Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra botaniky

obor: systematika a ekologie bezcévných rostlin

bakalářská seminární práce

Molekulární fylogenetika rodu *Synura* (Synurophyceae, Heterokontophyta)

Anna Kynčlová

Praha 2007

školitel:

Mgr. Pavel Škaloud

ABSTRAKT

Má bakalářská práce sestává ze dvou částí. Jendou z nich je literární rešerše, druhá z nich je část praktická, obsahující vlastní výsledky.

V první části své práce se věnuji literární rešerši, ve které shrnuji dosavadní poznatky o fylogenetice rodu *Synura* a třídy Synurophyceae. Sleduji vývoj klasifikace a vnitřního členění rodu *Synura* od historie až po současné názory. Porovnávám také dnešní a dřívější přístupy ke studiu fylogenetiky tohoto rodu. Zabývám se blíže biogenezí a morfologií struktur křemičitých šupin, které pokrývají povrch buňky zástupců třídy Synurophyceae a které jsou určující pro determinaci těchto organismů. Dále se věnuji problematice vymezení rodu *Synura* v rámci třídy Synurophyceae.

Ve druhé části své bakalářské práce popisuji a optimalizuji metody, potřebné pro další studium v této oblasti, zejména pro izolaci a kultivaci rodu *Synura*, izolaci DNA z kultur a amplifikaci potřebných sekvencí pomocí PCR. Uvádím důležité protokoly a změny v postupech metod. Dále uvádím postup a prezentuji výsledky své předběžné fylogenetické analýzy. Tato analýza otevírá zajímavé otázky, týkající se směru vývoje struktur zmíněných křemičitých šupin, variability v rámci druhu *Synura* petersenii či monofylie rodu *Synura*.

Klíčová slova:

Synura, Synurophyceae, molekulární fylogenetika, optimalizace, křemičité šupiny

ABSTRACT

My bachelor thesis consists of two parts, one of them is a literature search and the other one is practical and contains my own results.

The first part of my bachelor thesis, the literature search, is an overview of the facts about the phylogeny of the genus *Synura* and the class Synurophyceae known up to now. The study includes a recapitulation of the history of classification and subdivision of the genus *Synura* up until the recent opinions. Older approaches in the phylogenetic studies of this genus are compared with the latest ones. I also focus on the biogenesis and morphology of the silica scales, which cover the cell surfaces of members of the class Synurophyceae. The scales are crucial for determination of these organisms. The problematic definition of the genus *Synura* in the context of the class Synurophyceae is also examined.

The second part of the bachelor thesis contains description of the methods needed for future studies in this field and optimization of the methods, especially of isolation and cultivation of the genus *Synura*, DNA extraction and amplification of the sequences by means of PCR. The important protocols and changes in the methods are described.

In this part I also describe the technique and present the results of my preliminary phylogenetic analysis. This analysis opens several interesting problems related to direction of evolution of the silica scales, intraspecific variability of *Synura* petersenii or the problem of *Synura* monophyly.

1. ÚVOD 3
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE 3
2.1. Třída Synurophyceae 3
2.2. Historický přehled 4
2.3. Současný stav 4
2.4. Rod Synura 6
2.5. Křemičité šupiny rodu *Synura* 6
2.6. Fylogenetika rodu *Synura* 11
3. OPTIMALIZACE METOD 17
3.1. Úvod do metodiky 17
3.2. Materiál a metody 18
3.2.1. Vybavení 18
3.2.2. Použité kmeny 19
3.2.3. Získání vzorků, izolace a kultivace 20
3.2.4. Příprava vzorků a EM 20
3.2.4.1. Příprava sítěk s formvarvou blankou 20
3.2.4.2. Nanesení a pozorování vzorků 21
3.2.5. Izolace DNA metodou CTAB 22
3.2.6. Izolace DNA pomocí kitu JetQuick Tissue. 23
3.2.7. Měření koncentrace DNA 25
3.2.8. PCR 26
3.2.8.1. Použité primery 26
3.2.8.2. Použité cykly a gradienty 26
3.2.8.3. Použité mastermixy pro PCR 28
3.2.8.4. Použité kombinace faktorů důležitých pro PCR 29
3.2.8.5. Ředění DNA pro PCR 31
3.2.8.6. Postup PCR a čištění produktu 31
3.2.9. Příprava gelu a elektroforéza 32
3.2.10. Sekvenační reakce čtvrtinová 33
3.2.11. Srážecí reakce 33
3.2.12. Sekvenace 34
3.3. Vlastní výsledky 35
3.3.1. Vlastní kultury 35
3.3.2. Izolace DNA 36
3.3.3. PCR 38
3.3.3.1. PCR I 38
3.3.3.2. PCR II 38
3.3.3.3. PCR III 39
3.3.3.4. PCR IV 39
3.3.3.5. PCR V 39
3.3.4. Přečištění PCR produktu, sekvenační PCR a srážení 41
3.4. Diskuse 42
3.4.1. Izolace a kultivace rodu *Synura* 42
3.4.2. Izolace DNA 42
3.4.3. PCR 43

3.4.4. Sekvenační PCR 44
3.5. Shrnutí 45
4. PŘEDBĚŽNÁ FYLOGENETICKÁ ANALÝZA 46
4.1. Úvod 46
4.2. Materiál a metody 47
4.2.1. Použité sekvence 47
4.2.2. Zpracování sekvencí 49
4.3. Výsledky a diskuse 49
5. ZÁVĚR 57
6. POUŽITÉ ZKRATKY 58
7. PODĚKOVÁNÍ 59
8. LITERATURA 60

1. ÚVOD

Cílem této práce je shrnutí dosavadních poznatků o fylogenetických vztazích týkajících se rodu *Synura*, seznámení se s metodami potřebnými pro jejich studium, jejich zvládnutí a optimalizace těchto metod.

Tato práce by se tedy měla stát jakýmsi odrazovým můstkem pro práci diplomovou, která by mohla přispět k rozřešení mnohých otázek kolem vztahů jednotlivých druhů rodu *Synura* a postavení tohoto rodu v rámci třídy Synurophyceae. Klíčovou otázkou je, zda dnešní rozdělení druhů do sekcí na základě morfologie křemičitých šupin opravdu odpovídá přirozenosti, dále otázky spojené se směrem vývoje křemičitých šupin a se skutečnou druhovou diverzitou tohoto rodu. Protože některé fylogenetické studie zpochybňují monofylii rodu *Synura* (Wee, 1997, Andersen, 1999), budu se ve své rešerši věnovat také třídě Synurophyceae jako celku.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1. Třída Synurophyceae

Synurophyceae (Andersen, 1987) jsou sladkovodní heterokontní bičíkovci žijící volně nebo v koloniích, s charakteristickými křemičitými šupinami, skladbou pigmentů a ultrastrukturou. Do této třídy s jediným řádem Synurales řadíme dnes čeleď Synuraceae s rody *Synura*, *Chrysodidymus*, *Tessellaria*, *Chlorodesmos*, a čeleď Mallomonadaceae s rody *Mallomonas* a *Conradiella* (Kristiansen & Preisig, 2001). Rod *Chlorodesmos* je však misinterpretace druhu *Synura spinosa* (Calado & Rino, 1994). Spekuluje se také o rodu *Chrysodidymus*, jehož křemičité šupiny jsou nápadně podobné šupinám druhu *Synura sphagnicola*, ovšem byly u něj nalezeny ultrastrukturální znaky, které ho od rodu *Synura* odlišují (Graham et al., 1993). V případě rodu *Conradiella* se pravděpodobně ve skutečnosti jedná o *Mallomonas* (Lavau et al., 1997).

Jako nejbližší příbuzní třídy Synurophyceae se ukazují být zástupci sesterské třídy Chrysophyceae (např. Ariztia et al., 1991, Sorhannus, 2001, Goertzen & Theriot, 2003).

Pozice těchto dvou tříd v rámci oddělení Heterokontophyta je zatím nejasná a dokonce i samotná existence třídy Synurophyceae je některými autory zpochybňována (Cavalier-Smith, 1993a).

2.2. Historický přehled

Historie třídy Synurophyceae je pevně spojena s její blízce příbuznou třídou Chrysophyceae. *Synura* byla poprvé pozorována a popsána Ehrenbergem (1835), který se však o ní nezmiňuje jako o řase. Stein (1878) sjednotil rod *Synura* a ostatní bičíkovce s typickou zlatou barvou chloroplastu do Chrysomonadida. K nim poté Klebs (1893a) přičlenil amoebovité organismy s podobným chloroplastem a odhalil jejich příbuznost s Phaeophyceae. Název Chrysophyceae byl poprvé použit Pascherem (1912), který tuto třídu zařadil společně s Xanthophyceae a Bacillariophyceae do Chrysophyta. Postupně rozvíjel a upravoval svou horizontální taxonomii, založenou na stupních organizace stélek, paralelních u různých skupin řas. Dnešní Synurophyceae v tomto systému zaujímaly místo ve třídě Chrysomonadineae (Pascher, 1931). Bourrelly (1957) sjednotil chrysomonády s křemičitými šupinami do čeledi Synuraceae, která tudíž obsahovala i rody dnes řazené do třídy Chrysophyceae, jakým je např. rod *Paraphysomonas*.

S vynálezem a rozšířením elektronového mikroskopu (EM) byly objevovány nové struktury uvnitř buněk i na jejich povrchu. Na základě zjištěných znaků došlo k vytvoření nového systému uspořádání organismů. Byl ustanoven řád Synurales (Andersen, 1985), který náleží do třídy Synurophyceae (Andersen 1987). Na základě poznatků o ultrastruktuře pak vytvořil Preisig nový systém pro třídu Chrysophyceae (Preisig, 1995).

2.3. Současný stav

Podle Andersena (1987) se třída Synurophyceae liší od organismů spadajících do třídy Chrysophyceae v několika morfologických i fyziologických znacích.

Na rozdíl od třídy Chrysophyceae, postrádají zástupci třídy Synurophyceae chlorofyl c2, obsahují pouze chlorofyly a a c1. Bičíky jsou uloženy paralelně a také

bičíkové kořeny jsou značně odlišné. Kořen R1 obkružuje proti směru hodinových ručiček báze obou bičíků, R3 začíná u rhizoplastu a pokračuje podél R1 do zadní části buňky. Kořeny R2 a R4 jsou velice redukované. Další rozdíl se týká endoplazmatického retikula, které není nebo téměř není spojené s jadernou membránou.

Rozdíly je možné najít také v tvorbě a morfologii křemičitých šupin, které pokrývají buňku pravděpodobně všech zástupců třídy Synurophyceae a některých zástupců třídy Chrysophyceae, například u rodu *Paraphysomonas* či *Chrysosphaerella*. Tyto šupiny se u třídy Synurophyceae tvoří v silikon-depozitním váčku (SDV), který se nalézá při vnějším okraji chloroplastu, tedy přesněji podél té části endoplazmatického retikula, která pokrývá jeho povrch, zatímco u třídy Chrysophyceae vzniká z cytoplazmického endoplazmatického retikula (McGrory and Leadbeater, 1981). Šupiny u Synurophycee jsou navíc bilaterálně symetrické a mohou se zde vyskytovat i šupiny organické jak na povrchu buněk, tak i na bičíku. Zatímco u Chrysophyceae jsou šupiny rozprostřeny v podstatě náhodně, zde jsou rozmístěny pravidelně, s anteriorními konci přesahujícími posteriorní konce dalších šupin.

Dalším důležitým znakem je absence stigmatu. Jako fotoreceptor zde fungují dvě bičíkové ztlustliny.

Cavalier-Smith (1993a) však všechny tyto znaky považuje za sekundární adaptace a simplifikace, které sice odlišují skupinu organismů od ostatních, avšak nemohou z této skupiny udělat samostatnou třídu. Na základě své analýzy 18S rRNA navrhuje dosti odlišný systém, ve kterém zařadil zástupce Synurophyceae (sensu Andersen) do řádu Synurales, dále ustanovil třídu Chrysomonadea, která přibližně odpovídá dosud uznávané třídě Chrysophyceae, ovšem obsahuje také zmíněný řád Synurales. Ten je sesterský řádům Chromulinales, Paraphysomonadales, Hibberdiales a dvěma skupinám, na které se rozpadá řád Ochromonadales.

Toto přeřazení Synurophyceae zpět mezi Chrysophyceae potvrzují také další studie, ve kterých je umístění třídy Synurophyceae mezi třídu Chrysophyceae podle stromů LSU RuBisCo (velká podjednotka ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza) a 18S rRNA slabě podpořeno. Na konkatenovaných stromech 18S/28S rRNA je pak umístění třídy Synurophyceae mezi třídu Chrysophyceae podpořeno dokonce velice silně (Ben Ali et al. 2001).

Potvrzení těchto výsledků by znamenalo parafýlii třídy Chrysophyceae a nutnost opustit myšlenku samostatné třídy Synurophyceae. Andersen (1999) ovšem poukazuje na to, že ve zmíněných studiích nebyl bootstrap tak vysoký, aby mohla být parafýlie třídy Chrysophyceae prokázána, a zařazení Synurophyceae zpět mezi Chrysophyceae podložené pouze těmito studiemi považuje za unáhlené.

2.4. Rod Synura

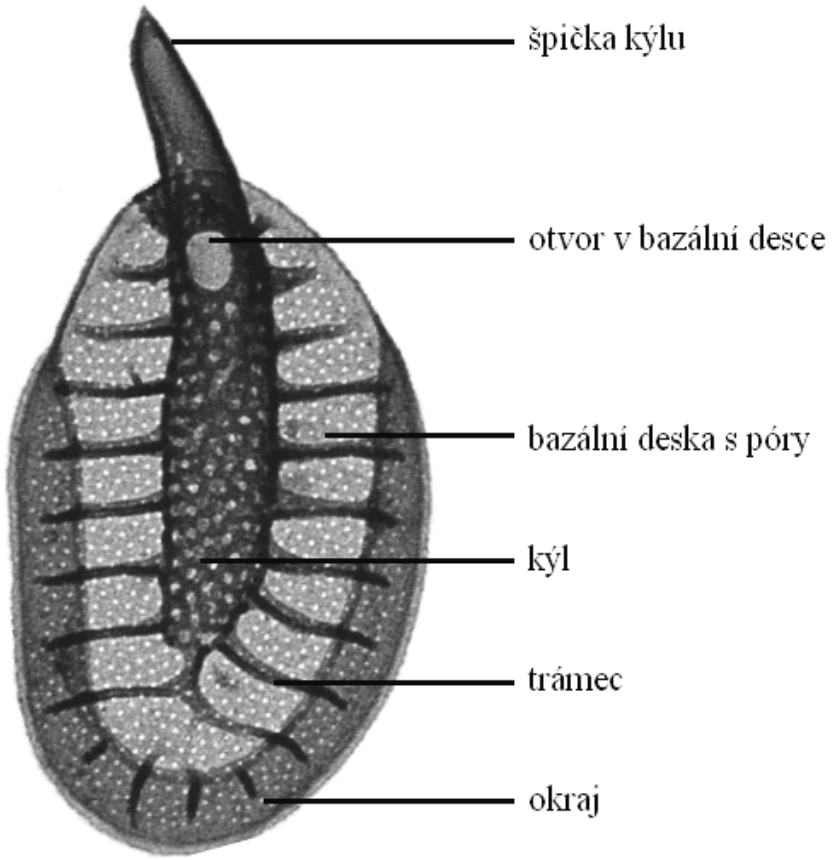
Rod *Synura* je koloniální zástupce třídy Synurophyceae (*Mallomonas* není koloniální, *Chrysodidymus* tvoří kolonie se dvěmi buňkami, *Tessellaria* tvoří vícebuněčné kolonie) (Wee, 1997). *Synura* má dva přibližně stejně dlouhé bičíky. Jako u ostatních heterokontních organismů je jeden z nich hladký a druhý péřitý, oba mohou být kryty organickými šupinami. Naproti tomu u rodu *Mallomonas* obvykle nacházíme velký rozdíl v délce bičíku a v mnoha případech je pomocí světelného mikroskopu vidět pouze jeden. Křemičité šupiny se tvoří v silikon-depozitním váčku, který vzniká splynutím diktyozomálních váčků, narozdíl od rodu *Mallomonas*, u kterého je odvozen z periplastidiálního endoplazmatického retikula (PER) (Kristiansen, 1986). Šupiny rodu *Synura* jsou většinou bilaterálně symetrické, což je odlišuje od šupin rodu *Tessellaria*. Výjimkou je ovšem druh *S. lapponic*a (Tyler et al., 1989).

Koncept rodu a druhu *Synura* je nejasný, neboť je jako celý systém třídy Synurophyceae založený téměř výlučně na morfologii šupin a celých křemičitých schránek a na jejich subjektivním posouzení a zařazení. Struktura šupin hraje však dodnes klíčovou úlohu v rozlišování druhů a forem, a proto se jim budu věnovat v další kapitole.

2.5. Křemičité šupiny rodu *Synura*

Křemičité šupiny u rodu *Synura* objevil roku 1918 Petersen ve světelném mikroskopu. Korshikov (1929) ukázal svými pokusy, že šupiny Synurophyceae jsou skutečně křemičité. Nedaly se rozpustit v silných kyselinách jako je kyselina sírová či

dusičná, ale snadno je rozpustila kyselina fluorovodíková. Rozvoj elektronové mikroskopie ve druhé polovině padesátých let minulého století umožnil intenzivní studium křemičitých šupin rodů *Synura* a *Mallomonas* (Asmund, 1955, Fott, 1955, Manton, 1955, Petersen & Hansen, 1956). Především na základě jemné struktury těchto šupin bývají charakterizovány jednotlivé druhy a formy chrysomonád s křemičitými šupinami (Kristiansen, 1986, 1996, Asmund & Kristiansen, 1986, Siver, 1991). Šupina rodu *Synura* je obvykle heteropolární, s dobře definovanou proximální a distální částí. Skládá se z bazální desky (base-plate) s ohnutým okrajem (rim) v proximální části. Výběžky z bazální desky mohou tvořit dutý kýl (keel) či ostének (spine) v distální části (Kristiansen, 1986). Tyto výběžky jsou během vývoje šupiny formovány působením PER. V místě, kterým PER vstoupilo do šupiny, zůstává v bazální desce otvor (Obr. 1).



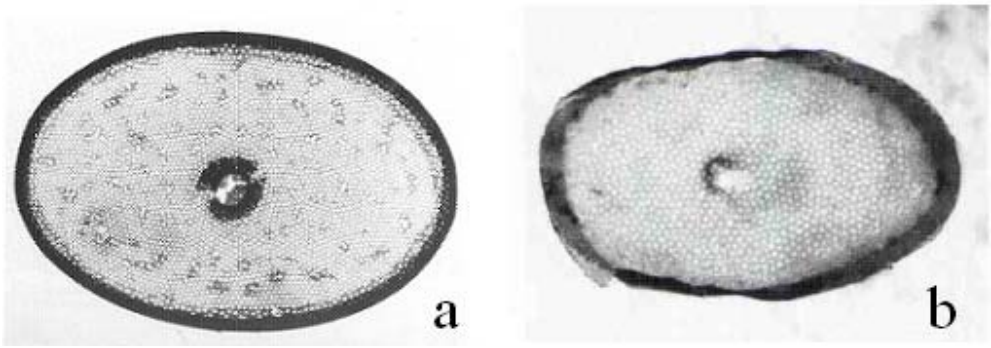
Obr. 1 - struktury šupiny druhu *Synura petersenii*

Na bazální desce se většinou vyskytují sekundární struktury, jako jsou žebra (ribs) či papily (papillae). V případě rodu *Mallomonas* může být součástí šupiny vyklenutý dóm (dome), ke kterému bývají připojeny ostny (bristles). U některých druhů rodu *Synura*, jako např. *Synura spinosa*, bývají přítomny kromě obvyklých tělních šupin také tubulární šupiny, které by mohly být analogické ostnům rodu *Mallomonas* (Kristiansen & Vigna, 1994).

Křemičité šupiny se tvoří v silikon-depozitních váčcích (SDV), které jsou odvozeny z Golgiho aparátu (GA) (Leadbeater & Baker, 1995) a nacházejí se podél PER (Wujek & Kristiansen, 1978, Sandgren & Hall, 1996). Na formování bazální desky se podílejí mikrotubuly a aktinová filamenta (Leadbeater & Baker, 1995). PER tvoří výběžek směrem do SDV a formuje kýl nebo ostének (Mignot & Brugerolle, 1982). SDV splyne s váčky GA a do této chvíle proteinový základ šupiny silifikuje. Poté SDV putuje k plazmatické membráně, fúzuje s ní a vypouští šupinu na povrch buňky (Leadbeater & Baker, 1995).

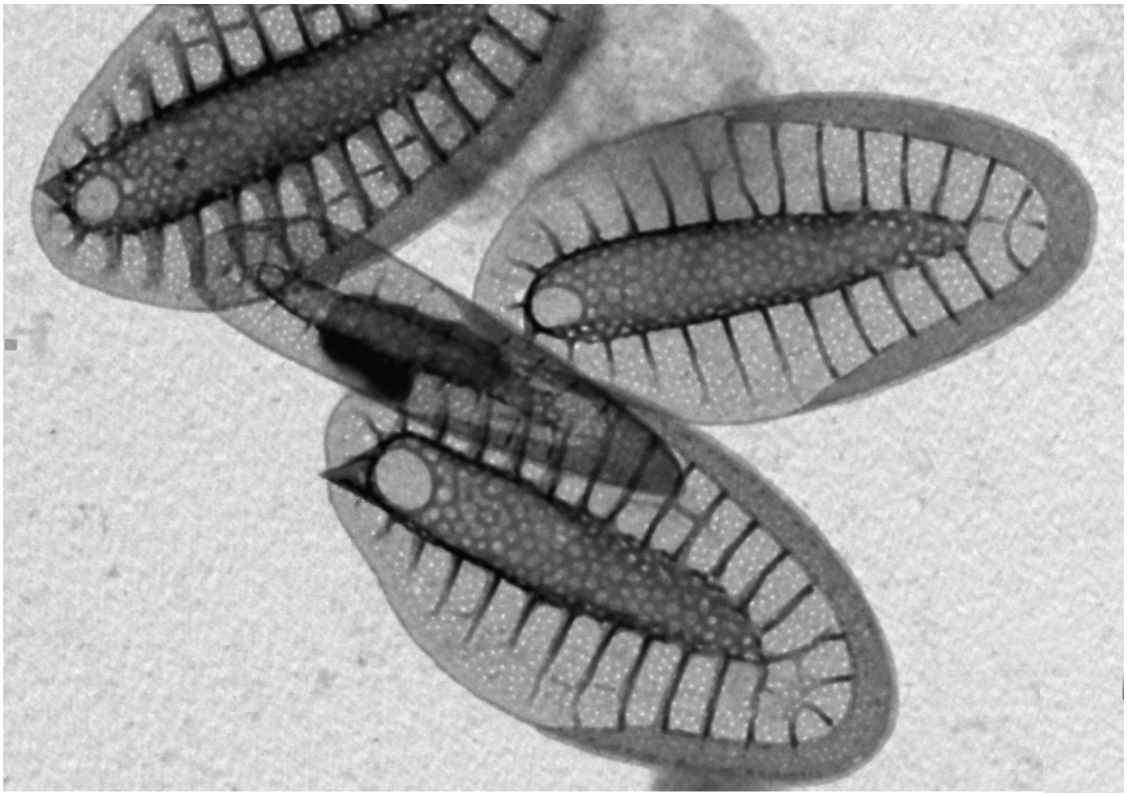
Šupiny většiny zástupců rodu *Synura* tvoří na povrchu buňky pravidelnou a souvislou strukturu (Preisig, 1994), a na svých pozicích jsou drženy jakýmsi proteinovým adhezivem, spojujícím překrývající se části šupin (Leadbeater, 1986).

Výjimkou je druh *Synura lapponica*, u kterého jsou šupiny umístěné kolem celé kolonie a nekryjí povrch jednotlivých buněk. Toto uspořádání, spolu s tvarem a strukturou šupin, se nápadně podobá charakteristickým znakům rodu *Tessellaria* (Tyler et al., 1989) (Obr. 2).



Obr. 2 - a - šupina druhu *Synura lapponica* (Kristiansen 1996 b)
b - šupina druhu *Tessellaria volvocina* (Lavau, 1997)

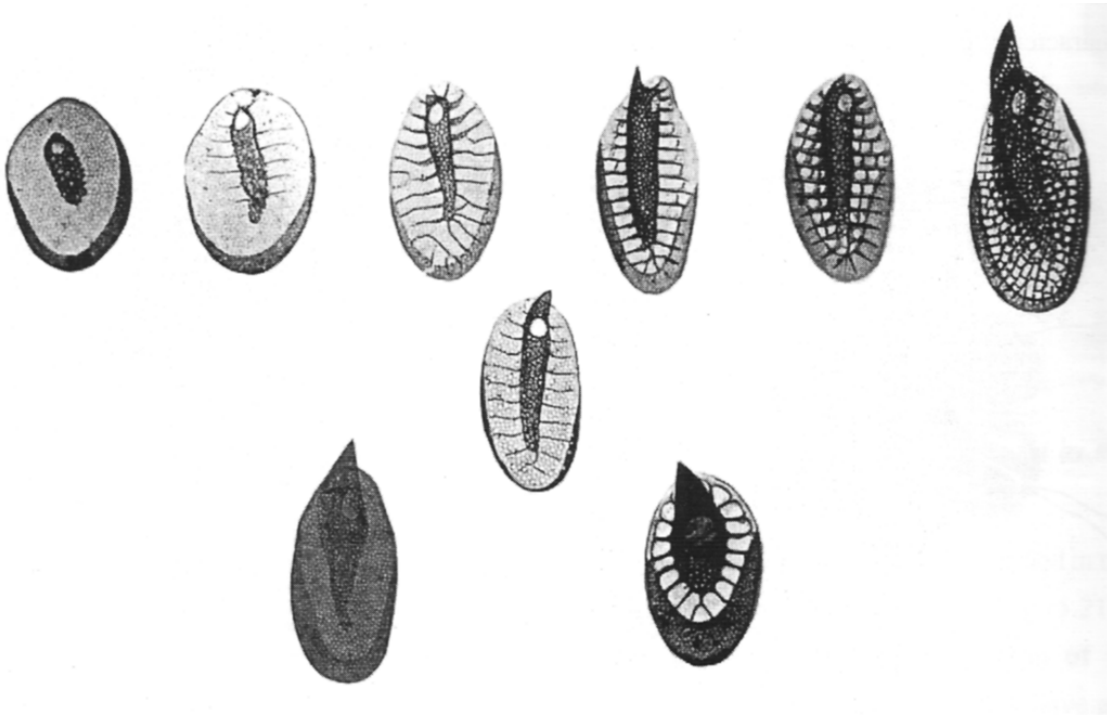
Obvykle je možné najít odlišné typy šupin charakteristické pro různé části buňky (Obr. 3).



Obr. 3 - *Synura petersenii* - 3 běžné tělní šupiny a posteriorní úzká šupina (uprostřed)

Na posteriorním konci buněk rodu *Synura* často nacházíme šupiny bez charakteristického kýlu či osténku, což pravděpodobně usnadňuje uspořádání buněk do těsné kolonie (Wee, 1997).

U mnohých druhů byla nalezena velká morfologická variabilita šupin a není vždy zcela jasné, zda se jedná o dva druhy či o dvě formy jednoho druhu. Příkladem může být komplex *Synura petersenii* s mnoha různými morfotypy (Obr. 4).



Obr. 4 - morfologie šupin v rámci komplexu *Synura petersenii* (Kristiansen, 1986a)

Některé z takovýchto morfotypů jsou vedeny jako formy či variety a v případě *Synura macracanta* (Petersen & Hansen) dokonce jako druh. Podobně byla jako nový druh určena i *Synura glabra* Korshikov, avšak Sandgren et al. (1966) ukázal, že stejné znaky na šupinách jsou přítomny u druhu *Synura petersenii* při nedostatku křemíku. Proto byl její status přehodnocen na formu.

2.6. Fylogenetika rodu *Synura*

Tradiční systém rodu *Synura* je založen zejména na studiu křemičitých šupin, které bylo umožněno rozvojem elektronové mikroskopie v padesátých letech minulého století. Podle Petersena a Hansena (1956, 1958) se rod *Synura* dělí do dvou skupin: Sectio *Petersenianae* (později Sectio *Peterseniae*, viz. Péterfi & Momeu, 1977), sdružující druhy s vyvinutým kýlem, a Sectio *Uvellae* či *Spinosae* (později Sectio *Synura*, viz Péterfi & Momeu, 1977), pro kterou je charakteristická přítomnost osténku. Ve svých pracích zdůrazňovali možnou variabilitu morfologických znaků jednotlivých druhů.

K těmto dvěma skupinám připojili Balonov a Kuzmin (1974) Sectio *Lapponica* s jediným druhem *Synura lapponica*.

Sectio *Synura* se dále dělí na Series *Splendidae* a Series *Synura* (Péterfi & Momeu, 1977) (Tab. 1).

Sectio *Lapponica*
- *S. lapponica* Skuja

Sectio *Peterseniae*
- *S. petersenii* Korshikov f. *petersenii*
- *S. petersenii* Korshikov f. *bjoerkii* Kronberg & Kristiansen

Sectio *Uvellae*

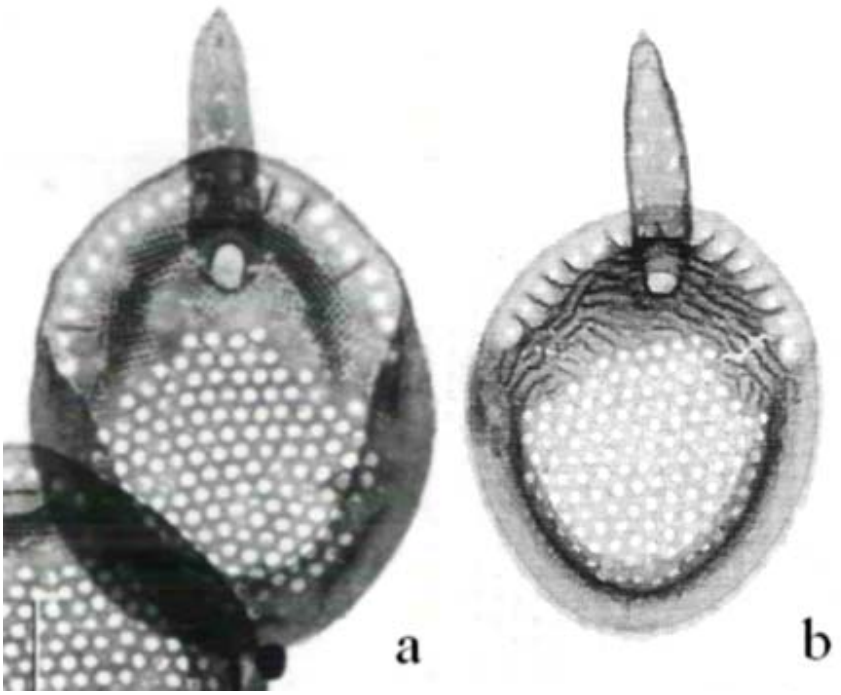
Series *Splendidae*
- *S. sphagnicola* (Korshikov) Korshikov
- *S. splendida* Korshikov

Series *Spinosae*
- *S. mammillosa* Takahashi
- *S. curtispina* (Petersen & Hansen) Asmund
- *S echinulata* Korshikov
- *S. spinosa* Korshikov
- *S. uvella* Ehrenberg em.Korshikov

Tab. 1 - skupiny v rámci rodu *Synura* s příklady druhů (Wee, 1997)

Druhy sekce *Synura* jsou charakterizovány převážně přítomností a rozsahem síťovitých sekundárních struktur na šupinách a přítomností specializovaných šupin na apikálním či posteriorním konci buňky. Tyto specializované šupiny, jakými jsou např. šupiny tubulární, odlišují zejména druhy komplexu *S. spinosa*.

Drobný rozdíl v sekundární struktuře šupiny (trámce namísto papil) odlišuje druh *S. echinulata* od druhu *S. mammilosa* (Obr. 5).

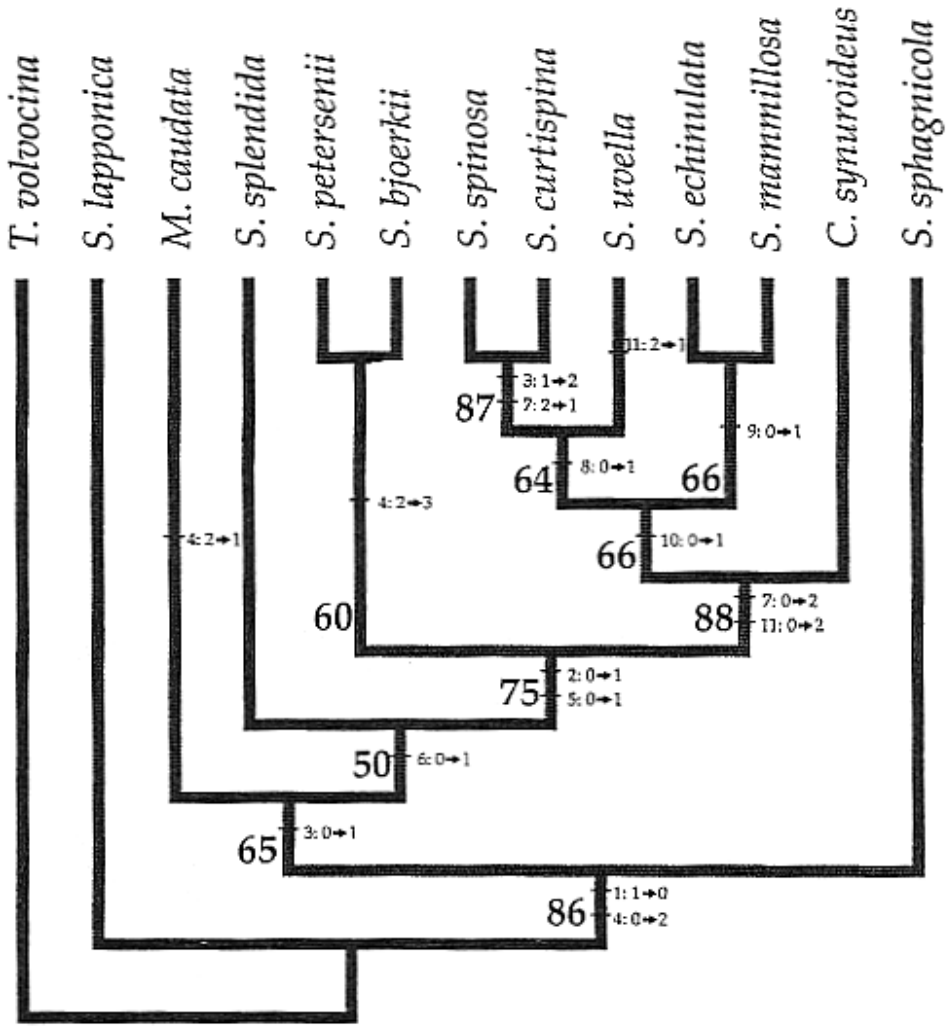


Obr. 5 - a - šupina druhu *Synura mammilosa* (Lavau, 1997)
b - šupina druhu *Synura echinulata* (Barreto, 2005)

Druhy sekce *Peterseniae* bývají charakteristické rozsahem trámců, vycházejících od báze kýlu (Obr. 4) (Kristiansen, 1986).

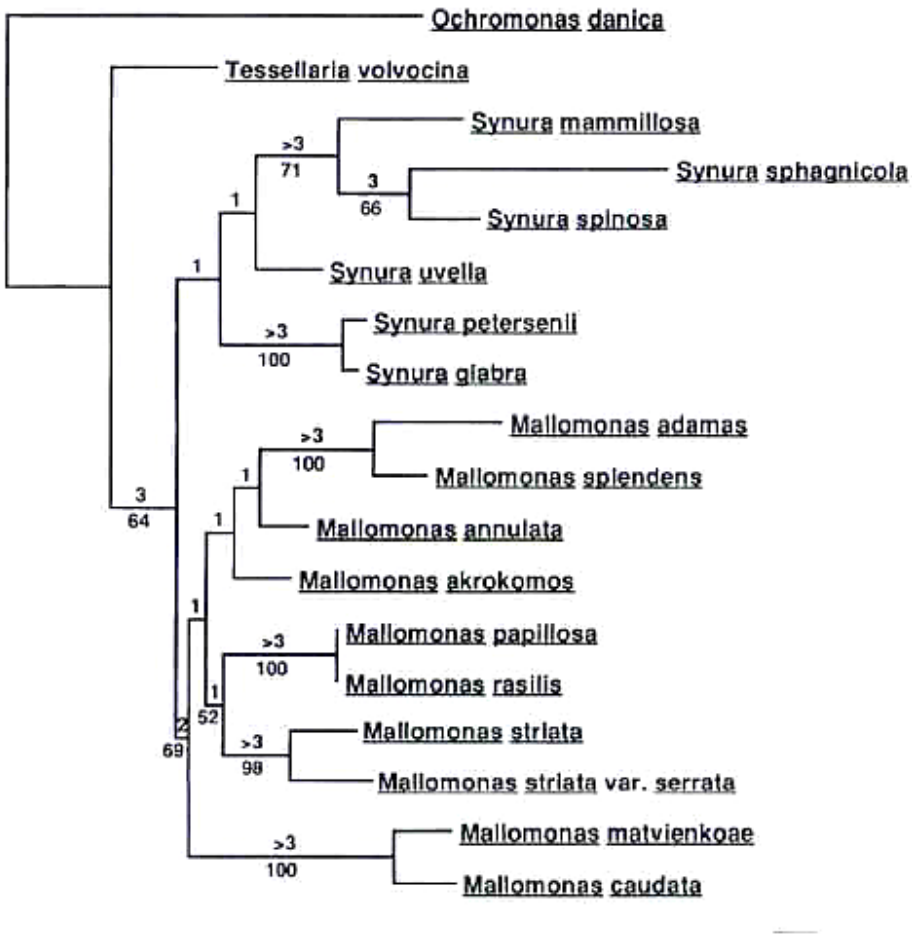
Počátkem devadesátých let bylo nasekvenováno mnoho druhů rodu *Synura* a třídy Synurophyceae a vzniklo několik prací, pokoušejících se vyjasnit vztahy v rámci tohoto rodu i této třídy.

Zajímavou kladistickou analýzu založenou na morfologii šupin publikoval v roce 1997 Wee. Při srovnávání těchto morfologických znaků klade důraz na správné určení homologie posuzovaných struktur. Podle jeho výsledků spadá do rodu *Synura* i druh *Mallomonas caudata*. Druhy s biradiálně symetrickými šupinami bez sekundárních struktur se nalézají na bázi stromu, zatímco druhy s vyvinutou sekundární strukturou šupin jsou odvozenější (Obr. 6).



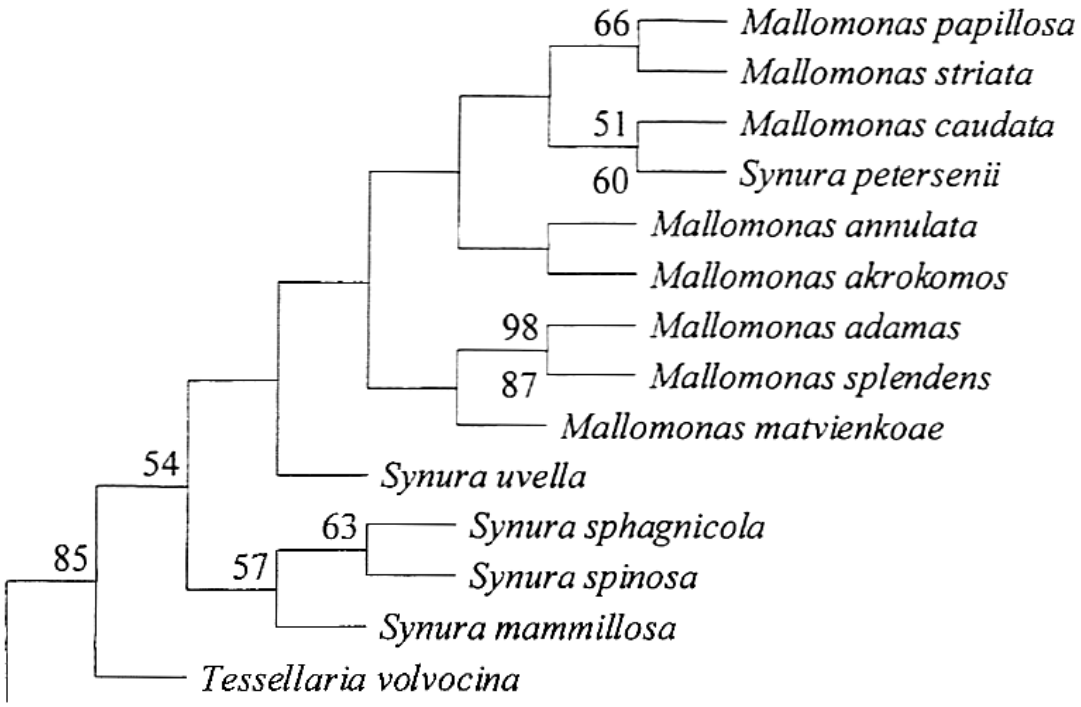
Obr. 6 - MP (maximum parsimony) strom sestavený na základě fylogenetické analýzy postavené na významných morfologických znacích křemičitých šupin (Wee, 1997)

Lavau et al. (1997) ve své práci kombinují data získaná fylogenetickou analýzou 18S rRNA s daty získanými analýzou morfologie šupin (Obr. 7). Jejich kombinovaná analýza ukazuje monofylii rodu *Synura*, ovšem s velice slabou podporou. Silně je podpořena Sekce *Peterseniae*.



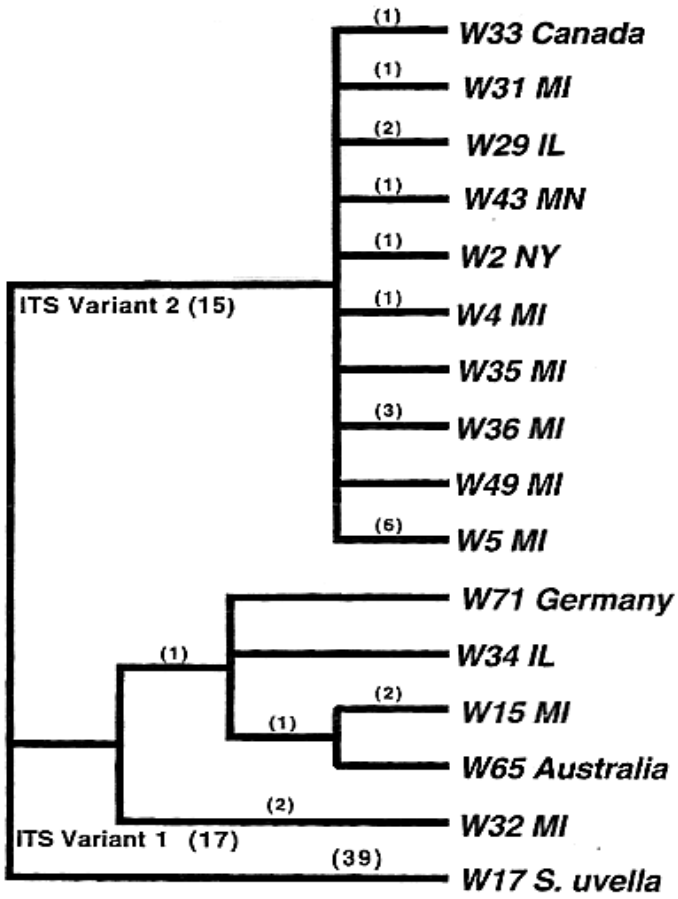
Obr. 7 - vztahy v rámci třídy Synurophyceae - kombinace molekulárních dat a morfologie křemičitých šupin (Lavau et al. 1997)

V analýze 18S rRNA zástupců třídy Chrysophyceae a Synurophyceae, kterou publikoval Andersen et al. (1999), se opět objevuje parafylie u rodu *Synura*. Zástupci rodu *Mallomonas* zde spadají do rodu *Synura* a oddělují tak druh *Synura petersenii* od ostatních zástupců rodu *Synura* (Obr. 8).



Obr. 8 - MP strom založený na srovnání sekvencí 18S rRNA pro třídu Synurophyceae (Andersen et al., 1999)

Wee (2001) ukázal ve své molekulárně fylogenetické práci existenci vnitrodruhové variability u druhu *Synura petersenii*. Na základě analýzy sekvence ITS/8,5S (internal transcribed spacer) mnoha kultur tohoto druhu se mu podařilo odlišit dva taxony, z nichž jeden se vyskytoval pouze v severní Americe, distribuce druhého taxonu zahrnovala severní Ameriku, Evropu a Austrálii (Obr. 9).



Obr. 9 - fylogenetický strom *S. petersenii* sestavený na základě sekvencí ITS/5,8S (Wee, 2001)

3. OPTIMALIZACE METOD

3.1. Úvod do metodiky

Pro získání sekvencí je potřeba vyizolovat DNA z živé monoklonální kultury, amplifikovat potřebný úsek DNA pomocí PCR, produkt přečistit, provést sekvenační PCR a srážení, a poté sekvenovat.

Tradiční metodou izolace DNA je metoda CTAB (cetyl trimethyl amonium bromid; Doyle & Doyle, 1987). Pro izolaci DNA je vždy nejprve potřeba rozbít buněčnou stěnu a plazmatickou membránu buněk. Při použití metody CTAB tvoří DNA suspensi v tomto pufru. Pevné částečky jsou odstraněny centrifugací, rozpustné složky, jako např. proteiny, jsou odstraněny rozpuštěním v chloroformu a centrifugací.

Pro časté používání byly vyvinuty izolační kity, jejichž používání je snazší, rychlejší. Neobsahují škodlivé chemikálie, jako je chloroform. DNA se váže na silikagelovou membránu, na které je promývána. Nevýhodou kitů bývá jejich vyšší cena.

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis & Faloona, 1987) umožňuje amplifikaci vybrané sekvence DNA. Mezi komponenty, potřebné pro uskutečnění této reakce, patří templátová DNA, kterou chceme amplifikovat, DNA polymeráza, primery, které umožní polymeráze nasednout na templát a ohraničí vybranou sekvenci na 3' a 5' konci DNA, dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty) - materiál pro vznikající nové řetězce DNA a pufr, který upraví chemické prostředí potřebné pro správnou funkci polymerázy. Takováto reakční směs je dále zahřívána a ochlazována v termocykleru na teploty, potřebné pro jednotlivé kroky reakce, kterými jsou zejména denaturace DNA a nasednutí primerů a polymerázy. Tyto kroky se opakují v několika cyklech, čímž je dosažena mnohonásobná amplifikace daného úseku DNA..

3.2. Materiál a metody

3.2.1. Vybavení

Planktonní síť s velikostí ok 20 μm.
Měřič pH a konduktivity Combo pH & EC HI 98129, Hanna instruments
Světelný mikroskop Olympus CX31
Světelný mikroskop Olympus BX 51 s digitálním fotoaparátem Olympus Camedia Digital Camera C-5050 Zoom
Plastové kultivační destičky pro tkáňové kultury IWAKI, 96 jamek, ploché dno, kat. č. K082296.2
Síťky pro EM měděné, 150 ok, průměr 3,5 mm.
Pipety Eppendorf Research a Pipetman Starter Kit (Gilson)
Transmisní elektronový mikroskop (TEM) JEOL 1011 v Laboratoři elektronové mikroskopie, PřF UK

Centrifuga Centrifuge 5804R, Eppendorf

Centrifuga Spectrafuge mini, Lobnet International, Inc.
Skleněné kuličky - průměr 1,5 mm
Žebříček O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus
Mlýnek na drcení rostlinného materiálu Retsch MM200
Bezodtahová digestoř Cruma
Termoblok Thermomixer compact, Eppendorf
Vortex Genie 2, Scientific Industries
BioPhotometer, Eppendorf.
Mikrozkumavky PCR (0,2 ml) s plochým víčkem (P-lab)
Mikrozkumavky - typ Eppendorf (0,5 ml) s víčkem (P-lab)
Chladítko IsoFreeze PCR (P-lab)
Mastercycler ep S - gradientový, Eppendorf
Vybavení pro elektroforézu Scie-Plas: HU6 - horizontální malá krátká SHU6 - horizontální malá dlouhá, HU13 - horizontální velká

UV lampa Herolab UV T -20 M, dokumentační systém Gel Logic 100 Imaging System Kodak

Sekvenátor 3100 Avant Genetic Analyzer

Program FastPCR (Kalendar)

Kit JetQuick Tissue, Genomed

Kit Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250, Genomed

3.2.2. Použité kmeny

kmen	**zdroj**
M. acaroides	kmen izolován Dr. Němcovou
M. kalinae	sbírkový kmen CAUP B601
M. ouradion 1	kmen izolován Dr. Němcovou
M. ouradion 2	kmen izolován Dr. Němcovou
M. ouradion 3	kmen izolován Dr. Němcovou
M. ouradion 4	kmen izolován Dr. Němcovou
M. ouradion 5	kmen izolován Dr. Němcovou
M. ouradion 6	kmen izolován Dr. Němcovou
M. ouradion 7	kmen izolován Dr. Němcovou
S. petersenii 1	vlastní izolát
S. petersenii 2	vlastní izolát
S. petersenii 3	vlastní izolát
S. petersenii 4	kmen izolován Dr. Němcovou
S. curtispina 1	kmen izolován Dr. Němcovou
S. curtispina 2	kmen izolován Dr. Němcovou
S. echinulata 1	kmen izolován Dr. Němcovou
S. echinulata 2	kmen izolován Dr. Němcovou
S. echinulata 3	kmen izolován Dr. Němcovou
S. sphagnicola 1	kmen izolován Dr. Němcovou
S. sphagnicola 2	kmen izolován Dr. Němcovou

Tab. 2 - použité kmeny

3.2.3. Získání vzorků, izolace a kultivace

Vzorky pro izolaci chrysomonád jsem odebrala na těchto lokalitách:

- Zlatá stoka, Třeboň
- Rybník u obce Křínov
- Kladské rašeliny
- Slepé rameno Labe, Čelákovice
- Modřanské tůně

Používala jsem planktonní síť s velikostí ok 20 μm.
Pro měření pH a konduktivity jsem používala Combo pH & EC HI 98129, Hanna instruments.
Izolovala jsem jak rod *Synura*, tak i rod *Mallomonas*, pokud byly ve vzorku přítomné.
Buňky, případně kolonie, jsem izolovala pod světelným mikroskopem Olympus CX31 pomocí skleněné pipety, vytažené v kapiláru.
Buňku (kolonii) jsem přenášela postupně do několika kapek sterilního živného média o adekvátním pH, a poté do plastové kultivační destičky s tímto médiem.
Použité médium: modifikované médium DYIV (Řezáčová, 2003).
Teplota kultivace 10 °C .
Přirozené osvětlení.
Pro získání snímků živých kultur jsem používala světelný mikroskop Olympus BX 51 s digitálním fotoaparátem Olympus Camedia Digital Camera C-5050 Zoom.

3.2.4. Příprava vzorků a EM

3.2.4.1. Příprava sítěk s formvarvou blankou

- Jarem jsem dobře umyla podložní sklíčko, opláchnula a nechala uschnout.
- Suché sklíčko jsem vložila do roztoku 0,3 % formvar v chloroformu na 3 - 5 min,

nádobu s roztokem a sklíčkem jsem uzavřela.

- Rychle jsem sklíčko vytáhnula a držela ho několik vteřin svisle v parách roztoku.
- Nechala jsem formvarovou vrstvu zatvrdnout asi 5 min.
- Skalpelem či suchou jehlou jsem vyříznnula ze zatuhlé formvarové vrstvy obdélník.
- Na 5 s jsem ponořila sklíčko do HF.
- Pomalu, kolmo k hladině, jsem nořila sklíčko do nádoby s destilovanou vodou tak, aby se vyříznutý obdélník formvaru usadil na hladině.
- Na blanku plovoucí na hladině jsem pokládala jednotlivé síťky.
- Na blanku se síťkami jsem přiložila proužek filtráku tak, aby ji celou zakrýval, a nechala ho nasáknout vodu.
- Vytáhnula jsem filtrák, na který se přilepila blanka a síťky, a nechala jsem ho oschnout v pootevřené Petriho misce.

3.2.4.2. Nanesení a pozorování vzorků

- Na podložní sklíčko jsem nalepila lepicí pásku tak, aby jen asi o 1 mm přesahovala jeho okraj.
- Na okraj lepicí pásky jsem přilepila síťky formvarovou blankou nahoru.
- Sterilní pipetou jsem přenesla několik jedinců z kultury na síťku a pod mikroskopem jsem kontrolovala, jestli jsou na síťce skutečně přítomni.
- Nechala jsem vzorky zaschnout, zbytek kultury jsem převedla do sterilní Epp. a zamrazila.
- Nanesla jsem na parafilm několik větších kapek destilované vody.
- Pinzetou jsem přemisťovala síťky z jedné kapky do druhé (vzorek směrem do vody), abych rozpustila soli z média (u přírodních vzorků není třeba).
- Nechala jsem vzorky zaschnout.
- Vzorky jsem pozorovala pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) JEOL 1011 v Laboratoři elektronové mikroskopie, PřF UK.

3.2.5. Izolace DNA metodou CTAB

- Použila jsem kmeny *S. curtispina* 1 a *M. kalinae* (Tab. 2).
- Izolovala jsem DNA z 40 µl vzorku a z celého zbylého obsahu Erlenmeyerovy baňky.
- Vzorek jsem zcentrifugovala - 4 000 rpm a získala tak pelet buněk (Centrifuge 5804R, Eppendorf).
- Centrifugaci jsem opakovala - 13 000 rpm.
- Opatrně, abych se nedotkla peletu, jsem odsála vodu pipetou.
- Přidala jsem skleněné kuličky - průměr 1,5 mm - přibližně stejný objem jako pelet.
- Protřepala jsem pelet s kuličkami v mlýnku na drcení rostlinného materiálu (Retsch MM200) - 5 min, frekvence 30 otřesů/min.
- Termoblok (Thermomixer compact, Eppendorf) jsem nastavila na 75 °C.
- V digestoři (bezodtahová digestoř Cruma) jsem přidala ke vzorku 700 ml roztoku CTAB.
- Nechala jsem uzavřené zkumavky se vzorky míchat a inkubovat na termobloku při 75 °C, 30 min.
- Během prvních minut inkubace jsem přidala polyvinyl pyrrolidon (PVP).
- V digestoři jsem přidala 500 ml směsi chloroform : isoamylalkohol (24 : 1).
- Uzavřené zkumavky jsem několikrát převrátila a nechala stát 5 min.
- Centrifugovala jsem vzorek 6 min při 13 000 rpm.
- Průhledný supernatant jsem přepipetovala v digestoři do 1,5 Epp. (mikrozkumavka - typ Eppendorf). Dávala jsem pozor, aby se do pipety nedostala spodní vrstva, ale skutečně pouze jen supernatant.
- Přidala jsem 500 ml isopropanolu (z mrazáku).
- Uzavřené Epp. jsem několikrát převrátila a nechala stát 30 min.
- Centrifugovala jsem vzorek 3 min při 13 000 rpm.
- V digestoři jsem slila supernatant do kádinky a nechala otevřené Epp. chvíli stát dnem vzhůru na papírovém ubrousku.

- Předehříla jsem termoblok na 37 °C.
- Přidala jsem 400 ml ethanolu 96 % (dole v mrazáku).
- Inkubovala jsem vzorek při míchání na termobloku při 37 °C, 15 min.
- Centrifugovala jsem vzorek 3 min při 13 000 rpm.
- Supernatant jsem slila do kádinky.
- Přidala jsem 200 ml ethanolu 70 % (dole v mrazáku).
- Nechala jsem vzorek stát 5 min.
- Centrifugovala jsem vzorek 3 min při 13 000 rpm.
- Nastavila jsem termoblok na 90 °C.
- Supernatant jsem slila do kádinky a otevřené Epp. jsem nechala stát asi 10-15 min.
- Přemístila jsem otevřené Epp. na termoblok a nechala vysoušet pellet při 90 °C asi 1 - 2 min.
- Přidala jsem 200 ml TE bufferu.
- Inkubovala jsem vzorek při míchání na termobloku při 37 °C, 30 min.
- Zvortexovala jsem vzorek (vortex Genie 2, Scientific Industries).
- Krátce jsem vzorek zcentrifugovala (Spectrafuge mini, Lobnet International, Inc.).
- Produkt jsem uchovávala v mrazáku při - 86 °C.

3.2.6. Izolace DNA pomocí kitu JetQuick Tissue.

- Použila jsem kmeny rodů *Synura* a *Mallomonas* uvedené v tabulce 2.
- Použila jsem vzorek o objemu 600 µl.
- Vzorek jsem zcentrifugovala - 4 000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf) a získala tak pelet buněk.
- Odsála jsem vodu pipetou.
- Přidala jsem skleněné kuličky - průměr 1,5 mm - přibližně stejný objem jako pelet.
- Přidala jsem Lysis buffer P ... 100 µl
- Protřepala jsem vzorek v mlýnku na drcení rostlinného materiálu (Retsch

MM200) - 5 min, frekvence 30 otřesů/min.

- Přidala jsem Lysis buffer P ... 300 µl.
- Přidala jsem Proteinkinázu K (v krabičce v mrazáku) ... 20 µl.
- Zvortexovala jsem vzorek a nechala ho inkubovat 1 h při 65 °C za stálého míchání.
- Nalila jsem vzorek na spin filtr, ten jsem umístila zpět do Epp. a centrifugovala ho 1 min při 12 000 rmp.
- Vyhodila jsem filtr a přidala RNAzu ... 20 µl.
- Zortexovala jsem vzorek a nechala ho stát 5 min.
- Přidala jsem Binding buffer P ... 200 µl.
- Zvortexovala jsem vzorek, nalila ho na nový spin filtr a ten jsem vložila zpět do Epp.
- Nechala jsem vzorek stát 1 min.
- Centrifugovala jsem vzorek 2 min při 12 000 rpm.
- Předehřála jsem 75 µl Elution buffer D na 65 °C.
- Vylila jsem obsah Epp. a vrátila do ní filtr.
- Přidala jsem Wash buffer I ... 550 µl a centrifugovala vzorek 1 min při 12 000 rpm.
- Vylila jsem obsah Epp., přidala Wash buffer II... 550 µl a centrifugovala vzorek 1 min při 12 000 rpm.
- Znovu jsem vylila obsah Epp., přidala Wash buffer II... 550 µl a centrifugovala vzorek 1 min při 12 000 rpm.
- Vylila jsem obsah Epp. a centrifugovala vzorek 2 min při 12 000 rpm, aby se odstranil reziduální ethanol.
- Filtr jsem přemístila do 1,5 Epp.
- Přidala jsem předehřátý Elution buffer D 50 µl (při větších objemech a koncentracích DNA se používá 100 µl).
- Nechala jsem vzorek stát 3 min.
- Centrifugovala jsem vzorek 1 min při 12 000 rmp.
- Ještě jednou jsem filtr promyla - přidala jsem předehřátý Elution buffer D 20 µl.
- Nechala jsem vzorek stát 5 min.

- Centrifugovala jsem vzorek 1 min při 12 000 rmp.
- Produkt jsem uchovávala v mrazáku při - 86 °C.

3.2.7. Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace DNA jsem používala spektrofotometr BioPhotometer, Eppendorf.

- Změřila jsem blank - do cuvety jsem napipetovala 50 µl destilované vody.
- Nastavila jsem dilution:
  sample ... 5 µl
  ředidlo (dest. voda) ... 45 µl
- Změřila jsem naředěný vzorek.

Při čisté DNA by měla hodnota absorbance při λ = 320 nm být co nejblíže 0 a poměr 260/280 nm by se měl nacházet mezi hodnotami 1,8 a 2.

3.2.8. PCR

3.2.8.1. Použité primery

primer	sekvence	citace
GO1	CAC CTG GTT GAT CCT GCC AG	Saunders et al. (1995)
GO7	CCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC	Saunders et al. (1995)
18L	CAC CTA CGG AAC CTT GTT ACG ACT T	Hamby et al. (1988)
34F	GTC TCA AAG ATT AAG CCA TGC	Friedl (unpubl.)
LAVAU R	CGA ACA GGT TCA TGA GGA AGC TGG ATC CT	Lavau et al. (1996)
370R	AGG CTC CCT CTC CGG AAT CRA ACC C	Friedl (unpubl.)
1122F	GGC TGA AAC TTA AAG GAA TTG	Friedl (unpubl.)
1263R	GAA CGG CCA TGC ACC ACC	Friedl (unpubl.)

Tab. 3 - primery použité pro PCR a pro sekvenační PCR

3.2.8.2. Použité cykly a gradienty

1. Iniciální detaturace:	95° C	5 min	
2. Denaturace:	94° C	0:40 min	
3. Annealing:	52° C	1 min	35 cyklů
4. Elongace:	72° C	1 min	
5. Denaturace:	94° C	0 :40 min	
6. Elongace:	72° C	2 min	6 cyklů
7. Finální elongace:	72° C	7 min	

Tab. 4 - cyklus 1 (18S_Gotting)

1. Iniciální detaturace:	95° C	5 min		
2. Denaturace:	94° C	0:40 min		35 cyklů
3. Annealing:	56° C	1 min		
4. Elongace:	72° C	1 min		
5. Denaturace:	94° C	0 :40 min		6 cyklů
6. Elongace:	72° C	2 min		
7. Finální elongace:	72° C	7 min		

Tab. 5 - cyklus 2 (18S_Gottin2)

1. Iniciální detaturace:	94° C	5 min		
2. Denaturace:	94° C	1 min		35 cyklů
3. Annealing:	gradient (Tab. 8)	45 s		
4. Elongace:	72° C	3 min		
7. Finální elongace:	72° C	10 min		

Tab. 6 - cyklus 3

1. Denaturace:	96° C	10 min		25 cyklů
2. Annealing:	50° C	5 s		
3. Elongace:	60° C	4 min		
4. Finální elongace:	60° C	10 min		

Tab. 7 - cyklus 4

teplota (°C)	vzorek
58,0	M1
59,1	1 (*S. peters.*)
59,9	M1
61,1	1 (*S. peters.*)
61,7	M1
62,8	1 (*S. peters.*)
64,3	M1
65,0	1 (*S. peters.*)

Tab. 8 - gradient teplot pro annealing, PCR IV

52,2 °C	54,0 °C	56,6 °C	59,3 °C	62,0 °C

Tab. 9 - gradient teplot pro PCR V

3.2.8.3. Použité mastermixy pro PCR

složka	µl na 1 vzorek
pufr	2
dNTP	0,4
primer 1	0,25
primer 2	0,25
Red Taq Jump Start	0,5
DNA	1
voda	15,6

Tab. 10 - mastermix pro PCR

složka	MM1	MM1	MM2	MM2	MM3
pufr	2	2	2	2	2
dNTP	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
primer 1	0,2	0,25	0,25	0,25	0,25
primer 2	0,2	0,25	0,25	0,25	0,25
RedTaq Jump Start	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
voda	15,07	15,57	14,97	15,57	14,81
$MgCl_2$	0,5	0	0,5	0	0,5
DNA	1	1	1	1	1

Tab. 11 - mastermixy pro PCR V
MM = mastermix

3.2.8.4. Použité kombinace faktorů důležitých pro PCR

vzorek	G01, G07	G01, 18L
S1	7	13
S2	8	14
M1	9	15
M2	10	16
S3	11	17
M3	12	18

Tab. 12 - kombinace primerů a vzorků pro PCR I

	cyklus 1		cyklus 2
vzorek	**GO1,18L**	**34F, GO7**	**GO1,18L**
M1	1	5	9
S1	2	6	10
M3	3	7	--
S3	4	8	--

Tab. 13 - kombinace primerů vzorků a cyklů pro PCR II

	MM1		MM2		MM	
	G01 a LAVAU R		G01 a 18L		334F a 18L	
vzorek	**5 ng/µl**	**100x řeď.**	**5 ng/µl**	**100x reď.**	**5 ng/µl**	**100x řeď.**
M1	1 - 5	16 - 20	31 - 35	46 - 50	61	64
	A	B	A	B		
3 (*S. peters.*)	6 - 10	21 - 25	36 - 40	51 - 55	62	65
	B	A	B	A		
15 (*S. spha.*)	11 - 15	26 - 30	41 - 45	56 - 60	63	66
	A	B	A	B		

Tab. 14 - kombinace faktorů ve vzorcích pro PCR V
vzorky 32 a 34 nebyly ředěné vůbec
MM = mastermix
do vzorků se 100x ředěnou DNA jsem dala namísto 1 µl DNA 3 µl
do vzorků s neředěnou DNA jsem přidala 2 µl destilované vody, které jsou vzorků ředěných na 5 ng/µl rovnou odečítené z mastermixu.

3.2.8.5. Ředění DNA pro PCR

d = (x * y) / z
v = x – d

ředění: v:d

x … požadovaný objem DNA
y … požadovaná c (DNA)
z … naměřená c (DNA)
d … objem neředěné DNA
v … objem destilované vody

Izolovanou DNA jsem ředila na požadovanou koncentraci 5 ng/µl. Požadovaný objem byl 20 µl.

3.2.8.6. Postup PCR a čištění produktu

Pomocí kitu Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250 jsem přečistila PCR produkt vzorků 32 (*M. kalinae*), 42 (*S. sphagnicola*) a smíchaných vzorků 51 a 52 (*S. petersenii*).

- Pracovala jsem na chladítku (IsoFreeze PCR), aby se teplem nerozložila DNA-polymeráza.
- Připravila jsem mastermix (Tab. 10), polymerázu jsem přidávala až na závěr.
- Rozpipetovala jsem mastermix do mikrozkumavek PCR a přidala jsem DNA.
- Zvortexovala jsem vzorky v mikrozkumavkách a trochu zcentrifugovala.
- Vložila jsem mikrozkumavky do termocykleru (Mastercycler ep S - gradientový, Eppendorf) a zapnula jsem program.
- Přečistila jsem PCR produkt pomocí kitu (Jet Quick PCR Product Purification

Spin Kit / 250) (postup viz návod přiložený v každém balení tohoto kitu)

3.2.9. Příprava gelu a elektroforéza

Pro TAE gel 1% 50 ml (střední velikost):

agaróza 1 … 0,5 g
TAE … 50 ml

- Agarózu 1 a pufr TAE jsem smíchala v Erlenmeyerově baňce a ohřívala ji v mikrovlnné troubě, dokud nezačala vařit.
- Mícháním jsem rozpustila zbytky pevné agarózy, přidala jsem kapku ethidium bromidu a opět zamíchala.
- Pomalu, aby se nevytvořily bublinky, jsem nalila roztok do připravené skleněné vaničky, ohraničené kovovými zarážkami a s plastovým hrebínkem (Scie-Plas).
- Pokud agar vytékal přes kovové zarážky, oblepila jsem celou vaničku lepicí páskou.
- Nechala jsem gel ztuhnout.
- Odstranila jsem kovové zarážky a případnou lepicí pásku.
- Ponořila jsem vaničku s gelem do nádoby pro elektroforézu s pufrem TAE, jehož hladina přesahovala přes gel.
- Opatrně jsem vyndala plastový hřebínek.
- Do krajního otvůrku jsem napipetovala 2 μl žebříčku, do dalších vzorky po 4 μl.
- Přiklopila jsem nádobu víkem a připojíila kabely. Měla jsem přitom na paměti, že se DNA při elektroforéze pohybuje směrem k od + k -.
- Zapnula jsem elektrický proud a při napětí 100 V jsem nechala elektroforézu běžet 20 minut.
- Pod UV zářením jsem zjistila výsledek (Herolab UV T -20 M, dokumentační systém Gel Logic 100 Imaging System Kodak).

3.2.10. Sekvenační reakce čtvrtinová

Pro sekvenační reakci jsem použila 2 primery forward a 2 reverse:

34F, 1122F, 370R, 1263R

Použila jsem cyklus 4 (Tab. 7).

Požitý mastermix viz tabulka15.

Poté jsem produkt vysrážela a poslala na sekvenátor do Laboratoře sekvenace DNA, Viničná 7, Praha 2.

složka	**µl na 1 vzorek**
Ready reaction mix	2
primer	1 (3,2 pmol)
buffer	4
voda	12
DNA	1

Tab. 15 - mastermix pro sekvenační PCR

3.2.11. Srážecí reakce

- Vzorky jsem odpipetovala do 0,5 Epp.
- Epp. jsem číslovala podle pořadí, ve kterém měly být vedeny v sekvenátoru.
- Přidala jsem CH_3COONa ... 2 µl (zásobní roztok v mrazáku).
- Přidala jsem ethanol 96 % ... 50 µl (dole v mrazáku).
- Zvortexovala jsem vzorek.
- Nechala jsem vzorek stát 10 - 15 min.
- Centrifugovala jsem vzorek při 20 °C, 30 min, 12 000 rpm.
- Opatrně jsem odpipetovala tekutinu, aniž bych porušila pelet.
- Nechala jsem Epp. odkapat na ubrousek a chvíli odpařovat ethanol.
- Přidala jsem ethanol 70 % ... 250 µl.
- Zvortexovala jsem vzorek.

- Centrifugovala jsem vzorek při 20 °C, 15 min, 12 000 rpm.
- Opatrně jsem odpipetovala tekutinu, aniž bych porušila pelet.
- Znovu jsem přidala ethanol 70 % ... 250 µl.
- Zvortexovala jsem vzorek.
- Centrifugovlala jsem vzorek při 20 °C, 15 min, 12 000 rpm.
- Vylila jsem tekutinu.
- Nechala jsem otevřené Epp hřát na termobloku. při 60 °C asi 10 min, aby se odpařily zbytky ethanolu.
- Produkt jsem uchovávala v mrazáku při 4 °C.

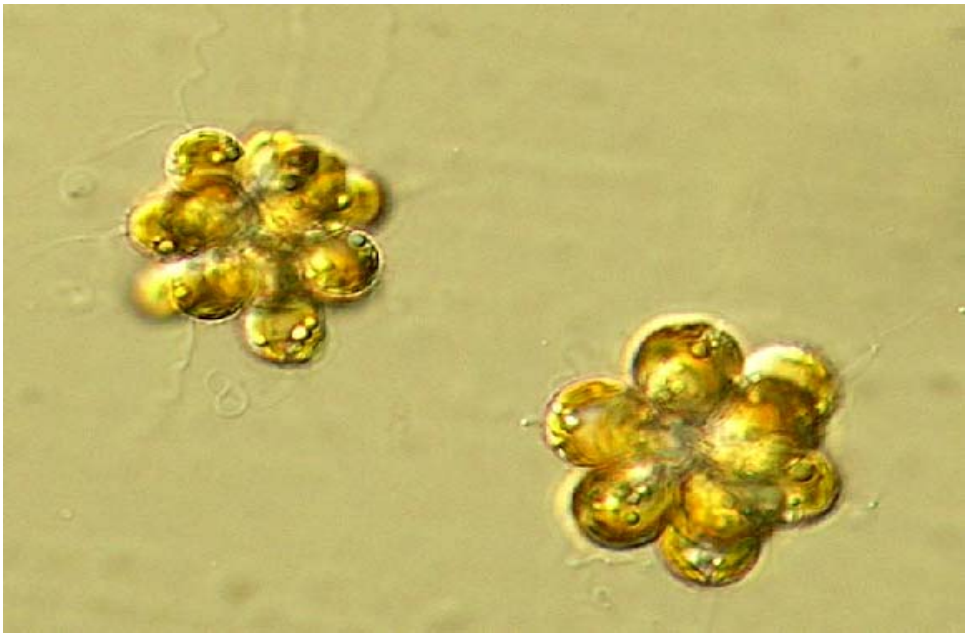
3.2.12. Sekvenace

Sekvenaci zajistila Laboratoř sekvenace DNA - Viničná 7, Praha 2.
Použitý sekvenátor: 3100 Avant Genetic Analyzer

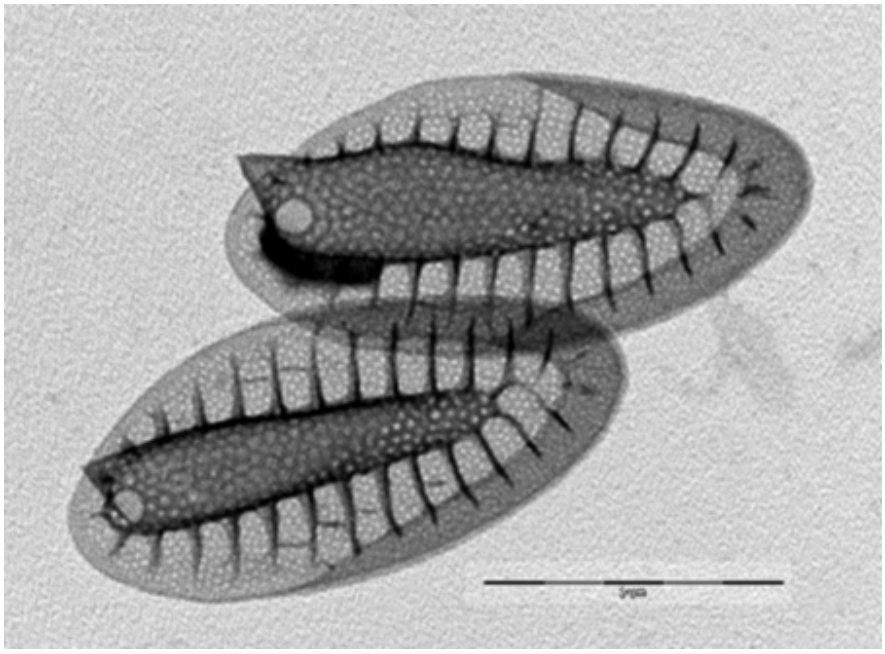
3.3. Vlastní výsledky

3.3.1. Vlastní kultury

Podařilo se mi získat několik kultur rodu *Synura* (Obr. 10), které jsem podle EM snímků určila jako druh *Synura petersenii* (Obr. 11).



Obr. 10 - LM snímek - živé kolonie druhu *Synura petersenii* (vlastní kultura)



Obr. 11 - TEM snímek šupin druhu *Synura petersenii* (vlastní kultura)

3.3.2. Izolace DNA

Hodnoty naměřené koncentrace DNA izolované metodou CTAB jsou uvedeny v tabulce 16.

vzorek	objem	kmen	c (ng/µl)	A (λ = 260/280)	A (λ = 320)
S1	Celá Eb	*S. curtispina* 1	23	1,76	0,133
S2	40 µl	*S. curtispina* 1	6	1,06	0,004
M1	Celá Eb	*M. kalinae*	34	2,07	0,004
M2	40 µl	*M. kalinae*	5	2,06	0,002

Tab. 16 - izolace DNA metodou CTAB
Eb = Erlenmeyerova baňka

Hodnoty naměřené koncentrace DNA izolované pomocí kitu JetQuick Tissue jsou uvedeny v tabulce 17.

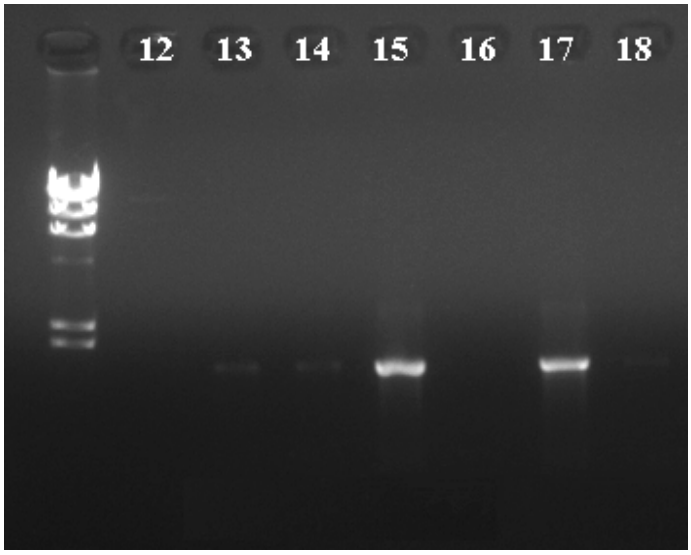
označení	kmen	c (ng/µl)	A (λ = 260/280)	A (λ = 320)
S3	*S. curtispina* 1	13	1,09	0,001
M3	*M. kalinae*	12	1, 82	0,018
1	*S. petersenii* 1 *	9	2,34	0,020
2	*S. petersenii* 2 *	14	1,99	0,064
3	*S. petersenii* 3 *	9	2,56	0,018
4	*M. acaroides* *	10	2,14	0,018
5	*M. ouradion* 1	7	1,81	0,009
6	*M. ouradion* 2	6	1,82	0,005
7	*M. ouradion* 3	6	1,76	0,007
8	*M. ouradion* 4 †	15	1,13	0,020
9	*M. ouradion* 5	11	1,68	0,037
10	*M. ouradion* 6	7	1,84	0,004
11	*M. ouradion* 7	4	1,77	0,006
12	*S. petersenii* 4	5	1,56	0,006
13	*S. curtispina* 2	3	1,65	0,001
14	*S. echinulata* 1	5	1,56	0,016
15	*S. sphagnicola*1	29	1,66	0,127
16	*S. sphagnicola* 2	5	1,57	0,006
17	*S. echinulata* 2	5	1,49	0,019
18	*S. echinulata* 3	4	1,78	0,001

Tab. 17 - izolace pomocí kitu. * - kultura byla zamražená
† - buňky byly zacystované

3.3.3. PCR

3.3.3.1. PCR I

Při prvním PCR jsem použila vzorky S1, S2, M1, M2, S3 a M3.
Použila jsem mastermix uvedený v tabulce. 10 a cyklus 1 (Tab. 4).
Použila jsem 2 různé kombinace primerů (Tab. 12).



Obr. 12 - výsledky PCR I

Obr. 12 ukazuje výsledky PCR I. PCR produkt jsem získala u vzorků 15 a 17, tj. M1 a S3.
Při čištění PCR produktu jsem naneštěstí udělala chybu a oba produkty jsem znehodnotila.

3.3.3.2. PCR II

Použila jsem vzorky S3 a M1, které se v minulém PCR osvědčily.
Kromě osvědčené kombinace primerů G01 a 18L jsem použila ještě kombinaci 34F a G07 (Tab. 13).

Použila jsem cyklus 1 (Tab. 4), který se běžně používá v naší laboratoři a modifikovaný cyklus 2, lišící se v teplotě pro annealing (Tab. 5).
Gelovou elektroforézou jsem zjistila, že se mi nepodařilo získat žádný PCR produkt.

3.3.3.3. PCR III

Použila jsem vzorky vyizolované DNA 1 - 18 (Tab. 17).
Použila jsem primery G01 a LAVAU R a cyklus 1 (Tab. 4).
Nezískala jsem žádný PCR produkt.

3.3.3.4. PCR IV

Použila jsem vzorek vyizolované DNA M1 (Tab. 16) a vzorek 1 (*S. petersenii*) (Tab. 17).
Použila jsem primery G01 a LAVAU R.
Podle programu Fast PCR bylo ideální rozmezí teplot pro annealing pro danou dvojici primerů (58 - 65°C).
Použila jsem cyklus 1 (Tab. 4), s gradientem teplot pro bod 3 (annealing) (Tab. 8).
Opět se mi nepodařilo získat žádný PCR produkt.

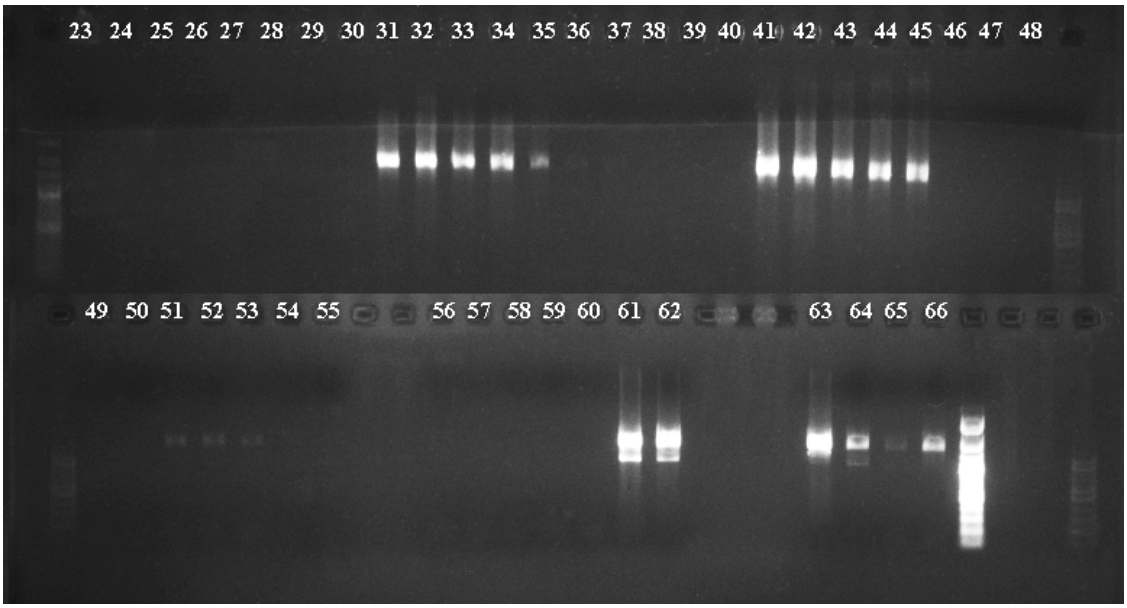
3.3.3.5. PCR V

Vyzkoušela jsem mnoho kombinací různých faktorů, které mohou ovlivnit průběh reakce (Tab. 14).
Použila jsem 3 vzorky vyizolované DNA: M1 (Tab. 16), 3 a 15 (Tab. 17),
5 teplot annealingu (Tab. 9),
3 kombinace primerů: G01a LAVAU R, G01 a 18L, 34F a 18L,
3 koncentrace DNA: neředěná, ředěná na 5 ng/µl, ředěná 100x,
2 objemy primerů: 0,25 µl/vzorek, 0,2 µl/vzorek,
do některých mastermixů jsem přidala $MgCl_2$ (Tab. 11).

Annealing vzorků 61 - 66 probíhal při teplotě 52 °C.

Použila jsem cyklus 3 (Tab. 6).

Podařilo se mi získat produkt u devatenácti vzorků: 31 - 35, 41 - 45, 51 - 53 a 61 - 66 (Obr. 13).



Obr. 13 - výsledky PCR V
31 - 35 ... M1, MM2A, ředění na 5 ng/µl a žádné ředění, $MgCl_2$
41 - 45 ... 15 MM2A, ředění na 5 ng/µl, $MgCl_2$
51 - 53 ... *3*, MM2A, 100x ředěná, $MgCl_2$
61 - 66 ... různé, MM3, normální i 100x ředění, $MgCl_2$

Pro vzorky 31 - 35 byla použita vyizolovaná DNA M1, teploty 52 - 62 °C, primery G01 a 18L, DNA ředěná na 5 ng/µl (u vzorků 32 a 34 neředěná), objem primerů 0,25 µl/vzorek, $MgCl_2$.

Pro vzorky 41 - 45 byla použita vyizolovaná DNA 15, teploty 52 - 62 °C, primery G01 a 18L, DNA ředěná na 5 ng/µl,objem primerů 0,25 µl/vzorek, $MgCl_2$.

Pro vzorky 51 - 53 byla použita vyizolovaná DNA 3, teploty 52 - 62 °C, primery G01 a 18L, DNA ředěná 100x, objem primerů 0,25 µl/vzorek, $MgCl_2$.

Pro vzorky 61 a 64 byla použita vyizolovaná DNA M1.

Pro vzorky 62 a 65 byla použita vyizolovaná DNA 3.

Pro vzorky 63 a 66 byla použita vyizolovaná DNA 15.
Pro vzorky 61 - 66 byla použita teplota 52°C, primery 34F a 18L,DNA ředěná na 5 ng/µl,objem primerů 0,25 µl/vzorek, $MgCl_2$.

3.3.4. Přečištění PCR produktu, sekvenační PCR a srážení

Změřila jsem koncentraci přečištěných produktů (Tab. 18).

vzorek	c (ng/µl)	A (λ = 260/280)	A (λ = 320)
32	28	3,76	0,012
42	31	2,95	0,050
51 + 52	22	4,82	0,006

Tab. 18 - koncentrace přečištěných produktů PCR V

Od každého ze vzorků 32 a 42 jsem získala 3 čisté produkty a jeden nepoužitelný. Všechny 4 produkty směsného vzorku 51 + 52 byly nepoužitelné.
Skloubením těchto produktů jsem získala 2 částečné sekvence 18S: sekvenci kmene *S. sphagnicola* 1 (Tab. 2) o délce 1268 bazí a sekvenci kmene *M. kalinae* CAUP B601 (Tab. 2) o délce 1284 bazí.

3.4. Diskuse

3.4.1. Izolace a kultivace rodu *Synura*

Pěstování kultur zástupců třídy Synurophyceae je poměrně nesnadné. Jsou dosti citliví na jakékoli odchylky od ideálních podmínek a jejich nároky na složení média i na ostatní okolní faktory nejsou ještě zcela prozkoumané. Při kontaminaci kulturu obvykle rychle přerůstá jiný organismus. Poměrně snadno se pěstuje *Synura petersenii*, která se mi také podařila kultivovat.

Další druhy jsem ve svých kulturách nezjistila, ale do stadia vhodného pro zpracování pro EM a provedení PCR jich ještě příliš mnoho nedospělo.

3.4.2. Izolace DNA

Pro izolaci DNA jsou obě vyzkoušené metody účinné a poskytují dostatečné množství produktu pro následné provedení PCR, a to i v případě izolace z malého počtu buněk. Mělo by tedy být možné v budoucnu izolovat DNA z chrysomonád kultivovaných pouze v malých komůrkách plastových kultivačních destiček bez toho, aby byly převedeny do Erlenmeyerovy baňky. Celé kultury rodu *Synura* a *Mallomonas* totiž často bez zjevné příčiny uhynou asi tak po pěti týdnech kultivace (Němcová, osobní sdělení), takže možnost izolace DNA z menšího počtu buněk je velice výhodná.

Při izolaci DNA pomocí kitu se ukázalo, že dobrých výsledků se dá dosáhnout i v případě, kdy se chrysomonády encystují, což se v kulturách nezřídka stává. Důležité také bylo zjištění, že na výsledek nemá vliv zmražení buněk. Proto je možné kulturu po dosažení dostatečného množství buněk zamrazit a izolaci provádět až po čase a bez nebezpečí, že kultura do té doby uhyne.

3.4.3. PCR

Primery

Jako nejlepší kombinace se ukázal pro chrysomonády specifický primer G01 spolu s nespecifickým eukaryotním 18L. Získaný produkt byl čistý.

Určitých výsledků bylo dosaženo i s primery 34F a 18L, ale jak ukázal gel (Obr. 13), produkt nebyl čistý. Ani jeden z těchto primerů není specifický pro chrysomonády a kultury nebyly axenické. Proto mohla projít PCR i DNA z jiného organismu, kterým byla kultura kontaminovaná.

Primery G01 a LAVAU R jsou oba pro chrysomonády specifické, ale při jejich použití jsem nezískala žádný produkt. Mohlo to být způsobené tím, že tyto 2 primery mají tendenci se vázat na sebe navzájem, jak jsem zjistila v programu FastPCR (Kalendar, 2007).

Když jsem zkoušela alignment primeru G07 a sekvence zástupce rodu *Synura*, zjistila jsem, že tento primer dostatečně této sekvenci neodpovídá, a nemůže tedy být účinný.

Teplota

Zjistila jsem, že při teplotách mezi 52 °C a 62 °C můžeme získat produkt a na teplotě zde téměř nezáleží. Ideální se zdá teplota 52 °C, při teplotě 62 °C už je produktu o něco méně.

$MgCl_2$

Přidání $MgCl_2$ do mastermixu se ukázalo jako klíčové. Produkt jsem získala pouze ze vzorků, jejichž mastermix $MgCl_2$ obsahoval. Mg^{2+} je nutné pro správnou funkci DNA-polymerázy a při naší koncentraci dNTP, na které se Mg^{2+} váže, byla jeho koncentrace zjevně nedostačující.

Ředění DNA

Nejlepší produkt jsem získala ze vzorků s DNA ředěnou na 5 ng/µl a také s DNA, kterou jsem neředila vůbec. Produkt získaný ze 100x ředěné DNA měl velice malou koncentraci, což se odrazilo i při následné sekvenaci.

Ředění primerů

Výsledky u vzorků s ředěnými primery není možné porovnat s ostatními, neboť byly pouze v MM1, který obsahoval nefunkční kombinaci primerů. Obvyklá koncentrace primerů se ovšem osvědčila a při vhodných kombinacích ostatních parametrů se ukázala jako funkční.

Cykly

Cyklus 1 (18S_Gotting) se ukázal jako funkční a jeho teplota annealingu jako nejlepší z testovaných, cyklus 2 má oproti cyklu 1 zbytečně vysokou teplotu annealingu.

3.4.4. Sekvenační PCR

Sekvence získané sekvenační reakcí s primerem 1122F byly nepoužitelné. Alignmentem tohoto primeru se známými sekvencemi rodu *Synura* jsem zjistila, že jeden nukleotid sekvencím neodpovídá. To mělo nejspíš za následek špatné nasedání primeru. Produkt ostatních použitých primerů, 34F, 370R a 1263R, byl dobrý a získané sekvence čisté.

3.5. Shrnutí

V budoucnosti budu dále pro kultivaci chrysomonád používat osvědčené médium DYIV.

Pro izolaci DNA se ukázala jako vhodná jak metoda CTAB, tak i kit Jet Quick Tissue. CTAB je oproti kitu levnější, ale izolace pomocí kitu je snadnější a méně časově náročná. Pokud tedy bude dostatek financí, budu používat kit.

Pro PCR se jeví jako nejlepší tento mastermix (Tab. 19):

složka	**µl na 1 vzorek**
pufr	2,0
dNTP	0,4
G01	0,2
18L	0,2
RedTaq Jump Start	0,5
voda	15,2
$MgCl_2$	0,5
DNA normálně ředěná	1,0

Tab. 19 - optimální mastermix pro PCR

Pokud by nebyl získán žádný produkt, je možné zvýšit množství přidávaného $MgCl_2$. V případě, že produkt není čistý, je třeba naopak množství přidávaného $MgCl_2$ snížit (Khosravina & Ramesha, 2006).

Jako nejvhodnější se ukázal být cyklus 1 (Tab. 4).

Budou potřeba další pokusy pro nalezení optimálního primeru, který by nahradil testovaný primer 1122F v sekvenační reakci.

Je s výhodou používat čtvrtinovou sekvenační reakci, neboť přináší dobré výsledky a spotřebuje se při ní méně drahého materiálu než při reakci poloviční či celé.

4. PŘEDBĚŽNÁ FYLOGENETICKÁ ANALÝZA

4.1. Úvod

Synurophyceae je třída s mnoha zástupci, velmi hojná a kosmopolitně rozšířená (Kristiansen, 2000). Z mnoha studií známe strukturu a morfologii jejich křemičitých šupin a na nich se nacházejících znaků, charakteristických pro jednotlivé druhy. Na těch je založená taxonomie rodů *Synura* i *Mallomonas* (Petersen & Hansen, 1956, 1958, Asmund & Kristiansen, 1986, Peterfi & Momeu, 1977). Studií zabývající se molekulární fylogenetikou těchto organismů však zatím není příliš.

Nejčastěji sekvenovaným genem pro fylogenetické práce týkající se této třídy je 18S rRNA (Andersen et al., 1999, Cavalier-Smith 1993a, Ben Ali et al. 2001, Lavau et al. 1997). Pro vnitrodruhovou studii *S. petersenii* použil Wee et al. (2001) méně konzervované sekvence ITS/8,5S rRNA. Sekvenovány byly také geny pro LSU RuBisCo a 28S rRNA (Ben Ali et al. 2001) Dále byly sekvenovány geny pro alfa a beta tubulin, Hsp90 či pro aktin (Kim et al. 2006).

4.2. Materiál a metody

4.2.1. Použité sekvence

druh	kód	číslo kultury ve sbírce	sekvence
Chrysophyceae sp.	EF165163	CCMP 1161	rbcL
Dinobryon cylindricum	EF165157	CCMP 2766	rbcL
Dinobryon sertularia	AF123289	CCMP 1859	18S
Dinobryon sociale	EF165158	UTCC 392	rbcL
Dinobryon sociale var. *americana*	AF123291	CCMP 1860	18S
Mallomonas adamas	U73225	MUCC 287	18S
Mallomonas akrokomos	U73229	MUCC 288	18S
Mallomonas annulata	EF165127	CCMP 474	18S
Mallomonas annulata	EF165193	CCMP 474	rbcL
Mallomonas annulata	U73230	MUCC 289	18S
Mallomonas asmundae	AF015585	CCMP 1658	rbcL
Mallomonas caudata	U73228	FW 644	18S
Mallomonas insignis	EF165118	CCMP 2549	18S
Mallomonas insignis	EF165198	CCMP 2549	rbcL
Mallomonas kalinae B601	--	CAUP B601	18S
Mallomonas matvienkoae	U73227	MUCC 290	18S
Mallomonas papillosa	M55285	CCMP A3807	18S
Mallomonas rasilis	EF165195	CCMP 479	rbcL
Mallomonas rasilis	U73231	MUCC 292	18S
Mallomonas splendens	EF165147	CCMP 1782	18S
Mallomonas splendens	U73226	MUCC 294	18S
Mallomonas striata	EF165194	CCMP 2059	rbcL
Mallomonas striata	M87333	neuvedeno	18S
Synura curtispina	EF165128	CCMP 847	18S
Synura curtispina	EF165196	CCMP 847	rbcL

Tab. 20 - sekvence použité pro předběžnou fylogenetickou analýzu

druh	kód	číslo kultury ve sbírce	sekvence
Synura glabra	U73224	CCMP 851	18S
Synura mammillosa	U73220	MUCC 298	18S
Synura petersenii	EF165116	CCMP 854	18S
Synura petersenii	EF165117	CCMP 857	18S
Synura petersenii	EF165188	CCMP 851	rbcL
Synura petersenii	EF165189	CCMP 854	rbcL
Synura petersenii	EF165190	CCMP 857	rbcL
Synura petersenii	EF165191	SAG 24.86	rbcL
Synura petersenii	U73223	MUCC 300	18S
Synura sp.	DQ487199	není ve sbírce	18S
Synura sphagnicola	DQ980485	JYS 001	18S
Synura sphagnicola	EF165197	CCMP 1705	rbcL
Synura sphagnicola	U73221	CCMP 1705	18S
Synura sphagnicola 15	--	není ve sbírce	18S
Synura spinosa	M87336	neuvedeno	18S
Synura uvella	U73222	CCMP 871	18S
Synura uvella	EF165192	CCMP 871	rbcL
Tessellaria volvocina	EF165119	CCMP 1781	18S
Tessellaria volvocina	EF165199	CCMP 1781	rbcL
Tessellaria volvocina	U73219	MUCC 302	18S
Uncultured freshwater eukaryot	AY919787	není ve sbírce	18S

Tab. 20 - sekvence použité pro předběžnou fylogenetickou analýzu, pokračování
kód = kód sekvence v GeneBanku

4.2.2. Zpracování sekvencí

Vlastní sekvence 18S rRNA jsem manuálně upravila v programu SeqAssem ver. 09/2004 (Hepperle 2004). Ze svých sekvencí a sekvencí nalezených v GeneBanku jsem sestavila první alignment v programu MEGA verze 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004), ten jsem upravila, ořezala kraje a sporně alignovaná místa.

Dále jsem vytvořila maximum parsimony strom a dále pracovala jen se sekvencemi, které spadaly podle tohoto stromu mezi Synurophyceae nebo do jejich těsné blízkosti. Jako outgroup jsem zvolila rod *Dinobryon*, který jednoznačně mezi Synurophyceae nepatří. Tyto sekvence jsem znovu alignovala a upravovala.

Pomocí programu PAUP PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) jsem ze sekvencí sestavila nový MP strom. Použila jsem k tomu heuristic search s náhodným přidáváním sekvencí. Dále jsem ve stejném programu spočítala bootstrap (100) tohoto stromu.

Pro srovnání jsem stejným postupem vytvořila ještě jeden strom MP pro stejné sekvence 18S rRNA, ovšem tentokrát jsem nepoužila vlastní sekvence, a proto jsem mohla použít celé sekvence z GeneBanku, včetně jejich posledního úseku. Ten jsem v předcházejícím případě použít nemohla, neboť u mých sekvencí chyběl v důsledku použití nevhodného primeru.

Stejným způsobem jsem vytvořila MP strom ze sekvencí pro velkou podjednotku enzymu RuBisCo nalezených v GeneBanku.

Pro zobrazení vytvořených stromů jsem používala program TreeView (Win32) (Page, 2001).

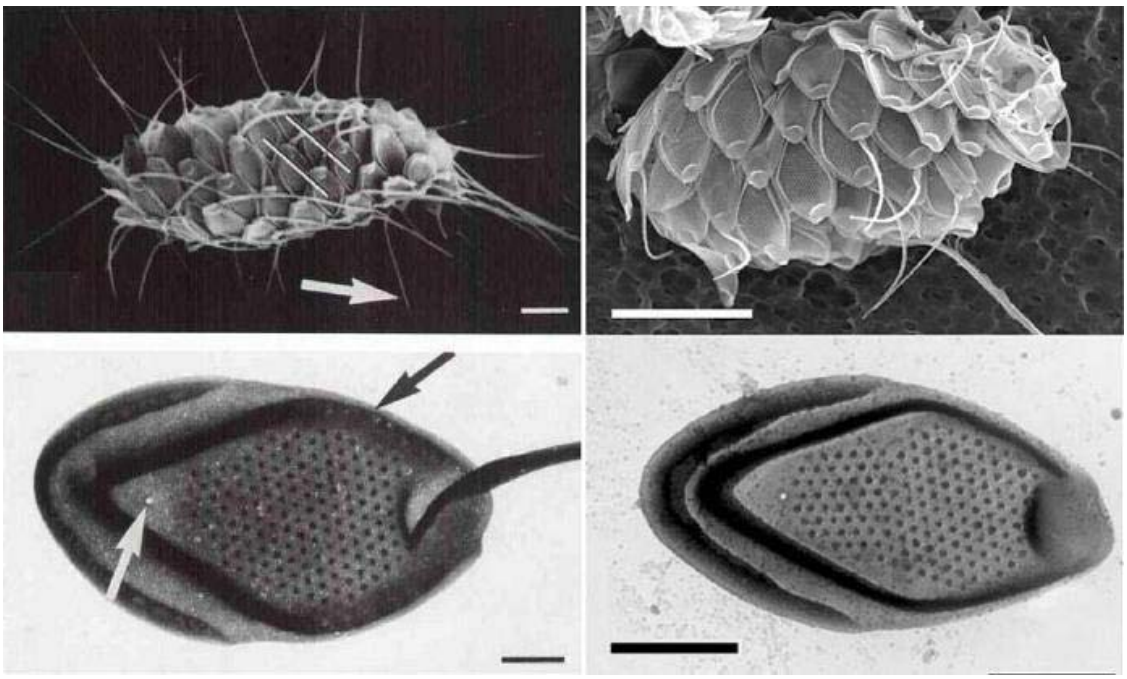
Z vybraných sekvencí získaných v GeneBanku jsem v programu BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) sestavila grafy shody mezi dvěmi sekvencemi.

4.3. Výsledky a diskuse

Porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi v GeneBanku se ukázala stoprocentní shoda naší sekvence druhu *Synura sphagnicola* se sekvencí U73221 z Genebanku a taktéž stoprocentní shoda naší sekvence *Mallomonas kalinae* se sekvencí U73231 (*Mallomonas rasilis*) a M55285 (*Mallomonas papillosa*) z GeneBanku.

Tento fakt otevřel otázku, zda je vůbec možné na základě genu pro 18S rRNA odlišit druhy třídy Synurophyceae a jestli nebude nutné používat nějaký méně konzervovaný gen.

Při prostudování údajů v GeneBanku ovšem vyšlo najevo, že determinace druhů, kterým tyto sekvence patří, jako *Mallomonas rasilis* nebo *Mallomonas papillosa*, je dosti nejistá. V článku, který se vztahuje k sekvenci U73231 (Lavau et al., 1997), je k dispozici TEM a SEM snímek šupiny i celé buňky, označované zde jako *Mallomonas rasilis*. Při srovnání s analogickými snímky *Mallomonas kalinae* z článku Magdy Řezáčové (2006) je patrné, že se s největší pravděpodobností jedná o stejný organismus, a to o *Mallomonas kalinae* (Obr. 18).



Obr. 18 - vlevo - snímky buňky (SEM) a šupiny (TEM) *Mallomonas* cf. *rasilis* ze článku k sekvenci U73231 (Lavau et al., 1997)
- vpravo - snímky buňky (SEM) a šupiny (TEM) *Mallomonas kalinae* z článku M. Řezáčové (2006).

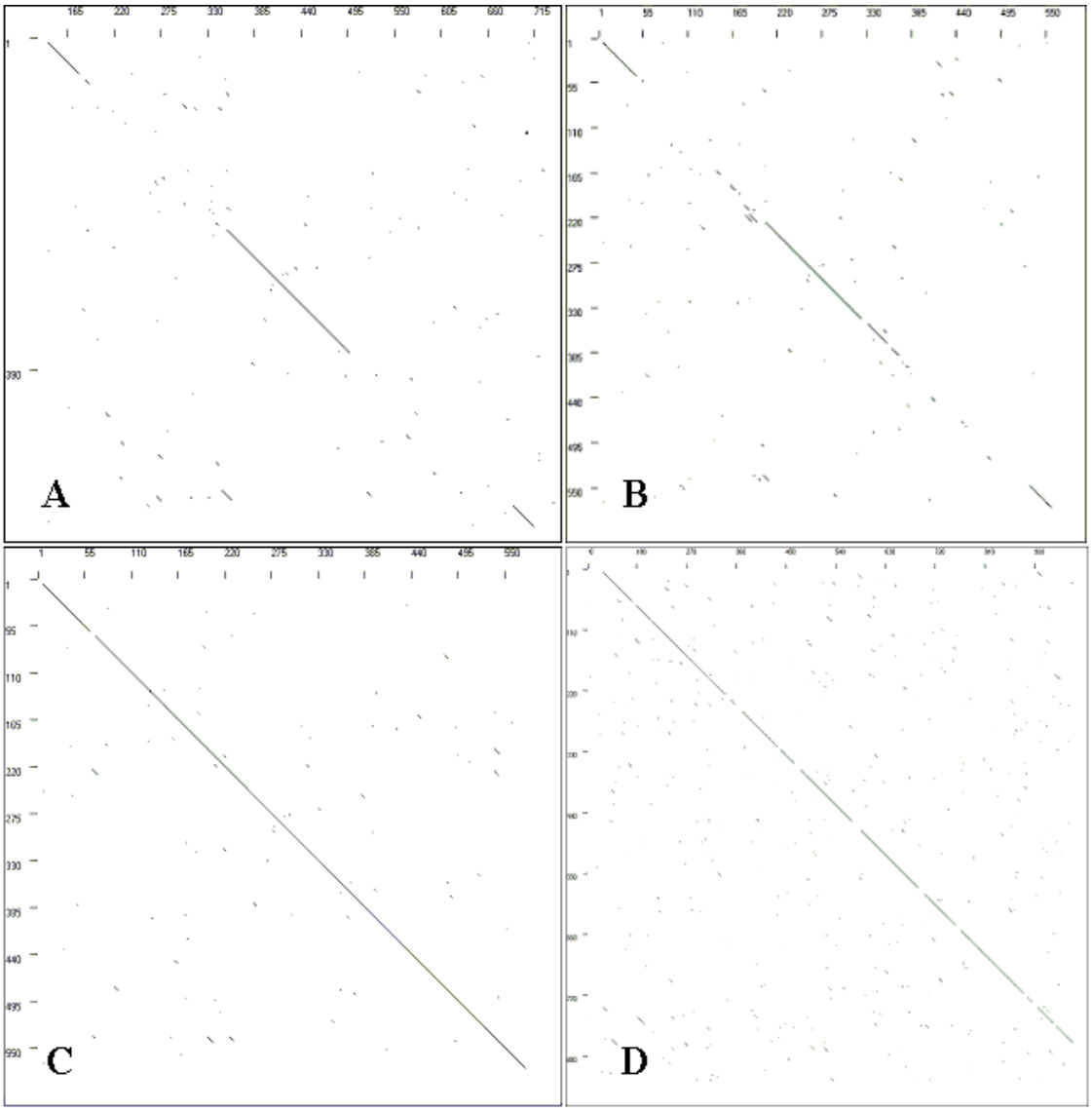
Sekvence uvedená v GeneBanku jako druh *Mallomonas papillosa* patří ke článku Ariztia et al. (1991). Kultura CCMP A3807, ze které tato sekvence pochází, byla určena

jako *M. Papillosa* Andersenem v roce 1984, ale posléze bylo jím samotným toto určení opraveno na *M. rasilis* a s tím byla spojena změna kódu této kultury na CCMP 479 (Škaloud, osobní sdělení). Je možné, že se i v tomto případě ve skutečnosti jedná o *Mallomonas kalinae*, bude ovšem potřeba kulturu přezkoumat.

Zdá se tedy, že 18S rRNA je vhodný gen pro analýzy tohoto typu.

Z grafů shody mezi dvěmi sekvencemi (Obr. 14) je dobře patrné, že pro studie na mezidruhové a mezirodové úrovni jsou vhodné kromě osvědčené sekvence 18S také sekvence RuBisCo, zatímco ITS nám zde nepodá žádnou relevantní informaci. Naproti tomu jsou sekvence ITS velice vhodné pro vnitrodruhové studie, ale na úrovni druhů už pozbývají výpovědní hodnotu.

Výsledkem provedené analýzy jsou 3 fylogenetické stromy. Získala jsem strom sekvencí 18S z GeneBanku s mými vlastními sekvencemi (Obr. 15) a bez nich (Obr. 16). Dále potom strom sekvencí rbcL (Obr. 17).



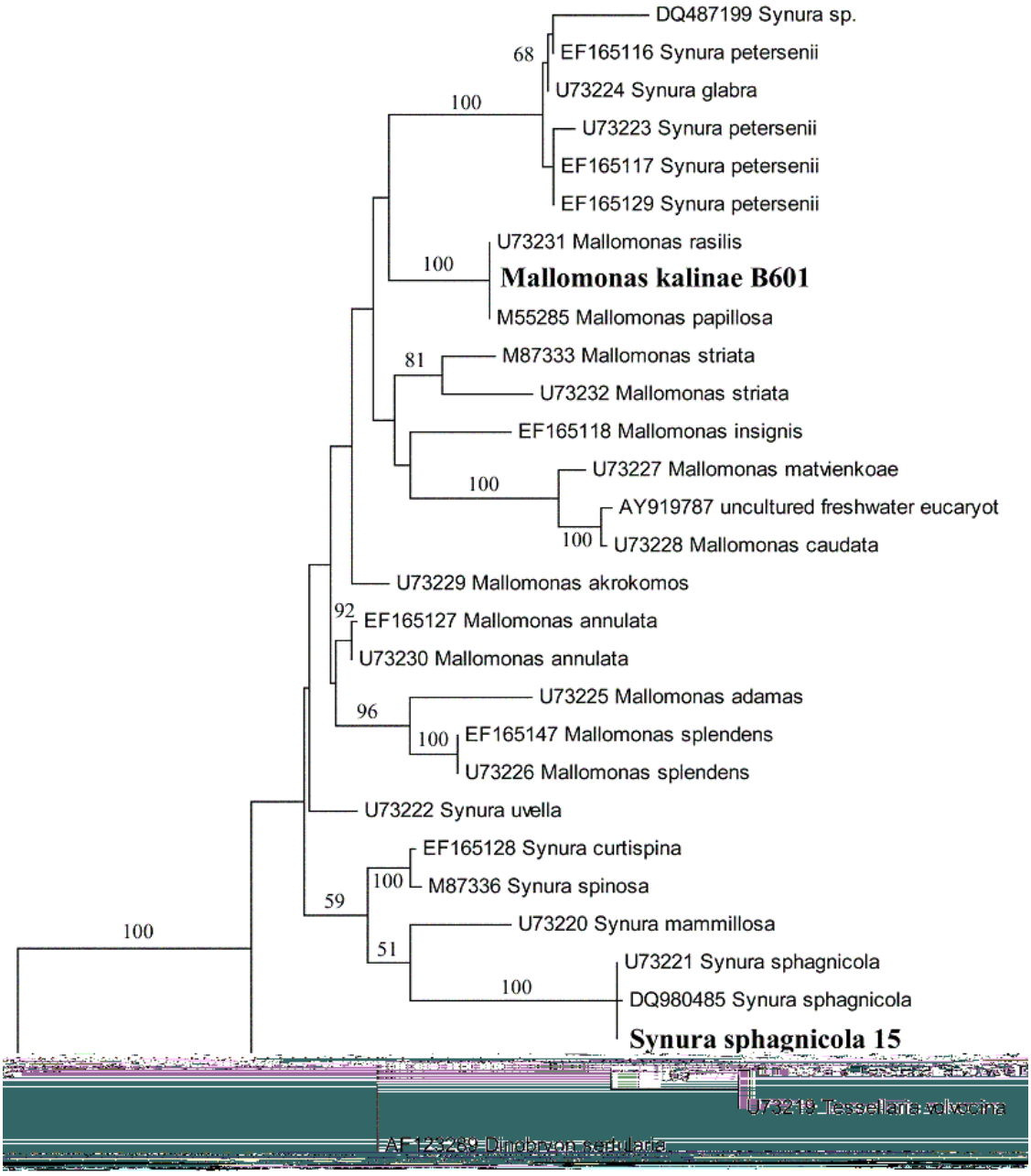
Obr. 14 - grafy shody mezi dvěmi sekvencemi

A - sekvence ITS/8,5S druhů *Synura petersenii* a *Mallomonas asmundae*

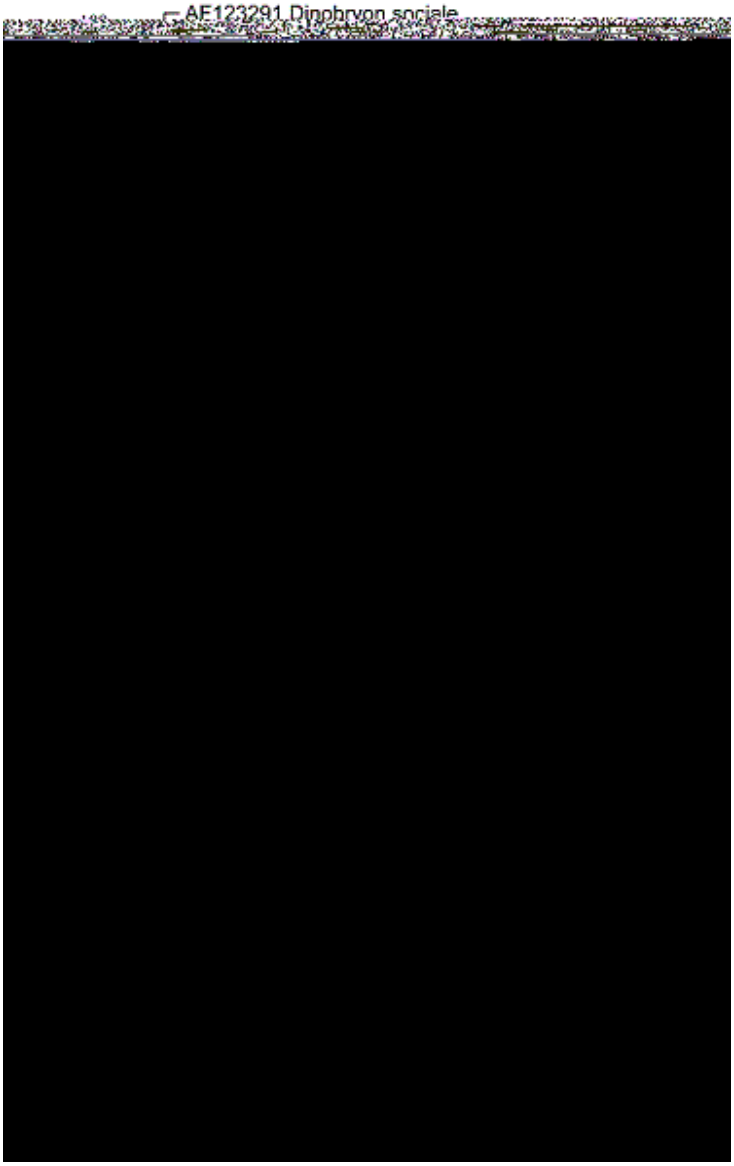
B - sekvence ITS/8,5S druhů *Synura petersenii* a *Synura uvella*

C - sekvence ITS/8,5S dvou různých kultur druhu *Synura petersenii*

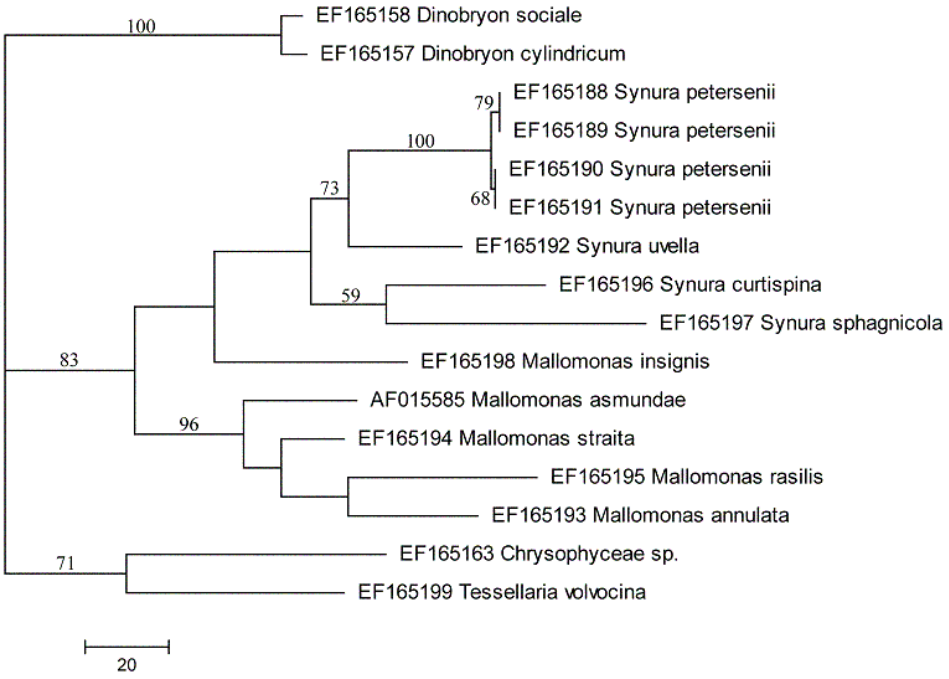
D - sekvence LSU RuBisCo druhů *Synura petersenii* a *Mallomonas asmundae*



Obr. 15 - Strom 1 - Strom maximum parsimony vytvořený pro sekvence 18S rRNA.



Obr. 16 - Strom 2 - Jeden ze čtyřiceti devíti nejvíce parsimonních stromů, vytvořených pro sekvence 18S rRNA.
Tučně - moje vlastní sekvence.



Obr. 17 - **Strom 3** - Jeden ze šesti nejvíce parsimonních stromů, vytvořených pro sekvence LSU RuBisCo.

Odlišnosti stromu 18S rRNA s mými sekvencemi (obr. 15) oproti stromu bez nich (Obr. 16) vyplývají z toho, že mé sekvence postrádaly poslední úsek, a strom byl tedy sestavován z kratších sekvencí.

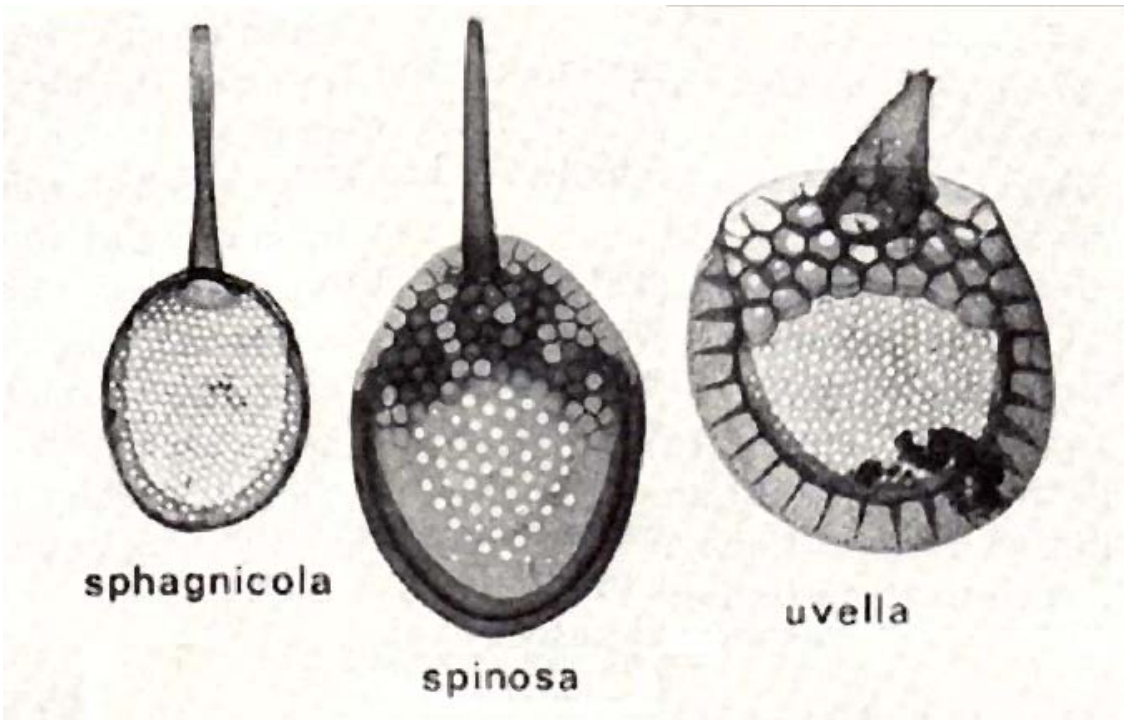
Ve všech třech stromech (Obr. 15, 16, 17) se nicméně potvrdila *Tessellaria volvocina* jako bazální taxon třídy Synurophyceae.

Ve stromech 2 (Obr. 16) a 3 (Obr. 17) jsou rody *Mallomonas* a *Synura* oddělené a monofyletické, ale s velmi nízkou podporou. Pozice *Mallomonas insignis* ve stromu 3 je značně nejasná, neboť má slabý bootstrap. Ve stromu 1 (Obr. 15) spadá dobře podpořená skupina *Synury petersenii* mezi zástupce rodu *Mallomonas* a ostatní zástupci rodu *Synura* se ocitají na bázi této smíšené větve, avšak ani toto umístění není podpořeno dostatečně vysokým bootstrapem. Z těchto výsledků se tedy nedá soudit, zda je rod *Synura* monofyletický, či parafyletický.

Všechny tři stromy silně potvrzují monofylii komplexu *Synura petersenii* a dále

ukazují mírnou variabilitu v rámci tohoto komplexu.

Ve stromech 1 a 2 se opakuje pořadí odštěpování větví ve směru *S. uvella*, *S. curtispina* a *spinosa* a *S. sphagnicola*. To kontrastuje s představou, že se tyto druhy vyvíjely postupně k složitějším strukturám na šupinách (Wee, 1997). Naopak se z těchto předběžných výsledků zdá, že se jednalo spíše o postupné zjednodušování a ubývání sekundárních struktur na šupinách (Obr. 19).



Obr. 19 - šupiny druhů *S. sphagnicola*, *S. spinosa* a *S. uvella* (Kristiansen, 1975)

5. ZÁVĚR

Ve své práci jsem se pokusila shrnout dosavadní znalosti týkající se fylogenetiky rodu *Synura,* jeho vztahů k ostatním rodům třídy Synurophyceae a poznatky o třídě Synurophycecae. Přehled o dané problematice, který jsem tím získalaby mi měl dále sloužil jako základ pro další práci.

V praktické části jsem optimalizovala metody potřebné pro další studium v této oblasti.

Poslední část mé práce ukázala mnoho zajímavých problémů, kterými bych se chtěla v budoucnosti hlouběji zabývat. Takovým problémem je například otázka monofylie rodu *Synura*, variabilita v rámci druhu *Synura petersenii* či směr vývoje struktur křemičitých šupin. Doufám tedy, že na tuto práci budu moci navázat dalšími studiemi, a zejména potom diplomovou prací, která může objasnit některé z nastíněných problémů.

6. POUŽITÉ ZKRATKY

CTAB - cetyl trimethyl amonium bromid

dNTPs - deoxynukleotid trifosfáty

Eb - Erlenmeyerova baňka

EM -electronový mikroskop

Epp. - mikrozkumavka - typ Eppendorf

GA - Golgiho aparát

ITS - internal transcribed spacer

LM - světelný mikroskop (light microscope)

LSU - velká podjednotka (large subunit)

MM - mastermix

MP - maximum parsimony

PCR - polymerase chain reaction

PER - periplastidiální endoplazmatické retikulum

PVP - polyvinyl pyrrolidon

RuBisCo - ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza

SDV - silikon-depozitní váček

SEM - skenovací elektronový mikroskop

TEM - transmisní elektronový mikroskop

7. PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kdo mi umožnili napsat tuto práci.

Děkuji RNDr. Yvonne Němcové PhD. za cenné rady, pomoc při zvládání technik elektronové mikroskopie a pěstování kultur a za zapůjčené kultury. Dále děkuji všem členům algologického pracoviště PřF UK a DNA laboratoře katedry botaniky PřF UK za pomoc a podporu.

Můj dík za podporu patří dále mým rodičům.

Především chci ovšem poděkovat svému školiteli Mgr. Pavlovi Škaloudovi za výborné vedení mé práce, za výjimečnou trpělivost při mém zaškolování a za to, že mi pomohl zvolit si toto téma, které mě nesmírně zaujalo.

8. LITERATURA

Andersen, R. A. 1985. The flagellar apparatus of the golden alga *Synura uvella*: four absolute orientations. Protoplasma 128: 94-106. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Andersen, R. A. 1987. Synurophyceae classis nov., a new class of algae. - Amer. J. Bot. 74: 337-353.

Andersen, R. A. & T. J. Mulkey. 1983. The occurence of chlorophylls c1 and c2 in the Chrysophyceae. J. Phycol. 19: 289-294. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Andersen, R. A., Y. Van de Peer, M. D. Potter, J. P. Sexton, M. Kawachi, T. LaJeunesse. 1999. Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae. Protist 150: 71-84.

Ariztia, E. V., R. A. Andersen & M. L. Sogin. 1991. A new phylogeny for chromophyte algae using 16S-like rRNA sequences from *Mallomonas papillosa* (Synurophyceae) and *Tribonema aequale* (Xanthophyceae). Journal of Phycology 27: 428-436.

Asmund, B. 1955. Electron microscope observations on *Mallomonas caudata* and some remarks on its ocurence in four Danish ponds. Bot. Tidsskr. 52: 163-168.

Asmund, B. & J. Kristiansen. 1986. The genus *Mallomonas* (Chrysophyceae). Opera Botanica 85.

Balonov, I. M. & G. V. Kuzmin. 1974. Species of the genus *Synura* Ehr. (Chrysophyta) in water reservoirs of the Volga Cascade. Bot. Jurn., Leningrad. 59: 1975-1986.

Barreto, S. 2005. The silica-scaled chrysophyte flora of Hungary. Nov. Hedw, Beih. 128: 11-41.

Ben Ali, A. De Baere, R., Van der Auwera, G., De Wachter, R., Van de Peer, Y. 2001. Phylogenetic relationships among algae based on complete large-subunit rRNA sequences. Int. Syst. Evol. Microbiol. 51: 737-749.

Bourrelly, P. 1957. Recherches sur les Chrysophycées: Morphologie, Phylogénie, Systématique. Rev. Algol. Mém. Hors.-Sér. 1: 1-412. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Calado, A. J., J. A. Rino. 1994. *Chlorodesmos hispidus*, a morphological expression of *Synura spinosa* (Synurophyceae). Nordic Journal of Botany. VOL 14; NUMBER 2, pages 235

Cavalier-Smith, T. 1993a. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiol. Rev. 57:953-994

Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19: 11-15.

Ehrenberg, C. G. 1835. Dritter Beitrag zur ER kenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. Abh. König. Akad. Wiss. Berlin (1833): 145-336 In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Fott, B. 1955. Scales of *Mallomonas* observed in the electron microscope. Preslia 27: 280-282.

Goertzen, L. R. & E. C. Theriot. 2003. Effect of taxon sampling, character weighting, and combined data on the interpretation of relationships among the heterokont algae. Journal of Phycology 39: 423-439.

Graham, L. E., J. M. Graham, D. E. Wujek. 1993. Ultrastructure of *Chrysodidymus synuroideus* (Synurophyceae). J. Phycol. 29: 330-341.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.

Hepperle, D. 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version.

Kalendar, R. 2007. FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. (www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm)

Khosravina, H. & K. P. Ramesha. 2006. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (3): 184-187.

Kim, E., A. G. Simpson, L. E. Graham. 2006. Evolutionary Relationships of Apusomonads Inferred from Taxon-Rich Analyses of 6 Nuclear Encoded Genes. Mol. Biol. Evol. 23(12): 2455-2466.

Klebs, G. 1893a. Flagellatenstudien. I. Zeitschr. Wiss. Zool. 55: 265-351. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Kristiansen, J. 1975. On the occurence of the Species *Synura*. Vehr. Intern. Ver. Limnol. 19, 2709.

Kristiansen, J. 1986. The ultrastructural basis of chrysophyte systematics and phylogeny. Crit. Rev. Plant. Sci. 4: 149-211.

Kristiansen, J. 2000. Cosmopolitan chrysophytes. Syst. Geogr. Pl. 70: 219-300.

Kristiansen, J., G. Cronberg (eds.). 1996. Chrysophytes: Progress and New Horizons. Nova Hedw. Beih. 114: 1-226.

Kristiansen, J. & M. S. Vigna. 1994. Tubular scales in *Synura* and the possible origin of bristles in *Mallomonas* (Synurophyceae). Phycologia 33: 67-70. In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Kristiansen, J. & H. R. Preisig. (eds.) 2001. Encyclopedia of Chrysophyte Genera. - Bibl. Phycol. 110. In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Kumar, S., K. Tamura, M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.

Lavau, S., G. W. Saunders, R. Wetherbee. 1997. A phylogenetic analysis of the Synurophyceae using molecular data and scale case morphology. J. Phycol. 33: 135-151.

Leadbeater, B. C. S. 1986. Scale case production in *Synura petersenii* Korsh. (Chrysophyceae. In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Leadbeater, B. C. S. 1990. Ultrastructure and Assembly of the Scale Case in *Synura* (Synurophyceae, Andersen). B. Phycol. J. 25: 117-132.

Leadbeater, B. S. C. and Baker, D. A. N. 1995. Biomineralization and scale production in the Xhrysophyta. In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Manton, I. 1955. Observations with the electron microscope on *Synura caroliniana* Whitford. Proc. Leeds Philos. Soc. VI(V): 306-316. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

McGrorgy, C. B., and B. S. C. Leadbeater. 1981. Ultrastructure and deposition of silica in the Chrysophyceae. In: T. L. Simpson & B. E. Volcani (eds.). The biology of seaweeds. pp. 559-588. University of California Press, Berkeley.In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Mignot, J.-P. & G. Brugerolle. 1982. Scale production in chrysomonad flagellates. J. Ultrastr. Res. 81: 13-26. In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Mullis, K. B. & F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-50.

Page, R. D. M. 2001. TreeView (Win32)

Pascher, A. 1912. Über Rhizopoden und Palmellastadien bei Flagellaten (Chrysomonaden), nebst einer Übersicht über die braunen Flagellaten. Arch. Protistenk. 25: 153-200. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Pascher, A. 1931. Systematiche Übersicht über die mit Flagellaten in Zuzammenhang stehenden Algenreihen und Versuch einer Einreihung dieser Algenstämme in die Stämme des Pflanzenreiches. Beih. Bot. Centralbl. 48: 317-332. In: Kristiansen, J. 2005. Golden Algae: A Biology of Chrysophytes. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

Péterfi, L. S. & L. Momeu. 1977. Remarks on the taxonomy of some *Synura* species based on the fine structure of scales. Stud. Comun. St. Nat. 21: 15-23.

Petersen, J. B. 1918. Om *Synura uvella* Stein og nogle andre Chrysomonadiner. Vid. Medd. Dansk Naturh. Foren. 69: 345 In: Kristiansen, J. 1986. The ultrastructural basis of chrysophyte systematics and phylogeny. Crit. Rev. Plant. Sci. 4: 149-211.

Petersen, J. B. & J. B. Hansen. 1956. On the scales of some *Synura* species. Biol. Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk. 23(2): 3-27.

Petersen, J. B. & J. B. Hansen. 1958. On the scales of some *Synura* species II. Biol. Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk. 23(7): 3-13.

Preisig, H. R. 1994. Siliceous structures and silification in flagellated protists. Protoplasma 181: 29-42.

Preisig, H. R. 1995. A modern concept of Chrysophyte classificaion. In: C. D. Sandgren, J. P. Smol, J. Kristiansen (eds.). Chrysophyte Algae. Ekology, phylogeny and development. pp. 46-74. Cambridge University Press.

Řezáčová, M. 2003. Ekologie a rozšíření chrysomonád s křemitými šupinami (Chrysophyceae, Synurophyceae). Bakalářská seminární práce, depon. in: knihovna Kat. botaniky PřF UK, Praha.

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

Sandgren, C., S. A. Hall, S. B. Barlow. 1996. Siliceous scale production in Chrysophyte and Synurophyte algae. I. Effects of silica-limited growth on cell-silica content, scale morphology, and the construction of the scale layer of *Synura petersenii*. J. Phycol. 32: 675-692.

Siver, P. A. 1991. The Biology of *Mallomonas*. Kluwer Academic Publishers, Boston. In: Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Sorhannus, U. 2001. A „total evidence“ analysis of the phylogenetic relationships amog the photosynthetic stramenopiles. Cladistics 17: 227-41.

Stein, F. R. Von. 1878. Der organismus der Infusionsthiere III. Abtheilung. I. Halfte. W. Engelmann, Leipzig. In: Andersen, R. A. 1987. Synurophyceae classis nov., a new class of algae. - Amer. J. Bot. 74: 337-353.

Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Tyler, P. A., L. D. Pipes, R. L. Croome, G. F. Leedale. 1989. *Tessellaria volvocina* rediscovered. Br. Phycol. J. 24: 329-337.

Wee, J. L. 1997. Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 497-534.

Wee, J. L., L. D. Fasone, A. Sattler, W. W. Starks, D. L. Hurley. 2001. ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae). Nov. Hedw. Beih. 122: 245-258.

Wujek, D. E. & J. Kristiansen. 1978. Observations on bristle- and scale-production in *Mallomonas* caudata. Arch. Protistenk. 120: 213-221.