pierra de Coubertina, Tábor	Mgr. Pavla Trčková
Gymnázium Mimoň	Mgr. Petra Maslenová
Gymnázium Mikuláše Koperníka, Bílovec	Mgr. Sylva Roháčková