

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Vliv reprodukčních způsobů na AT/GC architekturu ribozomálních genů sladkovodních
lasturnatek

Bakalářská práce

Autor: Kristýna Patočková

Studijní program: B1501 / Biologie

Studijní obor: 1501R015 / Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: Mgr. Radka Symonová, Ph. D

Odborný konzultant: Dr. Robin James Smith

Lake Biwa Museum

Hradec Králové

květen 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Vliv reprodukčních způsobů na AT/GC architekturu ribozomálních genů sladkovodních lasturnatek“ vypracovala samostatně a že jsem v seznamu literatury vypsala všechny použité prameny.

V Hradci Králové dne

Kristýna Patočková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Radce Symonové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, poskytnutí literatury a cenných rad, za její trpělivost a za čas, který mi věnovala. Také bych chtěla velmi poděkovat Dr. Robinu J. Smithovi za vědomosti týkající se sběru sladkovodních lasturnatek v terénu, preparaci a determinaci lasturnatek, o které se se mnou podělil. Dále děkuji Mgr. Monice Schmidt, PhD. za rady, čas a trpělivost, které mi věnovala při laboratorní části mé práce. Děkuji také Univerzitě Hradec Králové a Lake Biwa Museum za možnost výjezdu k jezeru Biwa. Na závěr děkuji svým blízkým za jejich podporu.

Anotace

PATOČKOVÁ, K. Vliv reprodukčních způsobů na AT/GC architekturu ribozomálních genů sladkovodních lasturnatek. Hradec Králové, 2019. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě University Hradec Králové. Vedoucí práce Mgr. Radka Symonová, PhD.

Cílem této práce byl sběr a osvojení si preparace a determinace sladkovodních lasturnatek s důrazem na evolučně významné asexuální linie a příprava komplexní analýzy vlivu reprodukčních způsobů na AT/GC architekturu rRNA genů lasturnatek. Tyto asexuální linie reprezentují důležitou modelovou skupinu pro evoluční mechanismy na molekulární úrovni, které dosud nejsou běžně analyzované u bezobratlých. Ribozomální geny představují nejarchaičtější frakci eukaryotického genomu, kterou je relativně snadné analyzovat i u bezobratlých a existuje velké množství veřejně dostupných sekvencí v online databázích. Současně se v GC obsahu ribozomálních genů může odrážet AT/GC kompoziční evoluce daného druhu event. celé taxonomické skupiny. Tudíž jsou tyto geny optimální frakcí genomu ke studiu elementárních mechanismů operujících na úrovni DNA, jako je například meiotická rekombinace závislá na reprodukčním způsobu. K vypracování laboratorního protokolu pro izolaci DNA z mikroskopických lasturnatek byl použit materiál nasbíraný u jezera Biwa v Japonsku. K porovnání GC obsahu mezi asexuálními a sexuálně rozmnožujícími liniemi bylo použito sekvencí 28S rDNA (10 vlastních a 19 přístupných z GenBank). Obsah GC byl nepatrně vyšší u asexuálních druhů.

Klíčová slova:

Sladkovodní lasturnatky, reprodukční způsoby, rDNA, GC obsah

Annotation

PATOČKOVÁ, K. The influence of reproductive modes on AT/GC architecture of ribosomal genes in freshwater ostracods. Hradec Králové, 2019. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Supervisor Mgr. Radka Symonová, PhD.

The aim of this work was to collect samples of freshwater ostracods and to master their dissection and determination with an emphasis on evolutionary significant asexual lineages and preparation of a complex analysis of the role of reproductive modes in the AT/GC architecture of ribosomal (rRNA) genes in ostracods. These asexual lineages represent an important model group for evolutionary mechanisms on molecular level that are not commonly analysed in invertebrates. Nuclear rRNA genes belong to the oldest fraction of eukaryotic genome, which is relative easy to analyse in invertebrates and there is a large number of publicly available sequences in online databases. At the same time, AT/GC compositional evolution of species or eventually whole taxa is reflected in GC content of rRNA genes. Thus, these genes are an optimal genomic fraction to study elementary mechanisms operating at the DNA level, such as meiotic recombination. To prepare the laboratory protocol for DNA isolation from microscopic ostracods, material collected at the Lake Biwa in Japan was used. For the comparison of GC content between asexual and sexual ostracod lineages, 28S rDNA sequences (10 produced in the framework of this thesis and 19 downloaded from the GenBank database) were used. GC content was slightly higher in asexual species.

Key words:

Freshwater ostracods, reproduction modes, rDNA, GC content

Obsah

1 Úvod do tématu práce	7
2 Sladkovodní lasturnatky	8
2.1 Klasifikace a postavení lasturnatek v systému	8
2.2 Schránka	9
2.3 Hlava a hrud'	10
2.4 Končetiny	11
2.5 Orgánové soustavy	15
2.6 Reprodukční způsoby	16
2.7 Ribozomální DNA	17
3 Metodika	19
3.1 Charakteristika území	19
3.2 Sběr a zpracování lasturnatek	20
3.3 Použitý materiál	21
3.4 Izolace DNA	22
3.5 Kvantifikace DNA na spektrofotometru a koncentrace vzorků DNA	22
3.6 PCR	23
3.7 Agarová elektroforéza	23
3.8 Sekvence, aligment a a vypočítání GC obsahu	24
4 Výsledky	24
5 Diskuse	28
6 Závěr	29
7 Seznam použitých zdrojů	30

1 Úvod do tématu práce

Lasturnatky (Ostracoda) jsou drobní korýši dosahující velikosti 0,3 -5 mm, některé mořské druhy rodu *Gigantocypris* mohou dosahovat velikosti až 25 mm. Lasturnatky žijí v širokém rozmezí biotopů: marinních, brakických a limnických, existují i druhy žijící semiterestricky a dokonce terestricky (např. ve vlhkém mechu či spadeném listí). Nejvýznamnějším rozlišovacím znakem lasturnatek je schránka (viz **Obr. 1**, A-C), skládající se ze dvou kalcifikovaných lasturek, které jsou dorzálně spojeny a kompletně uzavírají měkké části těla. Při rozevření lasturek jsou ventrálně vystrčeny pouze konce některých z 8 párů končetin sloužící k lokomoci, získávání potravy a reprodukci (Meisch 2000). Lasturnatky jsou nejdiverzifikovanější třídou korýšů. Existuje 10 000 - 15 000 recentních druhů. Spolu s fosilními druhy bylo popsáno asi 62 000 druhů (Meisch 2000). V současné době můžeme na internetové World Ostracoda Database najít přes 10 000 druhů se stručnými popisy a odkazy na práce, které se jimi zabývají (Brandão et al. 2019). V České republice se pak vyskytuje asi 82 druhů sladkovodních lasturnatek (Symonová 2005). Velké množství druhů lasturnatek můžeme nalézt v dlouhodobě existujících jezerech, jako jsou např. Bajkal, Tanganika nebo jezero Biwa. Tyto vodní útvary jsou staré nejméně milion let (tj. voda v nich je nepřetržitě nejméně milion let), nezřídka však i několik miliónů až desítek milionů let jako v případě jezer Bajkal a Tanganika. Naproti tomu četná postglaciální jezera v holarktické oblasti (např. Bodamské jezero, alpská jezera v Německu a Rakousku) jsou stará ne více než 10 000 – 12 000 let a tudíž evolučně velmi mladá. Na vzniku a existenci dlouhodobě existujících jezer se zásadním způsobem uplatňuje desková tektonika a tato jezera se často nacházejí v tektonicky aktivních oblastech (Critescu et al. 2010). Je zajímavé, že v těchto jezerech žijí sexuální populace lasturnatek, které se ve stejné oblasti, ale v mladších vodních útvarech rozmnožují partenogeneticky a tzv. „ancient asexuals“ se v nich vyskytují zřídka (Schön & Martens 2004). V jezeře Biwa ale žije 6 druhů z čeledi Darwinulidae (Smith & Janz 2009, Smith 2019). V Evropě jsou takto stará jezera zastoupena pouze Ochridským jezerem na hranicích Severní Makedonie a Albánie v mezihorské tektonické kotlině. Vzniklo před 2 - 5 miliony let (Critescu et al. 2010). Studium lasturnatek má mnoho využití. Např. díky kalcifikované schránce můžeme nalézt zachovalé lasturky v mikropaleoekologických vzorcích. Analýza změny biodiverzity v průběhu vývoje vodních biotopů může pomoci pochopit změny hlubokomořských proudů a klimatu (Yasuhara et al. 2009). Pro rekonstrukci změn klimatu se využívá analýzy chemického složení schránek lasturnatek (Bassetti et al. 2010). Z důvodů častého odštěpování asexuálních linií, existence populací, kde sexuální a asexuální linie koexistují, a existence tzv. „ancient asexuals“ jsou lasturnatky unikátním modelem pro studium původu a osudu asexuálních linií, které nám pomůže k lepšímu pochopení některých evolučních principů (Butlin et al. 1998). Jaderná ribozomální DNA (rDNA) patří k nejkonzervovanější a nejuniverzálnější části genomu eukaryot. Proto jsem zvolila rDNA jako nejlépe probádanou a dostupnou část k analýze GC obsahu. Cílem této práce bylo seznámení se s třídou Ostracoda, preparací a determinací lasturnatek. Tato práce představuje základní kámen pro budoucí komplexní analýzu GC obsahu u lasturnatek.

2 Sladkovodní lasturnatky a rDNA

2.1 Klasifikace a postavení lasturnatek v systému

Třída Ostracoda patří do říše Animalia, kmenu Arthropoda, podkmenu Crustacea. Tuto třídu dělíme na dva podkmény – Podocopa a Mydocopa. Podocopa se pak dělí na řády Podocopida, Platycopida a Paleocopida a Mydocopa se dělí na Mydocopida a Halocyprida. Sladkovodní lasturnatky (tučně vyznačeny) patří výhradně do řádu Podocopida. Tato klasifikace byla převzata od Horne et al. (2002).

Řád: **Podocopida**

Podtřída: **Cytherocopina**

Nadčeleď: **Cytheroidea**

Čeleď: **Lymnocytheridae**

Čeleď: **Cytherideidae**

Čeleď: **Entocytheridae**

+ další čeledi marinních a brakických lasturnatek

Nadčeleď: **Terrestricytheroidea**

Čeleď: **Terrestricytheridae**

Podtřída: **Cypridocopina**

Nadčeleď: Macrocypridoidea

Nadčeleď: Pontocypridoidea

Nadčeleď: **Cypridoidea**

Čeleď: **Candonidae**

Čeleď: **Ilyocyprididae**

Čeleď: **Notodromadidae**

Čeleď: **Cyprididae**

Podtřída: **Darwinulocopina**

Nadčeleď: **Darwinuloidea**

Čeleď: **Darwinulidae**

+ další vymřelé čeledi

Podtřída: Bairdiocopina

Nadčeleď: Bairdioidea

Podtřída: Sigilliocopina

Nadčeleď: Sigillioidea

2.2 Schránka

Měkké tělo je zavěšeno ve dvouchlopňové schránce tvořené dvěma kalcifikovanými lasturkami spojenými dorzálně pomocí zámku. Jeho struktura je různá u různých skupin, od jednoduchého spojení lasturek až po zuby na jedné straně a jim odpovídající důlky na straně protilehlé. Na základě morfologie rozlišujeme osm typů zámků: adontní, lofodontní, merodontní, entomodontní, schizodontní, ampidotní, gongyloidontní, visordontní (Morkhoven 1962).

Z ventrálně pootevřeného karapaxu lasturnatky vystrkují konce končetin, a to především anteny, antény, kráčivé končetiny, uropody a pohlavní orgány. Otevření schránky je zajištěno tlakem tělních tekutin. Volné ventrální okraje lasturek zapadají do sebe nebo se překrývají, aby zajistily důkladné uzavření (viz **Obr. 1, B**), které dává lasturnatkám možnost ochrany před predací nebo nepříznivým podmínkám prostředí. Pokud se okraje lasturek překrývají, tak většinou přesahuje levá lasturka přes pravou (Bronshtein 1947). Pevné uzavření zajišťují silné adduktorové svaly, které prochází středem těla a jsou přichyceny na vnitřních stranách lasturek. V místě přichycení adduktorů na schránku se tvoří otisky. Spolu s otisky mandibulárních svalů tvoří centrální svalové políčko (viz **Obr. 1, B**), které je důležitým taxonomickým znakem hlavně na úrovni čeledí a nadčeledí. U lasturnatek skupiny Darwinuloidea tvoří otisky typickou rosetu, zatímco u skupiny Cytheroidea tvoří téměř svislou řadu (Meisch 2000).

Stěnu každé lasturky tvoří vnější a vnitřní kalcifikovaná lamela. Zatímco celá vnější lamela je u zástupců skupiny Podocopida kalcifikována, vnitřní lamela bývá kalcifikována jen v okrajovém pruhu, zbylá část je tvořena membránou. V prostoru mezi lamelami, tzv. interlamelárním prostoru, mohou být uloženy orgány rozmnožovacího či trávicího systému. Kalcifikovaná část vnitřní lamely může být oddělená, anebo částečně nebo celkově splývat s vnější lamelou (Meisch 2000). U některých rodů (např. *Stenocypris*, *Pseudocyprretta*) nacházíme v marginální zóně septa, malé klínovité podpurné struktury vmezežené mezi vnější a vnitřní lamelu (Victor & Fernando 1981).

Povrch schránky je poset póry (viz **Obr. 1, A**) s úzkými kanálky, které vedou skrz schránku a prochází jimi inervované sety (viz **Obr. 1, D**). Sety mají senzoricke funkci. Ve srůstovém pásmu (oblast spojení vnitřní a vnější lamely) můžeme nalézt pravé (kanálek prochází skrz srůstové pásmo) nepravé marginální póry (Bronshtein 1947).

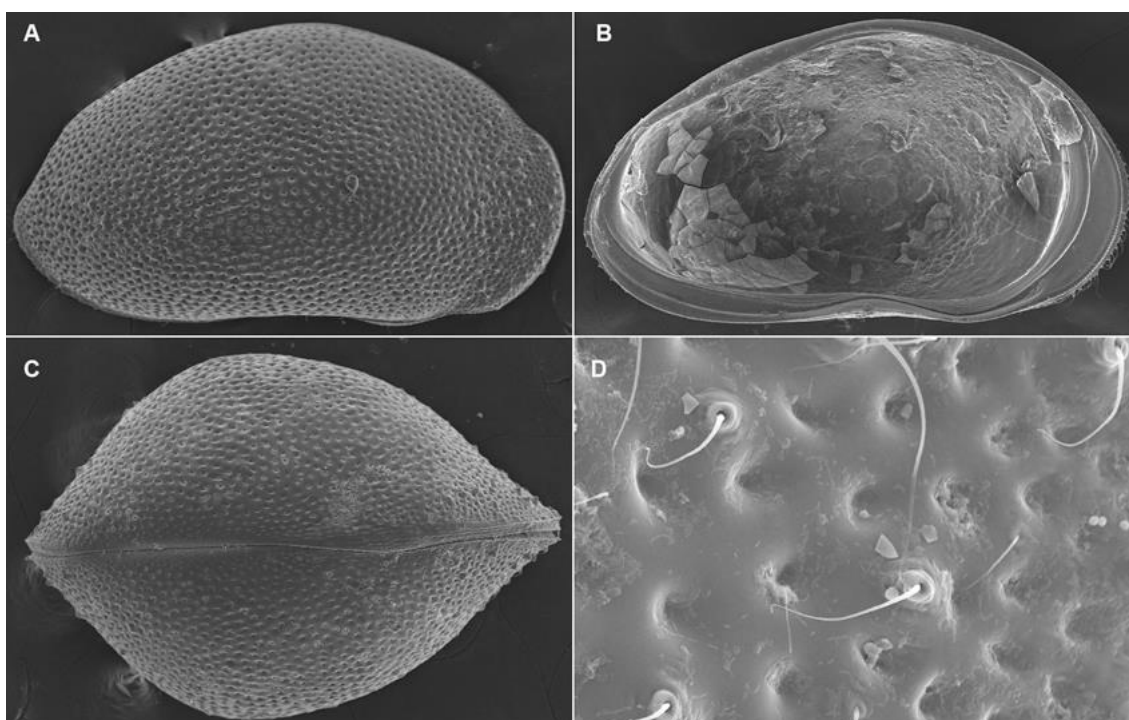
Vnější povrch schránky může být hladký nebo ornamentovaný tvorbou důlků, rýh a trnů. Ornamentování může být z části ovlivněno prostředím, například jedinci druhu *Cyprideis torosa* (druh brakických vod) žijící v prostředí s vysokou salinitou mají hladké schránky, zatímco jedinci žijící v prostředí s nízkou salinitou mají na určitých místech schránky hrbolky (Keyser a Aladin 2004).

Mnoho druhů projevuje sexuální dimorfismus. Po poslední ekdyzi vznikají rozdíly ve velikosti a tvaru schránky mezi samci a samicemi. U druhů s juvenilní péčí, kdy se vajíčka a první dvě až tři juvenilní fáze vyvíjí v prostoru schránky samice, je její zadní část zvětšena. U některých druhů může být posterodorzální část schránky zvětšena i

u samců, protože se v této části tělní dutiny nachází výrazně zvětšené části pohlavních orgánů (Ozawa 2013).

Barva schránky ve spojení s jejím tvarem je často charakteristická a lze ji použít jako diagnostický znak (např. pruhy u *Cypridopsis vidua*). U druhů podčeledi Candoninae chybí pigmentování a tyto druhy jsou typické perleťovým leskem (Meisch 2000). Barva lasturnatek závisí na pigmentu nacházejícím se v epidermis vnější lamely, střevním obsahu a někdy také řas pokrývajících tělo (Bronstein 1947).

Má se za to, že schránka (karapax) lasturnatek (Ostracoda) není homologní se schránkami ramenonožců (Brachiopoda), škeblovek (Conchostraca) a ani jiných korýšů (Crustacea). Karapax je vyvinut již u líhnoucích se larev (Meisch 2000).



Obr. 1: SEM snímky schránky *Cypris granulata* (Daday, 1898). A – pravá lasturka, vnější povrch. B – levá lasturka, vnitřní povrch, na středu patrné centrální svalové políčko. C – dorzální pohled na pevně uzavřenou schránku. D – detail vnějšího povrchu lasturky s patrnými póry a jimi procházejícími sensorickými setami. (K. Patočková & R. J. Smith, orig., Lake Biwa Museum).

2.3 Hlava a hrud'

Hlava složená z čela, horního pysku a hypostomu (dolní pysk) je tvořena silným chitínovým skeletem spojeným tenkými membránami. Čelo nese první dva páry končetin a oči. Horní pysk, jehož posteriorní okraj tvoří anteriorní okraj úst, se nachází pod čelem a nenese žádné končetiny. Hypostom se nachází za horním pyskem a tvoří posteriorní okraj úst. K hornímu okraji hypostomu jsou připojeny chitínózní tyčinkovité výztuže spojující maxiluly a mandibuly. Hrud' nese hrudní končetiny a obsahuje především trávicí a reprodukční soustavu (Meisch 2000).

2.4 Končetiny

Stavba končetin lasturnatek je odvozena od dvouvětvné končetiny korýšů, která se v základním stavu skládá z protopodu (protopodit) nesoucího endity, endopod (endopodit), exopod (exopodit) a epipod (epipodit). Epipodit je většinou přeměněn ve vibrační (branchiální) destičky. U podocopidů je vyvinuto osm párů, většinou protažených končetin, kdy první čtyři páry jsou jasně odvozeny z hlavy. U samců nadčeledi Cytheroidea (např. *Lymnocythere inopinata*) najdeme tzv. štětečkovité orgány, které jsou pravděpodobně pozůstatky dalšího zakrnělého páru končetin. Od páru hrudních končetin jsou také nejspíš odvozeny i samčí kopulační orgány (Meisch 2000).

1. pár - Antenuly, An1

Antenuly An1 mají lokomoční a senzoryckou funkci. Tento pár končetin je na rozdíl od následujících párů jednovětvný (Boxshall et al. 2010). Antenuly se skládají z pěti až osmi podomerů a nesou senzorycké orgány a sety. Jedním ze senzoryckých orgánů jsou aestety značené „ya“ nacházející se na apexu terminálního článku antenuly, které svým vzhledem připomínají zkrácenou setu s lehce rozšířeným a zakulaceným koncem (Meisch 2000). U nadčeledi Cypridoidea pak můžeme mezi 1. a 2. článkem antenuly nalézt tzv. Romův orgán. Ten má podobu krátké, na bázi cibulkovitě rozšířené sety s diskovitým zakončením. Na tomto zakončení pak vyúsťuje tenký kanálek procházející orgánem. Dále u některých druhů můžeme na dorsálním okraji 1. článku nalézt podobnou strukturu, a to tzv. Wouterův orgán. Funkce těchto dvou sensorů zatím není jasná (Smith & Matzke-Karasz 2008). Tyto končetiny jsou díky množství pohyblivých segmentů velice flexibilní (Smith & Tsukagoshi 2005). Protože slouží také k lokomoci, nesou mnoho set. U druhů lezoucích nebo hrabajících v substrátu jsou tyto sety kratší a drápkovité (viz **Obř. 2**), zatímco u plovoucích druhů jsou dlouhé a ohebné (Meisch 2000).

2. pár - Antény, An2

Antény An2 jsou hlavními strukturami adaptovanými pro lokomoci. Jejich stavba a chemotaxe jsou důležitými taxonomickými znaky. Mezi podokopidními skupinami je dvouvětvná struktura zřetelná pouze u Cytheroidea, kde exopod formuje spinneretní setu. U ostatních podokopidních linií je exopod redukován v šupinovitou strukturu obvykle nesoucí tři sety. U mnoha zástupců nadčeledi Cypridoidea nese první segment endopodu An2 5 +1 natatorních set. Pět těchto set je většinou stejně vyvinuto a jedna se liší délkou (je často znatelně kratší) a proto by neměla být považována za pravou natatorní setu a je někdy označována za senzoryckou. Sety jsou číslovány 1 až 6 podle jejich postupného vzniku v době larválního vývoje. První se objevuje ve 4. fázi (A-5) a po každé následující ekdyzi se při dává další až do dospělosti. Jejich počet tedy umožňuje rozlišovat mezi posledními stádii a dospělci. I přes možnou existenci intraspecifických odchylek, je délka těchto set důležitým diagnostickým znakem. U druhů schopných aktivního plavání ve vodním sloupci (např. *Cypridopsis vidua*) jsou natatorní sety velice dobře vyvinuté, vždy přesahují špičky terminálních drápků An2. Druhy s natatorními

setami dosahujícími konců terminálních drápků klouzají po sedimentu dna. Druhy lezoucí či hrabající mají tyto sety více či méně redukované (např. *Heterocypris reptans*). Druhy s přechodnou délkou natatorních set (např. *Cypridopsis lusatica*) jsou pravděpodobně v evolučním procesu vedoucím k progresivní redukci těchto set, který je buď paralelní, nebo následuje změnu od plavání k lezení (Petkovski et al. 1993). U některých rodů (např. *Herpetocypris*, *Ilyocypris*) se můžeme setkat jak s druhy s natatorními setami dobře vyvinutými, tak i kompletně redukovanými. Všichni zástupci Candoninae mají kompletně redukované natatorní sety. Jejich absence u Darwinuloidea (viz **Obr. 2**) a Cytheroidea je považován za pleziomorfní znak. U cypridoidů jsou antény často ve struktuře a chaetotaxi sexuálně dimorfní (např. *Fabaeformiscandona fabaeiformis*). Rozdíly mezi pohlavími jsou patrné po poslední ekdyzi. Jedním z rozdílů je transformace t2 a t3 set u samců v tlusté a rigidní senzory, tzv. samčí štětiny (Meisch 2000).

3. pár - Mandibuly, Md

Mandibuly (viz **Obr. 2**) slouží ke zpracování potravy. Jsou tvořeny mastikatorními výběžky se silnými zuby spojenými s palpem, který často nese dobře vyvinutou dýchací destičku. Dostí složitá chaetotaxe je důležitým diagnostickým znakem pro Candoninae na úrovni rodové a nižší (Meisch 2000).

4. pár - Maxiluly, Mx1

Maxiluly (viz **Obr. 2**) mají hlavně dýchací funkci, ale napomáhají také při zpracování potravy. Skládají se z dvoučlankového palpu a tří mastikatorních výběžků. Obvykle nesou velké dýchací destičky, které vytváří kontinuální vodní proud přes tělní dutinu (Meisch 2000).

5. pár - L5, první thorakopod, T1

Pátá končetina skupiny podokopida je velmi variabilní ve tvaru i funkci. Může plnit funkci kráčivé končetiny (Cytheroidea), nebo může být transformována v příústní končetinu anteriorně nesoucí mastikatorní výběžek a posteriorně palpu podobný endopod a dýchací destičku (Darwinuloidea a Cypridoidea). Původ L5 zůstává otázkou. K hlavovému původu se přiklání Hartmann (1966). Smith & Martens (2000) ve svém článku uvádí přesvědčivé důkazy ukazující na hrudní původ L5. U skupiny Cytheroidea je zachována v původním stavu jako kráčivá končetina, u Darwinuloidea (viz **Obr. 2**) a Cypridoidea je modifikována v maxilliped (Mxp). U Cypridoidea jsou maxillipedy sexuálně dimorfní. U samců jsou přeměněny v asymetrické uchopovací orgány, které jsou diagnostickým znakem na úrovni druhu (Meisch 2000).

6. pár - L6, druhý thorakopod, T2

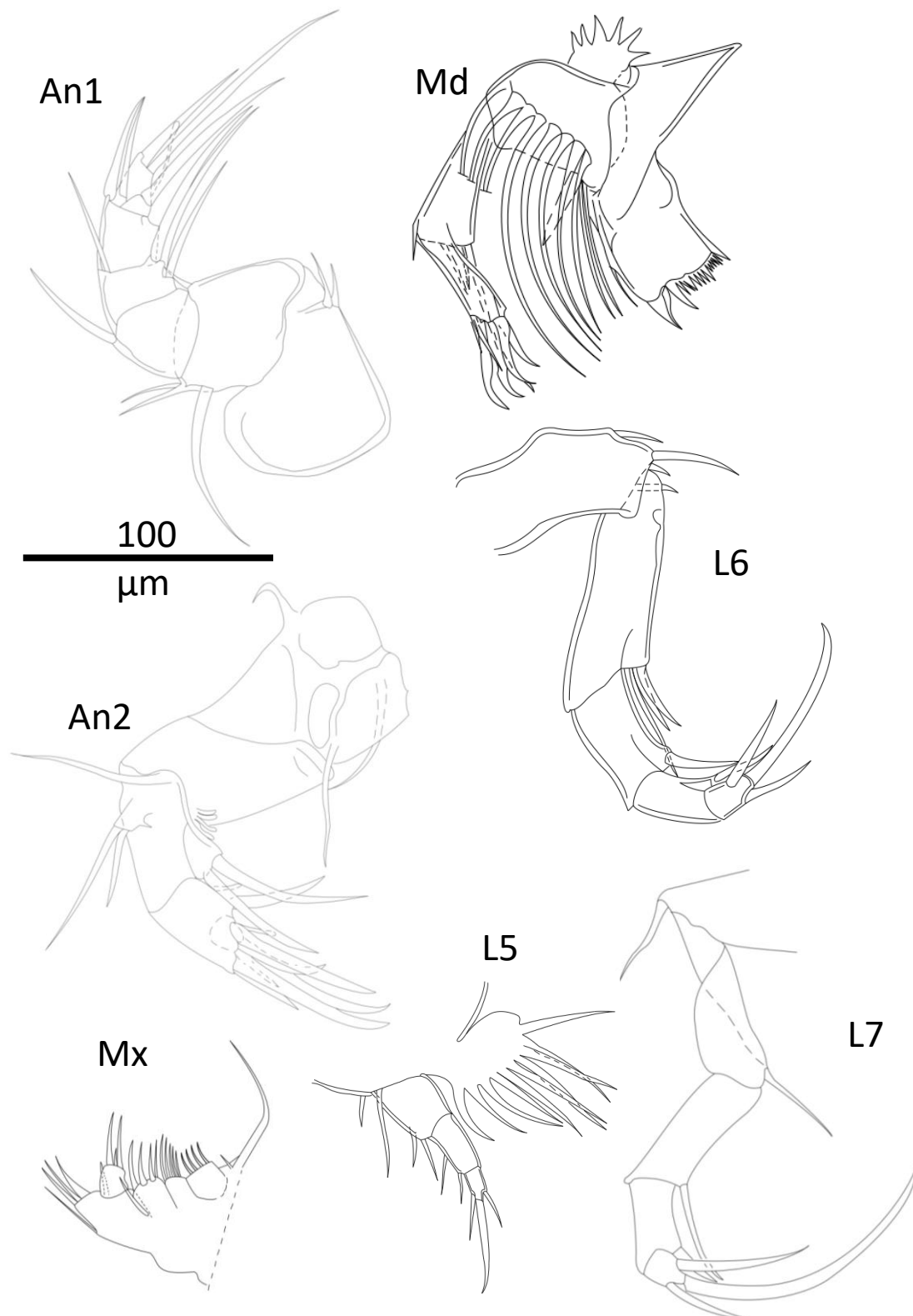
L6 (viz **Obr. 2**) je u všech podokopidních linií čtyř až pěti článková kráčivá končetina, která je obvykle zakončena dobře vyvinutým drápkem (Bronshtein 1947).

7. pár - L7, třetí thorakopod, T3

L7 je u nadčeledí Cytheroidea a Darwinuloidea (viz **Obr. 2**) kráčivou končetinou srovnatelnou s L6. U nadčeledí Cypridoidea je transformována otočením směrem dozadu a nahoru v čistící končetinu. U čeledi Candonidae konečný segment není příliš modifikován, nese tři sety, které jsou homologní terminálnímu drápku a setám. Na rodové úrovni podčeledi Candoninae je chaetotaxe velmi důležitá. Na rozdíl od čeledi Candonidae nacházíme u čeledi Notodromadidae, a především u čeledi Cyprididae, komplexní strukturu zvanou klíšťkovitý orgán. Ten vznikl přeměnou terminálního segmentu a distální části předposledního segmentu (Meisch 2000).

8. pár – Uropod

Osmý, plně vyvinutý pár končetin je klasicky považován za furku (kaudální ramus), strukturu odvozenou z telsonu. Pochybnosti o telsonickém původu vyslovil Bowman (1971). Podle Meische (2007) se osmý pár končetin vyvinul z dýchacích destiček a telsonický původ je vysoce nepravděpodobný z důvodu složitosti aparátu a absence mesodermálních tkání v telsonu. Plně vyvinuté uropody jsou tyčkovité, nesegmentované, laterálně zploštělé končetiny zakončené dvěma drápkami a dvěma a více setami. U podčeledi Cypridopsinae jsou redukovány u samců úplně a u samic v bičíku podobným strukturám. U samců skupiny Cytheroidea jsou redukovány uropody integrované v kopulační orgány. U skupiny Darwinuloidea jsou silně redukovány či úplně chybí (Meisch 2000).



Obr. 2: Končetiny druhu *Darwinula stevensoni* (Brady & Robertson, 1870). An1 – antenula. An2 – anténa. Md – mandibula. Mx – maxilula (bez vibraturní destičky). L5 – pátá končetina. L6 – šestá končetina. L7 – sedmá končetina (s přetočenými prvními segmenty). (K. Patočková & R. J. Smith, orig.)

2.5 Orgánové soustavy

U skupiny Podocopida nenajdeme žábry ani jiné specializované dýchací orgány, protože k výměně dýchacích plynů dochází na povrchu těla a vnitřní lamely. Proud okysličené vody uvnitř schránky je vytvořen pohybem vibratorních destiček hlavně 4. páru končetin. U této skupiny také chybí srdce. Krevní oběh je nejspíše udržován kontrakcí svalů nebo krevních cév (Meisch 2000).

Trávicí soustavu můžeme někdy pozorovat skrze schránku. Potrava je mandibulami a maxilulami posunována do atria (ústní dutiny), tam se nachází hrabičkovitě tvarované orgány, které napomáhají rozmělnovat potravu a posunovat ji k ezofágu. Z ezofágu prochází potrava do předního střeva, které funguje jako žaludek, kam vyúsťuje párová žláza hepatopankreas. Laloky hepatopankreatu se často nachází v prostoru mezi lamelami a zanechávají otisky na schránce (Bronstein 1947). U skupiny Podocopida můžeme rozlišit dvě funkce hepatopankreatu. Podle morfologie buněk tento orgán pravděpodobně slouží k sekreci látek napomáhajícím k trávení, ukládání a distribuci některých živin a současně k hematopoéze (Symonová 2007). Z předního střeva potrava putuje dál do zadního střeva a následně anusem, nacházejícím se dorzálně od uropodů, ven z těla (Meisch 2000).

U skupiny Podocopida můžeme nalézt množství sekretorních a exkretorních žláz. Jejich přesné funkce ale nejsou úplně známy. Antenální žlázy vyúsťují na bázi antén a jsou plně vyvinuty pouze v larválních stádiích (po pátém instaru degenerují). Labiální žlázy vylučující vysoce viskózní sekret sloužící ke sdružování malých potravních částí vyúsťují před horní ret. Dále zde nacházíme maxilární žlázy vytvářející se z prvního segmentu maxily (Meisch 2000). Modifikovaný exopod antén u skupiny Cytheroidea pak produkuje lepkavou substanci, která pravděpodobně napomáhá lasturnatkám přilnout k povrchu substrátu, po kterém se pohybují (Bronstein 1947).

Centrální nervová soustava je složena z cerebra, circumezofageálního límce splynutých ganglií a anteroposteriorně jdoucího ventrálního řetězce ganglií. Z cerebra vychází nervy pro inervaci oka, epidermis lasturek, antenul a antén. Zbylé končetiny jsou inervovány ventrálním řetězcem ganglií (Meisch 2000).

Oko je u živých zvířat dobře rozeznatelné jako tmavá skvrna nacházející se na hraně dorzální strany lasturnatek, nad bázi antenul. Jednoduché oko je složeno ze tří více či méně splynutých optických pohárků (Meisch 2000). Oko u skupiny Podocopida je dobře uzpůsobeno málo osvětlenému prostředí. Světločivná schopnost optického systému závisí na parametrech čočky, tloušťce a ohybu vnějšího povrchu čočky (Tanaka 2006). U nauplií a dospělců dvou linií čeledi Notodromadidae optické pohárky tvoří pár laterálních očí. Několik skupin lasturnatek nemá oči vůbec, zejména hypogeicky žijící skupiny (Bronstein 1947).

Rozmnožovací soustava lasturnatek je zajímavá pro svou složitost a velikost. Samčí pohlavní orgány mohou zabírat 1/4 až 1/3 objemu těla. Samci i samice lasturnatek mají párové pohlavní orgány (Meisch 2000). U skupiny Cyprididae, varlata složená ze čtyř

dlouhých kanálků, jsou částečně uložena mezi lamelami (Bronshtein 1947). U skupin rozmnožujících se tzv. obřími spermii, mají samci speciální párovou spermatickou pumpu (Zenkerův orgán), aby vůbec mohli spermie dosahující až desetinásobku délky svého těla dopravit při kopulaci do těla samice. Tento gigantismus samců se pravděpodobně vyvinul v reakci na expanzi samičí rozmnožovací soustavy (Matzke-Karasz et al., 2014). Co však bylo již spolehlivě doloženo, je skutečnost, že rozmnožování těmito obřími spermii není slepou a krátkodobě existující evoluční hříčkou (Matzke-Karasz et al. 2009, 2014).

Samičí rozmnožovací soustava se na každé straně skládá z vaječníků, oviduktů, spirálních kanálků, seminálního receptakula a vagíny. U některých druhů probíhá vývoj vajíček a prvních instarů v tzv. plodové komůrce, která dává zadní části schránky samic nafouknutý vzhled. Vaječníky samic skupin Darwinuloidea a Cytheroidea jsou uloženy uvnitř těla, zatímco u samic skupiny Cypridoidea jsou uloženy v prostoru mezi vnější a vnitřní lamelou schránky (Meisch 2000).

2.6 Reprodukční způsoby

Lasturnatky se rozmnožují několika způsoby, které lze podle práce Horne et al (1998) rozdělit do čtyř kategorií: Prvním ze způsobů je sexuální (u lasturnatek zvaná bisexuální) reprodukce, kdy populace druhu tvoří jak samice, tak samci s různým poměrem pohlaví. Plně sexuální způsob reprodukce je typická pro mořské skupiny lasturnatek. Příkladem sexuálně se rozmnožujících sladkovodních lasturnatek je například rod *Cyclocypris* (Horne et al. 1998). Dalším reprodukčním způsobem je tzv. geografická partenogeneze, kdy v rámci druhu nalézáme jak bisexuální, tak partenogenetické populace. Geografickou partenogenezi pozorujeme například u druhu *Eucypris virens*, kdy v blízkosti Středozemního moře žijí bisexuální populace, zatímco severněji, hlavně pak za Alpami, nacházíme asexuálně (partenogeneticky) se rozmnožující populace (Bode et al. 2010). Mezi asexuálními samicemi a sexuálními samci pak může docházet k občasné hybridizaci za vzniku polyploidních jedinců (Schön et al. 2000). Od sexuálně rozmnožující se linie se v průběhu času mohou odštěpit krátkodobě existující asexuální linie. Znovu u příkladu *E. virens*, u kterého se podle Bode et al. (2010) jedná o komplex více než 40 kryptických druhů, můžeme díky analýze mitochondriální a ribozomální DNA pozorovat několik asexuálních linií, k jejichž odštěpení linií došlo několikrát nezávisle na sobě (Schön et al. 2000). Skupina Darwinuloidea je mezi ostatními skupinami speciální přítomností dlouhodobých asexuálních linií, tzv. „ancient asexuals“, což jsou linie, u kterých neexistují funkční samci po více jak 200 miliónů let (Martens et al. 2003). Darwinuloidi jsou spolu s pijavenkami označováni jako „ancient asexual scandals“ (Judson & Normark 1996), protože přežili po desítky až stovky miliónů let i přes to, že jako čistě asexuální linie by měli být odsouzeni k zániku, z důvodu akumulace škodlivých mutací predikovaném principem tzv. Müllerovy rohatky (Müller 1932, 1964).

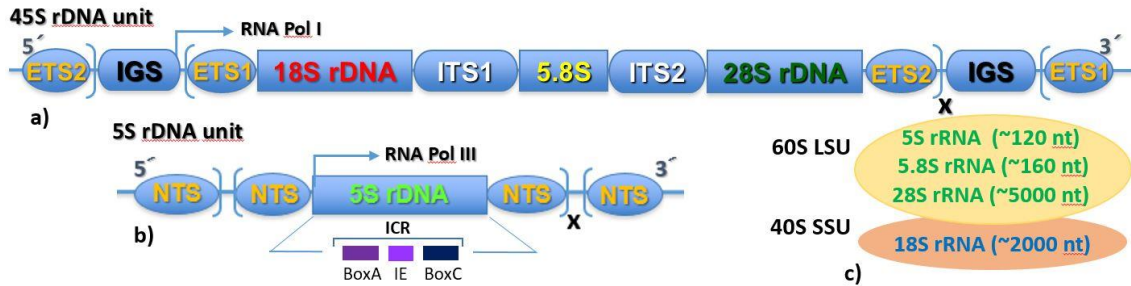
2.7 Ribozomální DNA

Jaderná ribozomální DNA (rDNA) patří k nejkonzervovanějším a nejuniverzálnějším částem genomu eukaryot. Tyto geny kódují čtyři hlavní jaderné ribozomální RNA (rRNA): 5S, 5.8S, 18S a 28S. rRNA pak spolu s ribozomálními proteiny dává vzniku strukturu zodpovědné za translaci mRNA do proteinu, ribozomu (Hartwell 2008). Těch se v eukaryotických buňkách se nachází od 1,5 do 3 miliónu (Porokhovnik & Gerton 2019). U eukaryot jsou rRNA geny složeny z klastrů za sebou seřazených repetitivních jednotek, které obsahují stovky až tisíce kopií. U každého druhu nalzáme specifický počet kopií (Ide et al. 2010). Například u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která je často používána jako modelový eukaryotický organismus, nalezneme ~150 repetitivních jednotek. Pouze část těchto kopií je přepisována do rRNA. Části, které nejsou přepisovány, jsou velmi důležité pro zachování integrity genomu. Při pokusu uměle snížit počet netranskribovaných kopií, došlo k zvýšení náchylnosti DNA k poškození chemikáliemi a ultra-fialovým světlem. S další redukcí počtu kopií se tato náchylnost k poškození dále zvyšovala (Kobayashi et al. 1998).

U eukaryot existují dvě frakce jaderné rDNA (viz **Obr. 3**): 45S jednotka tvořící jadérko a 5S extranukleolární jednotka (Sochorová et al. 2018). Jednotka 45S rDNA kóduje 18S, 5.8S a 28S rRNA. Tyto úseky jsou odděleny dvěma vnitřními transkribovanými mezerníky (ITS1, ITS2), celá jednotka je pak vymezena externími transkribovanými mezerníky (ETS) (Henras et al. 2015). ITS2 sekvence patří k oblíbeným fylogenetickým markerům, jeho sekundární struktura pomáhá při analýze DNA velice blízce si příbuzných druhů organismů (Wiemers et al. 2009). Spojením s 50-60 ribozomálními proteiny vytváří 28S (25S u rostlin a jednobuněčných organismů), 5.8S spolu s 5S velkou ribozomální podjednotku (60S LSU). Spojením s 30-40 ribozomálními proteiny pak 18S tvoří malou ribozomální podjednotku, 40S SSU (review Symonová 2019). Význam 45S jednotky a jejího správného fungování může být doložen mj. případy tzv. nukleolární dominance u mezidruhových hybridů. Jedná se o změnu ve formaci jadérka a epigeneticky kontrolované umlčení 45S rDNA. Úplnému mechanismu vedoucímu k rozlišení jednoho setu rodičovských rDNA zatím ale nebylo porozuměno (Pikaard 2000). Extranukleolární 5S rDNA je mnohem kratší a méně složitější. Skládá se ze sekvence okolo 120 bp a obsahuje funkční elementy Box A, IE, Box C (Castro et al. 2015), které jsou na obou stranách vymezeny vysoce variabilními netranskribovanými mezerníky („non-transcribed spacer“, NTS). 5S rRNA se podílí na stavbě velké ribozomální podjednotky, dále pak na stabilizování ribozomální struktury a peptidyl-transferázovou aktivitou zlepšuje bílkovinnou syntézu (Dinman 2005).

Jak již bylo zmíněno výše, rDNA má tandemové repetitivní uspořádání, a proto může být počet kopií mj. snadno redukován homologní rekombinací. Tyto ztráty a obnovení počtu kopií rDNA buňky kompenzuje tzv. „gene amplification system“ (Kobayashi 2014). Změny v množství kopií patří k nejčastějším mechanismům genetické variability vztahované na bázi v populaci (Conrad et al. 2010). U druhu *Saccharomyces cerevisiae* má množství repeticí vliv na stárnutí buňky, které by mohlo být ochranným mechanismem organismu před vznikem genomovým abnormalit (Kobayashi 2014). Je totiž známo, že

genomová stabilita se v průběhu času působením vnitřních (např. replikační chyby) a vnějších (např. ultrafialové světlo) faktorů snižuje (Kobayashi 2008). Množství kopií se také mění v průběhu ontogeneze. Malé změny byly opakovaně zaznamenány u obratlovců i bezobratlých na vnitrodruhové a dokonce i vnitropopulační úrovni (Sochorová et al. 2018). To může pomoci genomové diverzifikaci, tvorbě reprodukčních bariér, speciálním událostem a v konečném důsledku zvýšení biodiverzity (Dion-Côté et al. 2015).



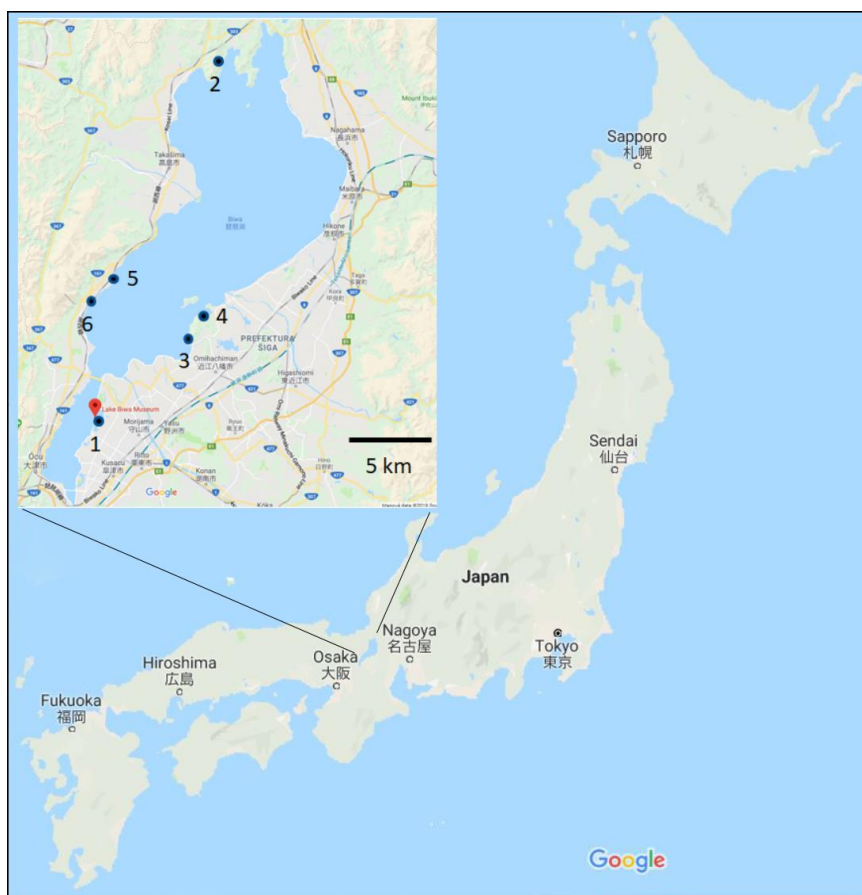
Obr. 3: a) – Struktura rDNA genového clusteru (nebo rRNA transkripční jednotky b) – struktura 5S rDNA jednotky. c) – 80S eukaryotický ribozom složený z velké (60 LSU) a malé (40 SSU) podjednotky s obsahujícími rRNA. CP – core promoter, jádrový promotor, ETS – external transcribed spacer, externí transkribovaný mezerník, ICR – internal control region, interní kontrolní region, IE – internal element, interní element, IGS – intergenic spacer, intergenový mezerník, ITS1, ITS2 – internal transcribed spacer 1 a 2, RNA Pol I a III – RNA polymeráza I a III, LSU – large subunit, velká podjednotka, SSU – small subunit, malá podjednotka, nt – nukleotidy, NTS – non-transcribed spacer, netranskribovaný mezerník, TIS – transcription initiation site, počáteční místo transkripce, TTTT – polyT transcription termination site, polyT terminační místo transkripce, UCE – upstream control element (Symonová 2019)

U eukaryot tvoří rDNA tvoří nejvíce GC bohatou část genomu hlavně (Galtier et al. 2001). GC bohatost těchto genů je připisována procesu tzv. GC-vychýlené genové konverzi), který souvisí s frekvencí rekombinace vztáženou na bázi v populaci. Tento proces byl dobře popsán u savců, ptáků a trav, ale jeho výskyt napříč fylogenetickým stromem zatím není zcela popsána (Escobar et al. 2011). Některé studie spojují GC bohatost s „stem-and-loop“ sekundární strukturou a termodynamickou stabilitou nukleových kyselin a kódovaných aminokyselin (Varriale et al. 2008). Práce Wang et al. (2006) podpořila tuto teorii u skupin Bacteria a Archea, ale při porovnání teplokrevných a studenkrevných obratlovců nenašla signifikantní rozdíly v GC obsahu, pouze 2,5 %. Zajímavé jsou v ohledu ke GC bohatosti tzv. expanzní segmenty (ES) u 28S a 18S rDNA. Ty ukazují v průběhu fylogeneze GC obohacení s velmi vysokým nárůstem u savců, hlavně pak u hominidů (Kobayashi et al. 1998; Parker et al. 2015). Univerzální GC bohatost 45S rDNA může být vysvětlena tím, že pro umožnění tzv. „concerted evolution“ (Liao 1999). Tímto termínem se rozumí „sladěná“ nebo „koordinovaná“ evoluce s homogenizačním účinkem na sekvenci DNA. V případě rDNA se předpokládá, že tyto geny by měly mít jasně odlišitelný a homogenní GC obsah, aby mohla být umožněna jejich intenzivní rekombinace (Forsdyke 2016).

3 Metodika

3.1 Charakteristika území

Jedince použité v této práci jsme nasbírali na několika lokalitách u jezera Biwa (viz **Obr. 4**), které se nachází v Japonsku na ostrově Honšú v prefektuře Šiga, severovýchodně od města Kjóto. Jezero Biwa se nachází v kotlině tektonického původu. Zatímco mladší, severní část jezera datuje svou existenci do doby asi před 400 000 lety, jižní část existuje již asi čtyři miliony let a patří mezi čtyři nejstarší jezera světa. Díky tomu zde žije 62 endemických druhů zahrnujících mimo jiné: 16 druhů ryb, 9 druhů mlžů, 21 druhů plžů a 12 druhů hmyzu (Lake Biwa Museum 2019). Příklady endemických organismů jsou: ryba *Silurus biwaensis*, mlž *Corbicula sandhi* (konzumován místními obyvateli), lasturnatka *Physocypria biwaensis*, jepice *Ephoron limnobium*, jednoděložná rostlina *Potamogeton biwaensis* a řasa *Pediastrum biwae* (Nishino 2012). V jezeře žije asi 595 druhů živočichů a asi 491 druhů rostlin (Lake Biwa Museum 2019).



Obr. 4: Mapka Japonska a ve výřezu Jezero Biwa s vyznačenými místy odběru lasturnatek (<https://www.google.com/maps>)

3.2 Sběr a zpracování lasturnatek

Pro sběr vzorků jsme využili několik technik. Jednou z technik byl sběr sedimentu z kořenů vrb nebo rákosin a částí jiných rostlin rostoucích na březích jezera a přecezení tohoto sedimentu přes analytické síto s velikostí ok 125 μm . Další technikou bylo přecezení vody a sedimentů získaných vykopáním díry v písku/štěrků v blízkosti asi půl metru od dosahu vodní hladiny. Poslední technikou byl sběr lasturnatek z vodní hladiny pomocí planktonní sítě. Každému vzorku jsme přiřadili číslo a do protokolu jsme zaznamenali souřadnice geografické polohy zjištěné kombinací údajů systémů GPS a GLONASS (ruská obdoba GPS, <https://en.wikipedia.org/wiki/GLONASS>, Global Navigation Satellite System). Dále jsme zaznamenali teplotu a pH vody pomocí pH-metru kombinovaným s teploměrem Horiba LAQUA act. Vzorky jsem roztrídila pod dohledem dr. R. Smithe pod stereoskopickým mikroskopem NIKON SMZ 1500 (viz **Obr. 5**). Vybrané jedince jsme usmrtili fixací ve 30% (nedenaturovaném) etanolu v souladu s japonským nařízením na ochranu, chov a využití pokusných a volně žijících živočichů. U fixovaných jedinců jsem vypreparovala končetiny nesoucí nezbytné taxonomické znaky. Ve světelném mikroskopu jsme determinovali jedince do rodu, případně do druhu. Byly také pořízeny SEM snímky schránek vybraných jedinců pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu JEOL 5800LV (viz **Obr. 1**). Jedince určené pro pozdější analýzu DNA jsme na základě předchozí determinace rovnou fixovali v čistém 96% etanolu.



Obr. 5: Druh *Darwinula stevensoni* pod stereoskopickým mikroskopem. Velikost jedinců do 0,8 mm. Znaky tohoto druhu jsou perleťová barva, klínovitý tvar schránky a atypické přesahování lasturek (pravá přesahuje přes levou). Další znaky viditelné po preparaci obecně platící pro skupinu Darwinulidae viz kapitola **2.4 Končetiny**. Vzhled končetin *Darwinula stevensoni* viz **Obr. 2**.

3.3 Použitý materiál

V pilotní fázi laboratorní části zde prezentované práce jsem použila dvě samice druhu *Darwinula stevensoni* ze vzorku s označením 180913-04. Dále jsem použila dva jedince z druhu *Stenocypris* cf. *hislopi* (Ferguson, 1969) ze vzorku 180913-01, a dvě samice druhu *Cypris granulata* ze vzorku číslo 181017-01 (detaily taxonomii a terminologii Meisch et al. 2019, SEM snímek schránky **Obr. 1**). Další tři jedince *Herpetocypris chevreuxi* (Sars, 1896), ze vzorků označených čísly 180913-04 a 180913-05, jsem testovala v předchozí fázi, jejímž cílem bylo vypracovat protokol na izolaci DNA z takto mikroskopicky malých živočichů (viz níže). Popis a GPS souřadnice lokalit odběru vzorků viz **Tab. 1**.

Tab. 1: GPS a GLONASS souřadnice s místy sběru lasturnatek

Číslo vzorku	Kombinované souřadnice	Místo sběru (viz Obr. 4)
180913-01	35°04'32.7"N 135°55'58.2"E	1
180913-04	35°04'32.5"N 135°56'00.5"E	1
180913-05	35°04'29.4"N 135°56'02.4"E	1
181017-01	35°04'29.4"N 135°56'19.5"E	1

V *in silico* části práce jsem využila veřejně přístupné sekvence 28S rDNA druhů lasturnatek. Jejich přehled viz **Tab. 2**.

Tab. 2: Přehled použitých sekvencí z GenBank databáze

Druh	Přístupové číslo GenBank (Benson et al 2005)
<i>Bradleycypris vittata</i>	KX940949.1
<i>Candona candida</i>	AB674972.1
<i>Cypretta seurati</i>	AB675000.1
<i>Cypria exculpta</i>	AB674980.1
<i>Cypridopsis adusta</i>	DQ531748.1
<i>Cypridopsis uenoi</i>	AB674997.1
<i>Darwinula</i> sp.	AY455764.1
<i>Dolerocypris mukaishimensis</i>	AB674986.1
<i>Dolerocypris ikeyai</i>	AB674995.1
<i>Dolerocypris sinensis</i>	AY455766.1
<i>Eucypris pigra</i>	AB675005.1
<i>Fabaeformiscandona kushiroensis</i>	AB996740.1
<i>Heterocypris incongruens</i>	AB675003.1
<i>Heterocypris salina</i>	LC202975.1
<i>Metacypris digitiformis</i>	AB674965.1
<i>Notodromas monacha</i>	AB674988.1
<i>Paracypris inujimensis</i>	LC169519.1
<i>Physocypris</i> cf. <i>biwaensis</i>	KX940935.1
<i>Physocypris nipponica</i>	AB674984.1

3.4 Izolace DNA

Izolaci DNA jsem provedla pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit od společnosti QIAGEN. Vybrané jedince jsem po vytažení z epruvety s etanolem promyla v destilované vodě, abych odstranila veškerý etanol, který by mohl interagovat s reagensy kitu. Přenesla jsem je do 1,5 ml zkumavky a přidala k nim 180 μ l ATL pufru a 20 μ l proteinázy K. Zkumavky jsem utěsnila parafilmem a přes noc nechala inkubovat ve vodní lázni při teplotě 56°C. Druhý den jsem vzorky vyjmula z lázně a nejdříve jsem k nim přidala 200 μ l ATL a vzorek promíchala vortexováním. Následně jsem přidala 200 μ l 96% čistého etanolu. Směs jsem napipetovala do QIAGEN kolonek umístěných v 2ml sběrné zkumavce a centrifugovala v Minicentrifuge MINI-6K při 6 000 RPM po dobu jedné minuty. Poté jsem kolonky přemístila do nové 2ml sběrné zkumavky, napipetovala 500 μ l AW1 pufru a směs opět centrifugovala při 6 000 RPM po dobu jedné minuty. Kolonky jsem přemístila do nové 2ml sběrné zkumavky a na membránu jsem napipetovala 500 μ l AW2 pufru. Následně jsem směs centrifugovala v centrifuze MiniSpin Eppendorf při 13 000 RPM po tři minuty. Poté jsem kolonky přemístila do nové 1,5 ml zkumavky. DNA jsem eluovala přidáním 100 μ l AL pufru, inkubací jednu minutu při laboratorní teplotě a konečnou centrifugací po jednu minutu při 8 000 RPM. U vzorků, které měly být zkoncentrovány a použity pro amplifikační PCR, jsem DNA eluovala v 200 μ l ultra čisté destilované vody.

3.5 Kvantifikace DNA na spektrofotometru a koncentrace vzorků DNA

Množství a čistota izolované DNA byla zjišťována na spektrofotometru SPARK značky Tecan. Na destičku byly nejdříve naneseny 2 μ l tekutiny, která sloužila jako blank (voda nebo AL pufr dle toho, v jaké tekutině byla eluována měřená DNA). Po změření byla tekutina setřena a na stejné místo byly naneseny 2 μ l vzorku.

Vzhledem k mikroskopickým rozměrům zkoumaných lasturnatek a tudíž nízkým koncentracím získaného roztoku DNA bylo nezbytné vzorky určené k PCR amplifikaci a sekvenaci DNA zkoncentrovat v rotačním vakuovém koncentrátoru od firmy Eppendorf. Cílem bylo asi desetinásobné zkoncentrování DNA lasturnatek. Otevřené zkumavky se 197 μ l roztoku byly vloženy do koncentrátoru, který byl nastaven na teplotu 30°C. Po 20 minutách byl zkontrolován objem roztoku porovnáním se stupnicí na další zkumavce naplněné stejným počátečním objemem čisté vody. Ze vzorku se odpařilo cca 100 μ l vody. Koncentrátor byl následně čtyřikrát spuštěn v deseti minutových intervalech, mezi nimiž byl kontrolován objem roztoku, až se objem dostal na požadovaných 20 μ l.

3.6 PCR

PCR amplifikace byla provedena za použití PPP Master Mixu od společnosti Top-Bio v termocykleru firmy Eppendorf. Do tenkostěnných 500 μ l mikrozkušavek byla nepipetováno 22 μ l připravené reakční směsi PCR vody, PPP Master Mixu, primeru ee a primeru mm (Symonová 2009). K této směsi byly přidány 3 μ l templátové DNA připravené zkoncentrováním izolátů lasturnatek.

Použité primery:

ee 5' - ATC CGA CTA AGG AGT GTG TAA CAA CTC ACC- 3'

mm 5' - GAG CCA ATC CTT ATC CCG AAG TTA CGG ATC- 3'

Tab. 3: Složení PCR reakce

Reagencie	Objem	Finální koncentrace
PPP Master Mix (2x koncentrovaný)	12,5 μ l	
5' primer	1 μ l	0,4 μ M
3' primer	1 μ l	0,4 μ M
PCR voda	7,5 μ l	
Templátová DNA	3 μ l	

Tato směs v mikrozkušavkách byla zamíchána na vortexu a krátce centrifugována. Poté byla vložena do termocykleru a byly nastaveny podmínky pro PCR reakci. Fáze denaturace, nasednutí primerů a extenze byla nastavena na 35 cyklů.

Tab. 4: Termální průběh PCR amplifikace

Fáze	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	94°C	3 min
Denaturace	94°C	30 s
Nasednutí primerů	53°C	30 s
Extenze	72°C	1 min 20 s
Finální extenze	72°C	10 min
Chlazení	4°C	∞

3.7 Agarová elektroforéza

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,4 g agarózy (Agarose SERVA for DNA electrophoresis) a bylo přilito 40 ml TAE pufru (SERVA). Směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě. Na váhách byla zkontrolována hmotnost odpařené vody, kterou bylo nutno doplnit. Směs byla schlazena asi na 50°C. Následně byly přidány 4 μ l 10 000x koncentrované barvy SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Směs byla zamíchána a vлита do vaničky pro elektroforézu s vloženým hřebínkem na jamky, do kterých budou po zatuhnutí gelu pipetovány vzorky. Po 30-ti minutách tuhnutí byl vyjmut hřebínek. Gel byl umístěn do středu vaničky a zalit TAE pufrem ke značce maximálního objemu. Do

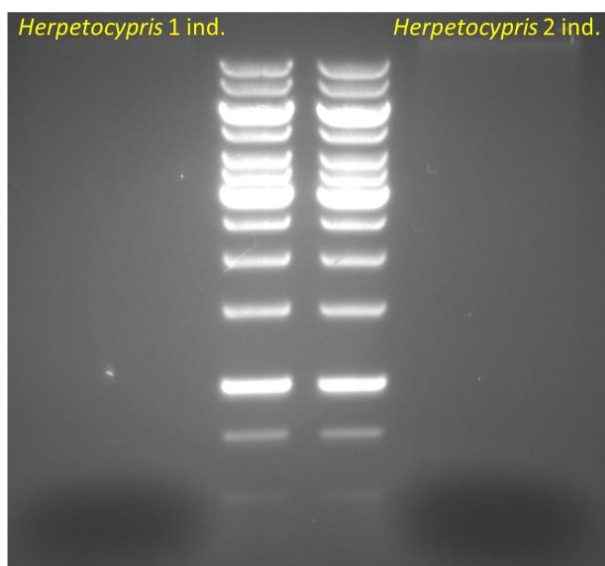
jamek bylo napipetováno 20 μl vzorků DNA po PCR reakci. Do první jamky bylo pro kontrolu nepipetováno 5 μl velikostní marker (hmotnostní standard). Vzorky, které neprošly PCR reakcí, byly obarveny barvou Blue Juice a to v poměru 6 μl na 50 μl objemu vzorku. Byly nasazeny elektrody a zapojeny do přístroje pro gelovou elektroforézu, na kterém byly nastaveny následující podmínky elektroforézy: 30 minut při napětí 200mA a proudu 100V. Gel byl následně prohlédnut pod UV světlem a obrázek byl vyfotografován digitální kamerou (viz **Obr. 6, 7**).

3.8 Sekvence, alignment a vypočítání GC obsahu

Pro sekvenaci rDNA byly použity zakoncentrované vzorky izolátů DNA. Do 1,5 μl zkumavek jsem napipetovala 5 μl vzorků a 5 μl primerů. Zkumavky jsem popsala a utěsnila pomocí parafinu. Následně byly vzorky s primery zaslány na sekvenaci. Získané sekvence jsem porovnávala se sekvencemi v databázi GenBank (Benson et al 2005) pomocí online programu BLAST (Altschul et al 1990). Pomocí programu BioEdit jsem všechny sekvence srovnala a vypočítala jejich GC obsah (Alzohairy 2011).

4 Výsledky

Pro vypracování protokolu pro izolaci DNA jsem využila tři jedince *Herpetocypris chevreuxi*. Získané množství DNA z jednoho jedince nebylo na elektroforetogramu patrné (viz. **Obr. 6**). Pomocí spektrofotometru jsme změřili koncentraci DNA a vyhodnotili jsme výtěžek 3,46 ng/ μl jako dostatečný (viz **Tab. 5**).

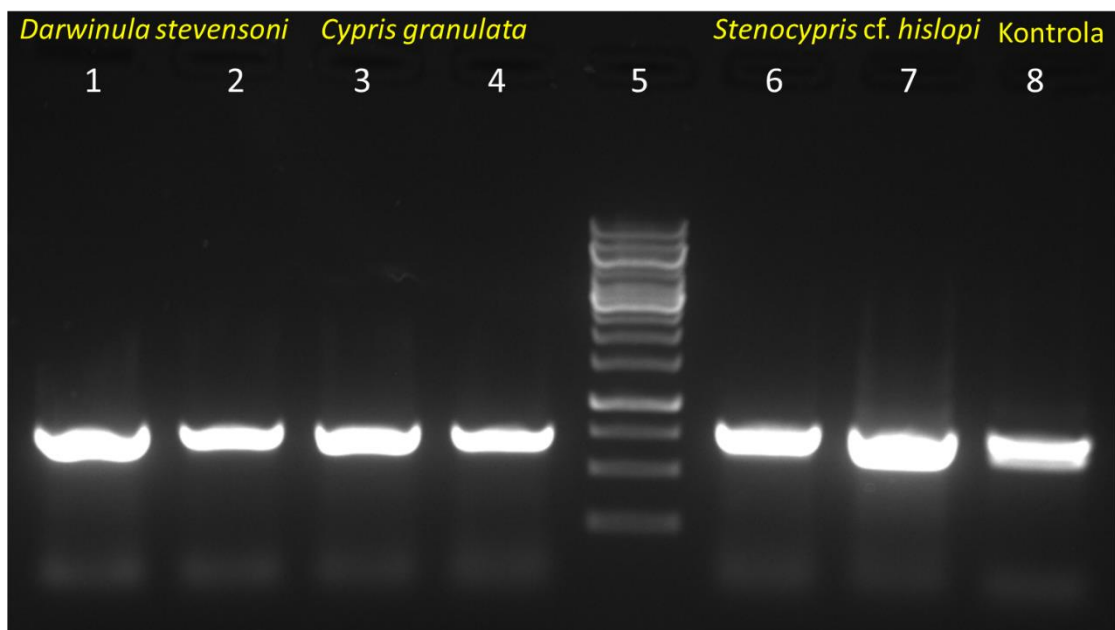


Obr. 6: Elektroforetogram testu izolace DNA z 1 a 2 jedinců druhu *Herpetocypris chevreuxi*. Vlevo izolát DNA z 1 jedince (v tabulce značeno A1 a A2). Uprostřed velikostní marker 1 kB. Vpravo izolát DNA ze 2 jedinců (v tabulce značeno B1 a B2). Detaily kvantifikace koncentrace DNA **Tab. 5**.

Tab. 5: Koncentrace izolované DNA stanovené pomocí NanoQuant Nuclei

NanoQuant Nucleic Acid Quantitation / Results: NA-Quant						
Sample dsDNA						
Well	260	230	280	ng/ μ l	Ratio 260/230	Ratio 260/280
A1	0,0038	0,0275	0,0012	3,78	0,14	3,14
A2	0,0035	0,0253	0,0013	3,46	0,14	2,70
B1	0,0082	0,0245	0,0033	8,22	0,34	2,50
B2	0,0075	0,0234	0,0032	7,54	0,32	2,34

Vzorky určené pro sekvenaci jsme zkoncentrovali, abychom zvýšili jejich obsah DNA asi 10 krát (výsledné koncentrace viz **Tab. 6**). Abychom zjistili, jestli budou vybrané primery správně nasedat, provedli jsme PCR amplifikaci zkoncentrovaných vzorků a následně jsme provedli elektroforézu. Na výsledném elektroforetogramu pak můžeme vidět, že došlo k žádoucí amplifikaci jednoho proužku o velikosti 500 – 750 bp u všech vzorků (viz **Obr. 7**).



Obr. 7: Elektroforetogram izolované DNA po PCR amplifikaci 28S rDNA. Vlevo, jamky 1 a 2, izolát DNA ze dvou jedinců *Darwinula stevensoni* (v tabulce označeno A1 a B1). Jamky 3 a 4 izolát DNA ze dvou jedinců *Cypris granulata* (v tabulce značeno C1a D1). Jamka 5 je velikostní marker 1kB. Jamky 6 a 7 izolát DNA *Stenocypris cf. hislopi* (v tabulce značeno E1 a F1). Zcela vpravo na okraji, jamka 8, negativní kontrola. Detaily kvantifikace koncentrace viz **Tab. 6**.

Tab. 6: Koncentrace izolované DNA po zkoncentrování

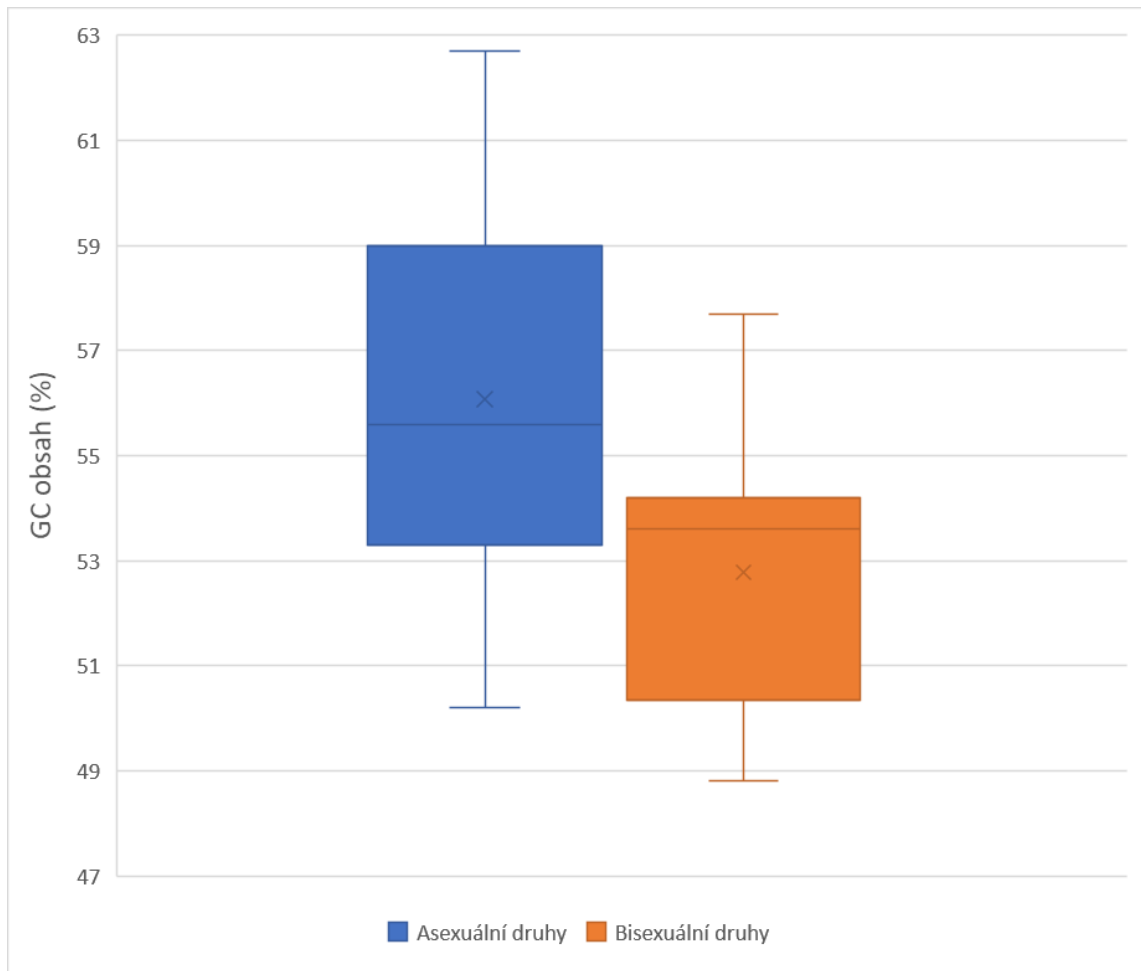
Vzorek	Koncentrace (ng/ μ l)
A1	4,87
B1	2,33
C1	3,84
D1	58,25
E1	29,72
F1	10,78

Získané sekvence byly analyzovány s pomocí programu BioEdit a v následující tabulce jsou zapsány výsledky výpočtu GC obsahu.

Tab. 7: GC obsah u analyzovaných sekvencí a způsoby rozmnožování druhů

Druh	GC obsah (%)	Způsob reprodukce
<i>Bradleyocypris vittata</i>	52	asexuální, samci v Thajsku
<i>Candona candida</i>	50,2	asexuální, samci ojedinele
<i>Cypretta seurati</i>	55,6	asexuální
<i>Cypria exculpta</i>	54,2	sexuální
<i>Cypridopsis adusta</i>	53,3	asexuální
<i>Cypridopsis uenoi</i>	55,2	asexuální
<i>Cypris granulata</i> 1 RSee	59,8	asexuální
<i>Cypris granulata</i> 1 RSmm	59,1	asexuální
<i>Cypris granulata</i> 2 RSee	59,4	asexuální
<i>Cypris granulata</i> 2 RSmm	58,9	asexuální
<i>Darwinula</i> sp.	58,4	asexuální, „ancient asexuals“
<i>Darwinula stevensoni</i> 1 RSee	56,6	asexuální, „ancient asexuals“
<i>Darwinula stevensoni</i> 1 RSmm	59	asexuální, „ancient asexuals“
<i>Darwinula stevensoni</i> 2 RSee	61,8	asexuální, „ancient asexuals“
<i>Darwinula stevensoni</i> 2 RSmm	62,7	asexuální, „ancient asexuals“
<i>Dolerocypris mukaishimensis</i>	50,9	sexuální
<i>Dolerocypris ikeyai</i>	57,7	sexuální
<i>Dolerocypris sinensis</i>	55,4	asexuální
<i>Eucypris pigra</i>	56,4	asexuální, sexuální v Německu
<i>Fabaeformiscandona kushiroensis</i>	49,8	sexuální
<i>Heterocypris incongruens</i>	54	asexuální, i sexuální populace
<i>Heterocypris salina</i>	51,4	asexuální
<i>Metacypris digitiformis</i>	53,6	sexuální
<i>Notodromas monacha</i>	48,8	sexuální
<i>Paracypris inujimensis</i>	51,8	sexuální
<i>Physocypris</i> cf. <i>biwaensis</i>	54	sexuální
<i>Physocypris nipponica</i>	54,2	sexuální
<i>Stenocypris</i> cf. <i>hislopi</i> 2 RSee	55,3	asexuální
<i>Stenocypris</i> cf. <i>hislopi</i> 2 RSmm	50,3	asexuální

Ze zpracovaných dat vyplývá, že GC obsah rRNA genů druhů s asexuálně rozmnožujících se lasturnatek je vyšší (asi o 2,7% mezi středními hodnotami těchto dvou souborů). Nejvyšší procentuální GC obsah, až 62,7 %, byl vypočítán u druhu *Darwinula stevensoni*. Sekvence druhu *Cypris granulata* pak obsahovaly asi 59 % GC. Naopak nejmenší procentuální obsah GC, 48,8 %, byl vypočítán u *Notodromas monacha*. V následujícím grafu jsou zaznamenány rozdíly mezi porovnávanými soubory.



Graf 1: Krabicový graf analýzy GC obsahu sekvencí 28S rRNA genů sladkovodních lasturnatek u asexuálních a bisexuálních druhů z GenBanku a sekvencí získaných v rámci této práce.

5 Diskuse

Cílem této práce bylo seznámení se se sladkovodními lasturnatkami a jejich preparací a determinací a v neposlední řadě porovnání GC obsahu rRNA genů mezi druhy s rozlišnými způsoby rozmnožování. Tyto cíle byly splněny. Vypracovala jsem laboratorní protokol pro izolaci rDNA z mikroskopických lasturnatek. Dále jsem vypracovala bioinformatický protokol vyhledávání relevantních sekvencí a stanovení GC obsahu rRNA genů pro budoucí komplexní analýzu napříč fylogenetickým stromem lasturnatek. Hlavní důraz byl u této práce kladen na asexuální druhy. Analýzou 28S rDNA sekvencí lasturnatek byl porovnán GC obsah mezi sexuálními a asexuálními druhy. Výsledky nám ukázaly malý rozdíl mezi těmito dvěma soubory. Sekvence asexuálních druhů byly překvapivě GC bohatší. Velmi GC bohaté pak byly rRNA geny druhu *Darwinula stevensoni* patřícího mezi tzv. „ancient asexuals“.

I přes zajímavost tohoto tématu mu zatím nebyla v literatuře věnována velká pozornost. Většina článků na téma GC obsahu se věnuje hlavně savcům a ptákům. Předpokládali jsme, že u bisexuálních druhů lasturnatek bude GC obsah rRNA genů vyšší. Tato hypotéza vychází z existence tzv. GC vychýlené genové konverze (GC-biased gene conversion, gBGC) u sexuálně rozmnožujících se organismů. K vychýlení dochází při DNA reparačních procesech, což má za následek, že meiotická segregace upřednostňuje GC bohaté alely oproti AT bohatým alelám. Následkem je zvýšení GC obsahu (Romiguier et al. 2010). Marais et al. (2001) uvádí, že GC obsah pozitivně koreluje s lokálním rekombinačním tempem u druhu *Drosophila melanogaster*. Tato korelace je velmi slabá, ale naznačuje, že má GC vychýlená konverze dopad na GC obsah genomu octomilky. Tento proces tedy může působit i na genom bezobratlých živočichů.

Ribozomální geny mnou zkoumaného datasetu sexuálně se rozmnožujících lasturnatek byly GC chudší. Genom asexuálních druhů by neměl být ovlivněn gBGC, a proto jejich GC bohatost musí být ovlivněna jinými faktory. Marsolier-Kergoat (2013) ve své práci o asexuálních kvasinkách druhů *Candida albicans* a *C. dubliniensis* navrhuje ovlivnění genů mitotickou rekombinací při reparačních procesech nebo rekombinačními chybami. Překvapivé výsledky byly vysoké procenta GC bází u zástupce tzv. „ancient asexuals“, *Darwinula stevensoni*. U tohoto druhu existuje nízká genetická variabilita spojená s nízkým substitučním tempem, které může být způsobeno několika různými procesy (Mindell & Thacker 1996). Tyto procesy lze rozdělit do dvou kategorií: 1. vlivy na tempo mutace a 2. vliv na tempo fixace alel. Nízké tempo mutací je ještě dále snižováno reparačními procesy (Schön et al. 2000). Jelikož by u asexuálních druhů měla být selekce pro redukci mutability silnější než bisexuálních druhů (Hurst & Peck 1996), mohly by u „ancient asexuals“ být zvýhodněny vysoce účinné DNA reparační mechanismy (Schön et al. 2000). Pro lepší objasnění těchto výsledků je nutná další studie, která bude realizovaná v podobě mé diplomové práce.

Při laboratorní části práce a analýze dat jsme narazili na několik problémů. Jedním z nich byla negativní kontrola, která vyšla pozitivně (viz **Obr. 7**). Směs pro negativní kontrolu se skládá pouze z reagentů PCR bez templátové DNA, proto by neměl být na

elektroforetogramu žádný proužek. Vysvětlením by mohlo být, že použité kvasinkové primery, které jsou univerzální pro všechna eukaryota, mohly nasednout na rDNA nějakého biologického znečištění této směsi (kožní buňka, buňka kvasinky ve vodě). Další problém vyvstal při použití BLASTu pro porovnání námi získaných sekvencí s již existujícími sekvencemi v databázi GenBank (Benson et al 2005). Z dvanácti sekvencí vyprodukovaných v rámci této práce byla většina identifikována jako lasturnatčí DNA. Pouze u dvou sekvencí vzorku *Stenocypris cf. hislopi* 1 byla asi polovina sekvence identifikována jako DNA zelených řas. Vysvětlením tohoto výsledku by mohlo být, že zelená řasa se mohla uchytit na schránce nebo se mohly větší zbytky řasy nacházet v trávicí soustavě lasturnatky.

Tato práce by měla sloužit jako stavební kámen pro další komplexnější analýzu AT/GC složení DNA lasturnatek. V budoucnu je tedy nutné použít větší soubor dat pro přesnější výsledky. Budoucí práce by také měla být podstatně rozšířena o další druhy patřící do skupiny Darwinuloidea (které jsou již k dispozici).

6 Závěr

- Zkoumala jsem rozdíl v GC bohatosti mezi bisexuálními a partenogenetickými druhy sladkovodních lasturnatek.
- K tomu jsem využila sekvence 28S rDNA ribozomálních genů (10 vlastních sekvencí a 19 stažených z GenBank).
- U asexuálně rozmnožujících se lasturnatek byla rDNA GC bohatší.
- Velmi GC bohaté rRNA geny patřily překvapivě zástupcům tzv. „ancient asexuals“.
- Touto prací jsem úspěšně položila základy pro svou navazující diplomovou práci a budoucí systematický výzkum.

7 Seznam použitých zdrojů

ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W. & LIPMAN D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* [online]. 215(3), 403–410. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

ALZOHAIRY A. M. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. [online]. 2(1): 60-61. Dostupné z: https://www.gerfbb.com/images/upload/article/pdf/1387127438_Alzohairy%20et%20al%202011.pdf

BASSETTI M. - A., CARBONEL P., SIERRA F. J., PEREZ-FOLGADO M., JOUËT G. & BERNÉ S. 2010. Response of ostracods to abrupt climate changes in the Western Mediterranean (Gulf of Lions) during the last 30kyr. *Marine Micropaleontology* [online]. 77(1–2), 1–14. ISSN 03778398. Dostupné z: doi:10.1016/j.marmicro.2010.06.004

BENSON D. A., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D. J., OSTELL J. & WHEELER D. L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Research* [online]. 33(suppl_1), D34–D38. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki063

BODE S. N. S., ADOLFSSON S., LAMATSCH D. K., MARTINS M.J.F., SCHMIT O., VANDEKERKHOVE J., MEZQUITA F., NAMIOTKO T., ROSSETTI G., SCHÖN I., BUTLIN R. K. & MARTENS K., 2010. Exceptional cryptic diversity and multiple origins of parthenogenesis in a freshwater ostracod. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. 54(2), 542–552. ISSN 10557903. Dostupné z: doi:10.1016/j.ympev.2009.08.022

BOWMAN T. E. 1971. The Case of the Nonubiquitous Telson and the Fraudulent Furca. *Crustaceana*. 21. 165-175. 10.1163/156854071X00373.

BOXSHALL G. A., DANIELOPOL D., HORNE D. J., SMITH R. J. & TABACARU I. 2010. A critique of biramous interpretations of the crustacean antennule. *Crustaceana* [online]. 83, 153–167. Dostupné z: doi:10.1163/001121609X12530988607434

BRANDÃO S. N., ANGEL M. V., KARANOVIC I., PERRIER V. & MEIDLA T. 2019. World Ostracoda Database. Dostupné z: <http://www.marinespecies.org/ostracoda> on 2019-04-09

BRONSHTEIN Z. S. 1947. Fresh-water Ostracoda Fauna of the USSR Crustaceans, 2(1) Russian Translation. Oconian Press, New Delhi, English translation 1988

BUTLIN R., SCHÖN I. & MARTENS K. 1998. Asexual reproduction in nonmarine ostracods. *Heredity* [online]. 81(5), 473. ISSN 1365-2540. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2540.1998.00454.x

- CASTRO S., HLEAP J., CÁRDENAS H. & BLOUIN CH. 2015. Molecular Organization of the 5s rDna Gene Type II in Elasmobranchs. *RNA biology* [online]. **13**, 391–399. Dostupné z: doi:10.1080/15476286.2015.1100796
- CONRAD D. F., PINTO D., REDON R., FEUK L., GOKCUMEN O., ZHANG Y., AERTS J., ANDREWS T. D., BARNES CH., CAMPBELL P., FITZGERALD T., HU M., IHM CH. W., KRISTIANSOON K., MACARTHUR D. G., MACDONALD J. R., ONYIAH I., PANG A.W.CH., ROBSON S., STIRRUPS K., VALSESIA A., WALTER K., WEI J., TYLER-SMITH CH., CARTER N. P., LEE CH., SCHERER S. W. & HURLES M. E. 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* [online]. **464**(7289), 704–712. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08516
- CRISTESCU M. E., ADAMOWICZ S. J., VAILLANT J. J. & HAFFNER D. G. 2010. Ancient lakes revisited: from the ecology to the genetics of speciation. *Molecular Ecology* [online]. **19**(22), 4837–4851. ISSN 1365-294X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04832.x
- DINMAN J. 2005. 5S rRNA: Structure and Function from Head to Toe. *International journal of biomedical science : IJBS*. **1**, 2–7.
- DION-CÔTÉ A. - M., SYMONOVÁ R., RÁB P. & BERNATCHEZ L. 2015. Reproductive isolation in a nascent species pair is associated with aneuploidy in hybrid offspring. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **282**(1802) [vid. 2019-05-20]. ISSN 0962-8452. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2014.2862
- ESCOBAR J. S., GLÉMIN S. & GALTIER N. 2011. GC-Biased Gene Conversion Impacts Ribosomal DNA Evolution in Vertebrates, Angiosperms, and Other Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **28**(9), 2561–2575. ISSN 1537-1719, 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msr079
- FORSDYKE D. R. 2016. *Evolutionary bioinformatics*. New York, NY: Springer Science+Business Media. ISBN 978-3-319-28753-9.
- GALTIER N., PIGANEAU G., MOUCHIROUD D. & DURET L. 2001. GC-Content Evolution in Mammalian Genomes: The Biased Gene Conversion Hypothesis. *Genetics*. **159**, 907–11.
- HARTMANN G. 1966. Ostracoda 1. – Bronns, Klassen und Ordnungen des Tierreichs, 5 Band: Arthropoda, I. Abteilung: Crustacea. Akademische Verlagsgesellschaft, Geest & Portig K. - G, Leipzig.
- HARTWELL L. H. 2008. *Genetics: From Genes to Genomes*, 3rd Edition. McGraw-Hill, U.S.A
- HENRAS A. K., PLISSON-CHASTANG C., O'DONOHUE M. - F., CHAKRABORTY A. & GLEIZES P. - M. 2015. An overview of pre-ribosomal RNA

processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* [online]. **6**(2), 225–242. ISSN 1757-7012. Dostupné z: doi:10.1002/wrna.1269

HORNE D. J., BALTANAS A. & PARIS G. 1998. Geographical distribution of reproductive modes in living non-marine ostracods. In: Martens K ed. Sex and parthenogenesis, evolutionary ecology of reproductive modes in non-marine ostracods. Leiden: Backhuys Publishers, 77–99.

HORNE D. J., COHEN A. & MARTENS K. 2002. Taxonomy, Morphology and Biology of Quaternary and Living Ostracoda. In: *The Ostracoda: Applications in Quaternary Research* [online]. B.m.: American Geophysical Union (AGU), s. 5–36 [vid. 2019-05-20]. ISBN 978-1-118-66868-9. Dostupné z: doi:10.1029/131GM02

HURST L. D. & PECK J. R. 1996. Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. **11**(2), 46–52. ISSN 0169-5347. Dostupné z: doi:10.1016/0169-5347(96)81041-X

IDE S., MIYAZAKI T., MAKI H. & KOBAYASHI T. 2010. Abundance of Ribosomal RNA Gene Copies Maintains Genome Integrity. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **327**, 693–6. Dostupné z: doi:10.1126/science.1179044

JUDSON P. O. & NORMARK B. B. 1996. Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology and Evolution*. **11**, 41–46.

KEYSER D. & ALADIN N. 2004. Noding in *Cyprideis torosa* and its causes. *Studia Quaternaria*. **21**.

KOBAYASHI T. 2008. A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus--rDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays* [online]. **v. 30**(3), 267–272. Dostupné z: doi:10.1002/bies.20723

KOBAYASHI T., 2014. Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* [online]. **90**(4), 119–129. ISSN 0386-2208. Dostupné z: doi:10.2183/pjab.90.119

KOBAYASHI T., HECK D. J., NOMURA M. & HORIUCHI T. 1998. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes & Development*. **12**(24), 3821–3830. ISSN 0890-9369.

LAKE BIWA MUSEUM., 2019. *Lake Biwa Museum, Japan* [online] [vid. 2019-05-16]. Dostupné z: <https://www.biwahaku.jp/english/facts/index.html>

LIAO D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics*. **64**(1), 24–30. ISSN 0002-9297.

- MARTENS, K., ROSSETTI, G. & HORNE, D. J., 2003. How ancient are ancient asexuals? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. **270**(1516), 723–729. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2002.2270
- MARAIS G., MOUCHIROUD D. & DURET L. 2001. Does recombination improve selection on codon usage? Lessons from nematode and fly complete genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **98**(10), 5688–5692. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.091427698
- MARSOLIER-KERGOAT M. - C. 2013. Models for the Evolution of GC Content in Asexual Fungi *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Genome biology and evolution* [online]. **5**. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evt170
- MATZKE-KARASZ R., NEIL J. V., SMITH R. J., SYMONOVA R., MO KOVSKY L., ARCHER M., HAND S. J., CLOETENS P. & TAFFOREAU P. 2014. Subcellular preservation in giant ostracod sperm from an early Miocene cave deposit in Australia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **281**(1786), 20140394–20140394. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.2014.0394
- MEISCH C. 2000. Freshwater Ostracoda of Western and Central Europe. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- MEISCH C. 2007. On the origin of the putative furca of the Ostracoda (Crustacea). *Hydrobiologia* [online]. **585**(1), 181–200. ISSN 1573-5117. Dostupné z: doi:10.1007/s10750-007-0637-2
- MEISCH C., SMITH R. J. & MARTENS, K. 2019. A subjective global checklist of the extant non-marine Ostracoda (Crustacea). *European Journal of Taxonomy*, 492, 1-135.
- MINDELL D. & THACKER CH. E., 1996. Rates of molecular evolution: Phylogenetic issues and applications. *Annual Review of Ecology and Systematics* [online]. **27**, 279–303. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ecolsys.27.1.279
- MORKHOVEN VAN F. P. C. M. 1962. *Post-palaeozoic Ostracoda: their morphology, taxonomy and economic use*. Elsevier, Amsterdam; New York.
- MÜLLER H. J. 1932. Some Genetic Aspects of Sex. *The American Naturalist* [online]. **66**(703), 118–138. ISSN 0003-0147. Dostupné z: doi:10.1086/280418
- MÜLLER H. J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res.* roč. 106, s. 2–9. PMID 14195748. (původní studie citovaná v Maynard Smith J; Szathmary E. The major transitions in evolution. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1997.; Futuyma DJ. Evolutionary biology. 3.. vyd. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1998.)
- NISHINO M. 2012. Biodiversity of Lake Biwa. In: Hiroya KAWANABE, Machiko NISHINO a Masayoshi MAEHATA, ed. *Lake Biwa: Interactions between Nature and People* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 31–153 [vid. 2019-05-16]. ISBN 978-94-007-1782-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-1783-1_2

- OZAWA H. 2013. The History of Sexual Dimorphism in Ostracoda (Arthropoda, Crustacea) Since the Palaeozoic. *Sexual Dimorphism* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: doi:10.5772/55329
- PARKER M. S., SALLEE F. R., PARK E. A. & PARKER S. L. 2015. Homoiterons and expansion in ribosomal RNAs. *FEBS Open Bio* [online]. **5**(1), 864–876. ISSN 2211-5463. Dostupné z: doi:10.1016/j.fob.2015.10.005
- PIKAARD C. 2000. *Nucleolar dominance: Uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids* [online]. Dostupné z: doi:10.1023/A:1006471009225
- POROKHOVNIK L. & GERTON J. L. 2019. Ribosomal DNA-connecting ribosome biogenesis and chromosome biology. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.*
- ROMIGUIER J., RANWEZ V., DOUZERY E. J. P. & GALTIER N. 2010. Contrasting GC-content dynamics across 33 mammalian genomes: Relationship with life-history traits and chromosome sizes. *Genome Research* [online]. **20**(8), 1001–1009. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.104372.109
- SCHÖN I. & MARTENS K. 2004. Adaptive, pre-adaptive and non-adaptive components of radiations in ancient lakes: a review. *Organisms Diversity & Evolution* [online]. **4**(3), 137–156. ISSN 1439-6092. Dostupné z: doi:10.1016/j.ode.2004.03.001
- SCHÖN I. & MARTENS K. 2016. Ostracod (Ostracoda, Crustacea) genomics — Promises and challenges. *Marine Genomics* [online]. **29**, 19–25. ISSN 1874-7787. Dostupné z: doi:10.1016/j.margen.2016.03.008
- SCHÖN I., BUTLIN R. K., GRIFFITHS H. I. & MARTENS K. 1998. Slow molecular evolution in an ancient asexual ostracod. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. **265**(1392), 235–242. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.1998.0287
- SCHÖN I., GANDOLFI A., E. di MASSO, ROSSI V., GRIFFITHS H. I., MARTENS K. & BUTLIN R. K. 2000. Persistence of asexuality through mixed reproduction in *Eucypris virens* (Crustacea, Ostracoda). *Heredity* [online]. **84**(2), 161. ISSN 1365-2540. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00647.x
- SMITH R. J. 2019. *Ostracod Research at the Lake Biwa Museum, Robin J. Smith* [online] [vid. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.biawahaku.jp/smith/about.html>
- SMITH R. J. & JANZ H. 2009. Recent Ostracods of the Superfamilies Cytheroidea and Darwinuloidea (Crustacea) from Lake Biwa, a Japanese Ancient Lake. *Species Diversity* [online]. **14**(3), 217–241. ISSN 1342-1670, 2189-7301. Dostupné z: doi:10.12782/specdiv.14.217

SMITH R. J. & MARTENS K. 2000. The ontogeny of the cypridid ostracod *Eucypris virens* (Jurine, 1820) (Crustacea, Ostracoda). In: David J. HORNE a Koen MARTENS, ed. *Evolutionary Biology and Ecology of Ostracoda* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 31–63 [vid. 2019-04-02]. ISBN 978-90-481-5499-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-1508-9_3

SMITH R. J. & MATZKE-KARASZ R. 2008. The organ on the first segment of the cypridoidean (Ostracoda, Crustacea) antennule: morphology and phylogenetic significance. *Senckenbergiana lethaea* [online]. **88**(1), 127–140. ISSN 0037-2110. Dostupné z: doi:10.1007/BF03043984

SMITH R. J. & TSUKAGOSHI A. 2005. The chaetotaxy, ontogeny and musculature of the antennule of podocopan ostracods (Crustacea). *Journal of Zoology* [online]. **265**(2), 157–177. ISSN 0952-8369, 1469-7998. Dostupné z: doi:10.1017/S095283690400617X

SOCHOROVÁ J., GARCIA S., GÁLVEZ F., SYMONOVÁ R. & KOVAŘÍK A. 2018. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* [online]. **127**(1), 141–150. ISSN 1432-0886. Dostupné z: doi:10.1007/s00412-017-0651-8

SYMONOVÁ R. 2005. Lasturnatky: Unikátní evolučně-ekologický model. *Vesmír* **84**, 466, 2005/8 .

SYMONOVÁ R. 2007. Ultrastructure of hepatopancreas and its possible role as a hematopoietic organ in non-marine cypridoidean ostracods (Crustacea). *Hydrobiologia* [online]. **585**(1), 213–223. ISSN 0018-8158, 1573-5117. Dostupné z: doi:10.1007/s10750-007-0639-0

SYMONOVÁ R. Microanatomy and cytogenetics of non-marine ostracods: an insight into evolutionary biology of their reproductive modes. Ph.D. Thesis, Charles University, Prague, Czech Republic, 2009

SYMONOVÁ R. 2019. Integrative rDNAomics—Importance of the Oldest Repetitive Fraction of the Eukaryote Genome. *Genes* [online]. **10**(5), 345. Dostupné z: doi:10.3390/genes10050345

SYMONOVÁ R., VRBOVÁ I., LAMATSCH K. D., PAAR J., MATZKE-KARASZ R., SCHMIT O., MARTENS K. & MÜLLER S. 2018. Karyotype Variability and Inter-Population Genomic Differences in Freshwater Ostracods (Crustacea) Showing Geographical Parthenogenesis. *Genes* [online]. **9**(3), 150. Dostupné z: doi:10.3390/genes9030150

TANAKA G. 2006. Functional morphology and light-gathering ability of podocopid ostracod eyes and the palaeontological implications. *Zoological Journal of the Linnean Society* [online]. **147**(1), 97–108. ISSN 0024-4082. Dostupné z: doi:10.1111/j.1096-3642.2006.00216.x

VARRIALE A., TORELLI G. & BERNARDI G. 2008. Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. *RNA (New York, N.Y.)* [online]. **14**, 1492–500. Dostupné z: doi:10.1261/rna.957108

VICTOR R. & FERNANDO C.H. 1981. An illustrated key to the freshwater Ostracod genera of the Oriental region [online]. [vid. 2019-05-20]. Dostupné z: https://www.academia.edu/1646765/An_illustrated_key_to_the_freshwater_Ostracod_genera_of_the_Oriental_region

WANG H. - CH., XIA X. & HICKEY D. 2006. Thermal Adaptation of the Small Subunit Ribosomal RNA Gene: A Comparative Study. *Journal of molecular evolution* [online]. **63**, 120–6. Dostupné z: doi:10.1007/s00239-005-0255-4

WIEMERS H., KELLER A. & WOLF M. 2009. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatus). *BMC Evolutionary Biology* [online]. **9**(1), 300. ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-9-300

YASUHARA M., CRONIN T., HUNT G. & HODELL D. A. 2009. Deep-Sea Ostracods from the South Atlantic Sector of the Southern Ocean during the Last 370,000 Years. *Journal of Paleontology* [online]. **83**, 914–930. Dostupné z: doi:10.1666/08-149.1