

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

CHARAKTERIZACE NOVÝCH IZOLÁTŮ RODU CHROMERA

(CHROMERIDA: ALVEOLATA)

HALINA STEBLOVÁ

Školitel: Miroslav Oborník

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2011

Steblová, H., 2011: Charakterizace nových izolátů rodu *Chromera* (Chromerida: Alveolata). [Characterization of new isolates within the genus *Chromera* (Chromerida: Alveolata). Bc. Thesis, in Czech.] - 25 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: New isolates of alveolate protists with possible affiliation to the genus *Chromera* (Chromerida: Alveolata) were investigated using molecular biology and molecular phylogeny tools to assume their phylogenetic position and to reveal generic affiliation. According to the data, new isolates belong to the species *Chromera velia*.

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

29.4. 2011, České Budějovice

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Miroslavu Oborníkovi, že mi umožnil pracovat ve své laboratoři a také za cenné rady a připomínky. Speciální poděkování patří také Dr. Vancové a Doc. Miroslavu Oborníkovi za poskytnuté obrázky. Dále bych chtěla poděkovat všem lidem z laboratoře, především Járovi a Ogarovi za velikou pomoc, trpělivost a ochotu. Moje nemalé díky patří také mým rodičům za jejich psychickou a materiální podporu.

OBSAH

1. Úvod	1
1.1. Evoluce plastidu	1
1.2. Dinophyta	2
1.2.1. Plastidy obrněnek	2
1.3. Apikomplexa	3
1.3.1. Apikoplast.....	3
1.4. <i>Chromera velia</i>	4
1.5. RM 11 (CCMP3155)	5
1.6. Izoláty CT 11 a CT 24	6
2. Cíle práce	8
3. Metody	9
3.1. Kultivace materiálu	9
3.2. Izolace DNA	9
3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	9
3.4. Elektroforéza na agarózovém gelu, izolace PCR produktu z gelu	10
3.5. Klonování, transformace, izolace plasmidů	10
3.6. Sekvenování	11
3.7. Úpravy a identifikace sekvencí	11
3.8. Příprava datasetů a alignment sekvencí	11
3.9. Fylogenetické analýzy	11
4. Výsledky	12
4.1. Analýza genu pro 18S rRNA	12
4.2. Analýza genu pro plastidovou 23S rRNA	12
5. Diskuze	15
6. Závěr	17
7. Citace	18
8. Přílohy	25

1. Úvod

1.1. Evoluce plastidu

V rané evoluci eukaryot, heterotrofní eukaryotická buňka pohltila cyanobakterii a ponechala si ji v cytoplasmě. Postupem času se prokaryotický endosymbiont vzdal své autonomie a stal se světlo-pohlcující, oxid uhličitý-fixující a kyslík-produkující organelou přítomnou v současných fotosyntetizujících buňkách (Bhattacharya et al., 2007), tzv. plastidem. K tomuto procesu, nazývaném primární endosymbióza, došlo přibližně před 1,6 miliardami let (Hedges et al., 2004; Yoon et al., 2004). Tento primární plastid je obalen dvěma membránami (podobně jako cyanobakterie) a obsahuje svou vlastní DNA, redukce jeho genomu je však značná. V průběhu evoluce došlo ke ztrátám některých nepotřebných genů a k přesunu určitých genů do jádra hostitelské buňky (primární hostitel) procesem endosymbiotického genového transferu (Douglas, 1998; Gray, 1999). Endosymbiont si ponechal pouze část genů a původní jeho genom o velikosti 3 500 kb byl tedy zredukován až na 72 kb dlouhý genom zeleného primárního plastidu (*Ostreococcus tauri*) a 165 kb dlouhý genom červeného primárního plastidu (*Cyanidium caldarium*) (Martin a Herrmann, 1998; Martin et al. 2005). Proteinové produkty jaderných genů (původně kódované v plastidu) jsou však pro plastidový metabolismus nezbytné, a proto jsou vyráběny v cytoplasmě a posttranslačně cíleny do plastidu díky N-terminální cílicí sekvenci označované jako chloroplastový transitní peptid (McFadden, 1999; Vesteg et al., 2009). Sdílení genetické výbavy dělá tedy z endosymbionta organelu, integrální součást hostitelské buňky a jejího metabolismu. Primární endosymbióza dala tak v průběhu evoluce vznik skupině Archaeplastida, která se dělí na Chloroplastida, Rhodophyta (ruduchy) a Glaucophyta (Rodriguez-Ezpelenta et al., 2005).

Tím ovšem evoluce plastidů nekončí. Některé řasy totiž obsahují tzv. komplexní či sekundární plastid, který získaly sekundární endosymbiózou asi před 1,3 miliardami let (Yoon et al., 2004), při níž heterotrofní eukaryot pohltil fotosyntetickou eukaryotickou řasu, která již obsahovala primární plastid (Archibald a Keeling, 2002; Palmer, 2003; Keeling, 2004). Mnoho plastidových genů (u některých řas také jaderných genů primárního hostitele) byly přesunuty do jádra sekundárního hostitele endosymbiotickým genovým transferem. Jelikož jsou sekundární plastidy obaleny 3 – 4 membránami (dvě vnitřní původně primárního plastidu a 1 - 2 vnější), mají proteiny targetované do plastidu, kromě transitního peptidu, také signální peptid na N-konci, který cílí protein do endoplasmatického retikula a dále přes dvě vnější membrány komplexního plastidu. Transitní peptid poté dopraví protein kanonickou dráhou přes dvě vnitřní membrány plastidu (McFadden, 1999).

Sekundární endosymbiózy se zúčastnily zelené i červené řasy. Sekundární řasy s pohlcenou zelenou řasou můžeme najít ve skupinách Dinophyta, Euglenophyta a Chlorarachniophyta (Yoon et al., 2004; Bhattacharya et al., 2004) a jejich plastid je pigmentovaný chlorofylem *a* & *b*. Další skupinu

tvoří Chromalveolata s pohlceným ruduchovým endosymbiontem, které dělíme na Chromista (Heterokonta = Stramenopila, Haptophyta, Cryptophyta) a Alveolata (Ciliophora, Dinophyta a Apicomplexa), jejichž plastid, pokud je fotosyntetický, obsahuje, až na výjimky, chlorofyl *a* & *c*.

Některé druhy obrněnek obsahují plastidy pocházející z procesu terciární endosymbiózy. Tyto čtyřmembránové plastidy vznikly pohlcením jiných členů skupiny Chromalveolata, jako jsou rozsivky, Haptophyta či skrytěnky, tedy organismů již obsahujících sekundární plastid. Terciární plastidy obsahují obrněnky pigmentované fukoxantinem (endosymbiont ze skupiny Haptophyta), obrněnky rodu *Dinophysis* (endosymbiont ze skupiny Cryptophyta) či obrněnky *Kryptoperidinium foliaceum* a *Durinskia baltica* (endosymbiont ze skupiny rozsivky).

1.2. Dinophyta

Dinophyta spolu s Apikomplexa a Ciliophora patří do skupiny Alveolata. Kmen Dinophyta představuje velmi různorodou skupinu převážně mořských bičíkatých organismů. Je tvořen více jak 4000 druhy, které mohou být autotrofní, mixotrofní, osmotrofní, fagotrofní i parazitické (Taylor, 1987). Významné jsou také symbiotické interakce obrněnek. Charakteristický pro obrněnky je jejich obal, nazývaný amphiesma nebo téka. U mnohých druhů je obal elastický, lehce rozrušitelný – takové obrněnky označujeme jako nahé. Jiné bičíkaté buňky mají na povrchu pevné, přesně uspořádané polysacharidové destičky, které tvoří pancíř (Kalina a Váňa, 2005). Obrněnky jsou ekologicky velmi významné. Představují jedny z nejdůležitějších primárních producentů na Zemi a jsou podstatnou složkou fytoplanktonu. Někteří mořští a brachiální dinoflageláti však produkují toxiny, které mohou být nebezpečné pro živočichy (van Dolah, 2000).

1.2.1. Plastidy obrněnek

Podle předpokladů získaly obrněnky chloroplasty v raném období svého vývoje, pak je několikrát ztratily a opět získaly z jiných zdrojů (Schnepf a Elbrächter, 1999). Většina fotosyntetických dinoflagelátů obsahuje plastid obalený třemi membránami, který obsahuje chlorofyl *a*, *c2* a také peridinin jako hlavní fotosyntetický pigment (Dodge, 1975, 1989; Jeffrey, 1989). Tento typ chloroplastu je považován za původní. Genomy peridininových sekundárních plastidů jsou na rozdíl od všech ostatních plastidových genomů organizovány na cca 100-200 kbp velkých kruhových molekulách DNA (Sugiura, 1992; Glöckner et al. 2000), rozděleny na sadu minikroužků o velikosti kolem 2-3 kbp (Howe, 2003). Tyto plastidy jsou tedy značně redukovány a obsahují pouze 12 – 14 genů (Zhang et al., 1999). Většina genetické informace je u těchto obrněnek přenesena do jádra. Několik málo skupin fotosyntetických dinoflagelátů mají plastidy bez peridininu, které jsou složením pigmentů a ultrastrukturou podobné plastidům jiných skupin řas (Tangen a Björnland, 1981; Schnepf a Elbrächter, 1988; Watanabe et al., 1990; Elbrächter a Schnepf, 1996; Hewes et al., 1998). Jeden

z těchto neobvykle pigmentovaných plastidů obrněnek obsahuje chlorofyl *a*, *c1*, *c2*, a také fukoxantin a jeho deriváty, jako hlavní pigmenty, podobně jako plastidy haptophyt (Tangen a Björnland, 1981; Björnland a Liaaen-Jensen, 1989; Jeffrey, 1989; Suzuki and Ishimaru, 1992; Hansen et al., 2000). Zatímco peridininový plastid má pravděpodobně původ v červených řasách a vznikl sekundární endosymbiózou, plastid pigmentovaný fukoxantinem pochází z oddělení Haptophyta a byl získán terciární endosymbiózou (Ischida a Green, 2002). Některé druhy obrněnek obsahují také sekundární zelené plastidy vzniklé pohlcením zelené řasy (*Lepidodinium* spp.), nebo kleptoplastidy (Schnepf a Elbrächter, 1999).

1.3. Apikomplexa

Kmen Apikomplexa tradičně reprezentuje skupinu obligátních parazitů, kteří způsobují mnoho vážných onemocnění zvířat a lidí, včetně malárie, která je nejvíce devastující lidskou nemocí. Zástupci rodu *Plasmodium* každoročně zapříčiní smrt 1,1 - 1,3 milionů lidí. Dále je pak ročně 350 - 500 milionů jedinců nakažených a více jak miliarda lidí je v ohrožení touto nákazou (Tuteja, 2007). Nově se však k tomuto kmeni řadí také mikroskopičtí mořští predátoři rodu *Colpodella*, kteří obsahují apikální komplex, ale pravděpodobně postrádají plastid (Adl et al., 2005).

V tradičním taxonomickém systému jsou Apikomplexa definována na základě přítomnosti apikálního komplexu, souboru organel, rozhodující pro jejich parazitický způsob života, který je umístěn v přední části buňky (Levine et al., 1980). Další specifický znak většiny výtrusovců je apikoplast (McFadden et al., 1996; Köhler et al., 1997), zbytkový nefotosyntetický sekundární plastid, umístěný obvykle mezi jádrem a apikálním komplexem, který je nezbytný pro přežití buňky (Pfefferkorn et al., 1992; Fichera et al., 1995; He et al., 2001), neboť jsou v něm lokalizované některé nezbytné metabolické dráhy, včetně syntézy hemu, mastných kyselin a izoprenoidů (Ralph et al., 2004).

1.3.1. Apikoplast

S příchodem elektronové mikroskopie v druhé polovině 20. století byla v buňkách výtrusovců, kromě jiných významných buněčných komponent, odhalena také multimembránová struktura. Když byla v roce 1974 poprvé izolována extrachromozomální 35 kb dlouhá kruhovitá DNA molekula z ptačího, malárií způsobujícího, parazita *Plasmodium lophurae*, byl její původ považován za mitochondriální (Kilejian, 1974, 1975). Později však byla z různých druhů rodu *Plasmodium* izolována jiná extrachromozomální lineární DNA o délce nepřekračující 6 kb (Suplick et al., 1988, 1990; Aldritt et al., 1989; Joseph et al., 1989; Vaidya et al., 1989; Feagin, 1992), která se poté ukázala být mitochondriální. Prvotně izolovaná 35 kb dlouhá DNA byla lokalizována v již zmíněné multimembránové struktuře a její původ byl určen jako plastidový (McFadden et al., 1996; Köhler et al., 1997).

Apikoplast byl nalezen u všech tří hlavních skupin výtrusovců – haemosporidií (*Plasmodium* a *Leucocytozoon*), kokcií (*Toxoplasma* a *Eimeria*) a piroplasmid (*Babesia* a *Theileria*) (Forth a McFadden, 2003; Oborník et al., 2009), zatímco u rodu *Cryptosporidium* (Zhu et al., 2000; Xu et al., 2004) a gregarín (Toso a Omoto, 2007) došlo pravděpodobně ke ztrátě plastidů. Jako reliktní plastid, obsahuje apikoplast jeden z nejmenších známých plastidových genomů, reprezentující pouze 18-50 % genomu obvyklého fotosyntetického plastidu (Oborník et al., 2009). Redukce plastidu byla v průběhu své evoluční historie způsobená především přenosem genů z pohlčené řasy do jádra hostitele a také ztrátou fotosyntetické funkce. Ultrastrukturní a molekulární data prokázala, že tato organela, vzniklá sekundární endosymbiózou, tedy pohlčením fotosyntetického eukaryota nefotosyntetickým eukaryotem, je obklopena více jak dvěma membránami (Waller et al., 1998). Dnes už víme, že apikoplasty jsou obaleny čtyřmi membránami (Okamoto a McFadden, 2008). Protože apikoplast ztratil geny, kódující fotosyntetické proteiny, které se obvykle používají k určování plastidové fylogeneze, byly fylogeneticky analyzovány zbylé geny. Strukturní analýzy ribozomálního operonu a fylogenetické analýzy rRNA genů prokázaly původ apikoplastu v červených řasách (McFadden and Waller, 1997; Blanchard a Hicks, 1999; Stoebe a Kowallik, 1999; Zhang et al., 2000). Další fylogenetické analýzy GADPH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), jaderně kódovaném proteinu, targetovaném do plastidu, prokázaly monofyletický původ plastidů skupin Apikomplexa, Dinoflagellata, Heterokonta a Cryptophyta (Fast et al., 2001; Harper a Keeling, 2003). Avšak až nedávno objevená fotosyntetická řasa, *Chromera velia*, izolovaná Robertem Moorem z korálu, definitivně potvrdila původ apikoplastu (Moore et al., 2008; Janouškovec et al., 2010).

1.4. *Chromera velia*

Chromera velia je fotosyntetická řasa izolovaná v roce 2001 Robertem Moorem z tvrdého korálu *Plesiastrea versipora* z přístavu v Sydney (Moore et al., 2008). Izolované stádium tvoří volně žijící nepohyblivé hnědo-zelené buňky kulovitého tvaru o průměru 5-7.0 μm . Později však bylo pozorováno také bičíkaté stádium. Kulovité buňky se množí binárním dělením, po kterém může následovat další dělení vedoucí k vytvoření velké cysty obsahující čtyři identické dceřiné buňky. Transformace na vysoce pohyblivé dvoubičíkaté stádium začíná pomalým rotujícím pohybem nepohyblivého kulovitého stádia. Tento proces trvá několik minut. Při nízké hladině osvětlení dochází k transformaci ve velmi malé míře, kdy bičíkovci nikdy nepřevyšují 1 % všech buněk (Oborník et al., 2011).

C. velia obsahuje několik ultrastrukturních znaků charakteristických pro alveoláta, jako jsou kortikální alveoly a mikropóry. V buňce dominuje jeden velký plastid kónického tvaru, obalený čtyřmi membránami. Uvnitř plastidu, který zabírá podstatnou část (60%) buněčného obsahu, jsou tylakoidní lamely uspořádány ve svazcích po třech. Organela je pigmentovaná chlorofylem *a*, violaxanthinem,

novou formou světlosběrného karotenoidu isofukoxantinem a malým množstvím β,β - karotenu. Chlorofyl *c* u této řasy chybí. Na základě výše popsaných vlastností a fylogenetických analýz byl ustanoven nový kmen v rámci alveolát, nazvaný *Chromerida* (Moore et al., 2008).

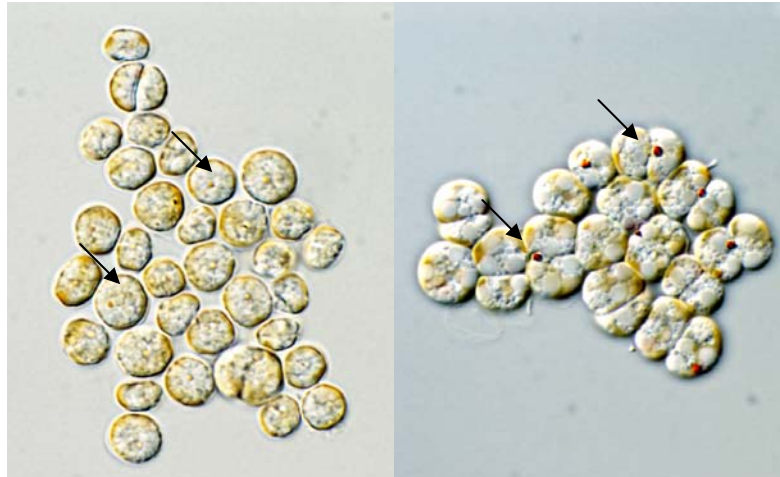
Fylogenetická pozice *C. velia* byla zkoumaná různými přístupy. Fylogeneze založená na rRNA podporuje její blízkou příbuznost s heterotrofními bičíkovci rodu *Colpodella* (jaderný gen pro *ssrRNA*) a výtrusovci (jaderný gen pro *lsrRNA*, který není dostupný pro *colpodelly*) (Moore et al., 2008). Navíc byla u této řasy, na rozdíl od dinoflagelátů, zjištěna přítomnost genů pro histony H2A a H2B (Rizzo, 2003; Wong et al., 2003; Chan et al., 2006). Protože mají všichni členové skupiny chromalveoláta gen pro GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), původně kódovaný v plastidu, nahrazený (pravděpodobně duplikací) jaderně kódovanou verzí (Fast et al., 2001; Harper a Keeling, 2003), byly rovněž u *C. velia* analyzovány oba jaderně kódované geny pro GAPDH. Výsledky těchto analýz prokázaly, alespoň u plastidově targetované verzi GAPDH, blízkou příbuznost s homologickou verzí GAPDH výtrusovců. Fylogenetická pozice *C. velia* na základě cytosolické verze GAPDH zůstala nerozlišená (Oborník et al., 2009). Zatímco jaderné geny *C. velia* pro *ssrRNA*, *lsrRNA* a plastidově targetovaný GAPDH silně podporují její blízký vztah s výtrusovci, fylogeneze založená na genu *psbA*, který není přítomen u výtrusovců, preferuje příbuznost s plastidem pigmentovaným peridininem dinoflagelátů (Moore et al., 2008). Přesvědčivým důkazem, že plastid *C. velia* a apikoplast mají společný původ, je také fakt, že plastid *C. velia* používá nekanonický genetický kód. Zatímco všechny další fotosyntetické plastidy kódují tryptofan tripletem UGG, plastid *C. velia*, stejně jako apikoplast kokcií, kóduje tryptofan kodóny UGG i UGA (Moore et al., 2008; Janouškovec et al., 2010).

1.5. RM 11 (CCMP3155)

CCMP3155 je další fotosyntetická řasa, původně izolovaná z tvrdého korálu *Leptastrea purpurea* z Velkého bariérového útesu, kterou řadíme do alveolát. Tato řasa osciluje mezi kulovitým a bičíkatým stádiem, čímž se blízce podobá řase *C. velia*. Kulovité buňky mají jeden plastid obalený čtyřmi membránami (podobně jako plastid *C. velia* a výtrusovců), ve kterém jsou tylakoidy v tripletu (stejně jako tylakoidy *C. velia* a dinoflagelátů) (Moore et al., 2008; Oborník et al., 2011). RM 11 má nejpomaleji se vyvíjející plastidový genom s vysokým obsahem genů. Fylogenetické analýzy na základě konkatenovaných datasetů z osmi jaderných genů *C. velia* a RM 11 prokázaly, že obě tyto řasy jsou blízce příbuzné výtrusovcům, ale překvapivě tvoří dvě odlišné linie. Tento závěr podpořily také další analýzy, tentokrát plastidových genů. Plastidové genomy *C. velia* a RM 11 obsahují všechny geny nalezené buď u apikoplexů nebo dinoflagelátů a také mnoho jiných genů. Struktura ribozomálního superoperonu v plastidu RM 11 (s několika vnitřními změnami v uspořádání a ztrátami genů) potvrzuje jeho původ v červených řasách (Janouškovec et al., 2010).

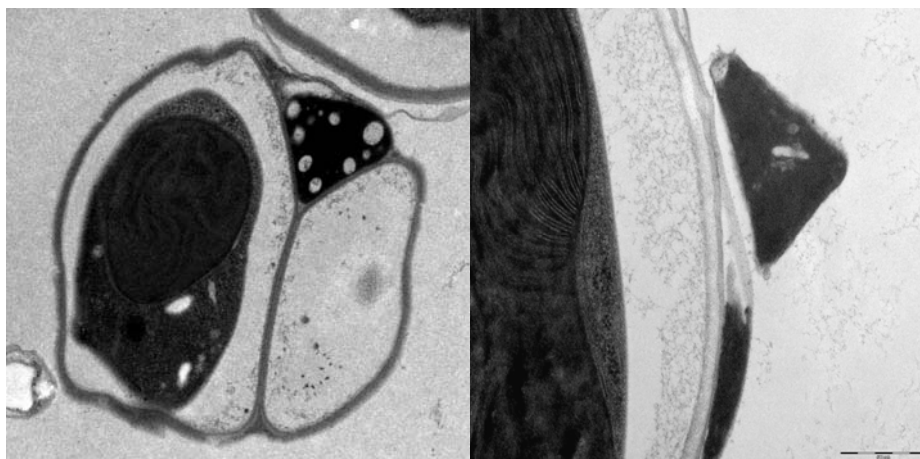
1.6. Izoláty CT 11, CT 24

Izoláty CT 11, CT 24 byly získány během přečišťování kultur RM 11 a RM 24 (CCMP3155) na f/2 agarových miskách s antibiotiky. Tyto izoláty tvořily hnědě zbarvené kolonie, na rozdíl od zelených kolonií RM 11 a RM 24. Pomocí světelného mikroskopu bylo zjištěno, že kolonie CT 11 a CT 24 jsou tvořeny jednobuněčnými organizmy, morfologicky velmi podobnými řase *C. velia*. Izoláty CT 11 a CT 24 mají na rozdíl od *C. velia* hůře viditelná akumulční tělíska (viz. Obr. 1).



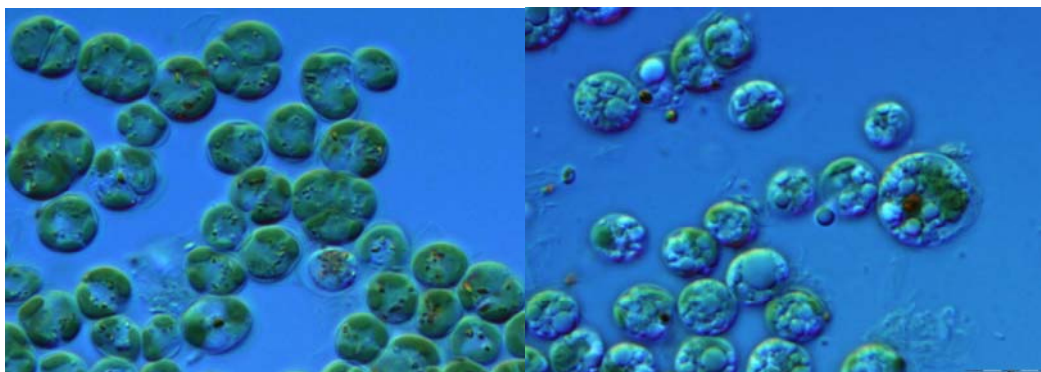
Obr. 1: Srovnání izolátů CT 11, CT 24 (vlevo) a *C. velia* (vpravo). Šípkami jsou označena akumulční tělíska.

Tento fakt je pravděpodobně zapříčiněn tím, že izoláty mají akumulční tělíska obalena dodatečnou membránou (viz. Obr. 2).



Obr. 2: Srovnání izolátů CT 11, CT 24 (vlevo) a *C. velia* (vpravo). Akumulční tělíska – transmisní elektronová mikroskopie.

Další studie odhalily, že stejně staré kultury CT 11 a CT 24 tvoří, v porovnání s kulturami *C. velia*, znatelně méně zásobních vakuol a denzních granulí. Jejich plastid je proto více zřetelný (viz. Obr. 3).



Obr. 3: Porovnání stejně starých kultur izolátů CT 11, CT 24 (vlevo) a *C. velia* (vpravo).

2. Cíle práce

Osvojit si techniky související s izolací DNA, PCR a sekvenací a seznámit se s metodami konstrukce fylogenetických stromů na základě molekulárních dat.

Na základě výše popsaných morfologických znaků molekulárně a fylogeneticky charakterizovat izoláty CT 11 a CT 24 a určit jejich příbuzenský vztah s *C. velia*.

3. Metody

3.1. Kultivace materiálu

Buněčné kultury druhu *Chromera velia*, CT 11 a CT 24, byly pěstovány v f/2 médiu v kultivačních nádobách při 26 °C v kultivačním boxu Lovibond (Liebher) se světelným cyklem 12h/12h (světlo/tma) a intenzitou světla 113 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}$.

3.2. Izolace DNA

Ze stěn kultivační nádoby byly buňky setřeny, vloženy do zkumavky (50 ml) a zcentrifugovány (600 rpm, 6 min.). Supernatant byl odstraněn, buňky byly převedeny do mikrozukavky (1,5 ml) a zcentrifugovány (13.000 rpm, 2 min). Supernatant byl poté znovu odstraněn, k peletu bylo přidáno 50 μl lyzačního pufru a malé množství homogenizačního písku a směs byla následně homogenizována. Pak bylo do mikrozukavky s homogenátem přidáno 250 μl lyzačního pufru a 300 μl proteinázy K (30 mg/ml). Lýze probíhala 4 – 6 hodin při 56 °C. Směs byla dále centrifugována (13.000 rpm, 5 min.) a supernatant převeden do nové mikrozukavky. Poté byla provedena fenol – chloroformová extrakce DNA (Sambrook a Russel, 2001). K supernatantu (cca 600 μl) bylo přidáno stejné množství fenolu, směs byla po dobu 5 minut promíchávána, pak zcentrifugována (14.000 rpm, 5 min., 4 °C) a vzniklá vodní fáze převedena do čisté mikrozukavky. Tento postup byl dvakrát opakován. Poté byla provedena extrakce pomocí fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1 a nakonec samotného chloroformu. Ke vzniklé vodní fázi byl přidán 96 % etanol v poměru 1 : 3 a směs byla uložena na 3 hodiny do -20°C. Nakonec byla tato směs zcentrifugována (14.000 rpm, 10 min., 4 °C), etanol byl odstraněn a pelet vysušen. Vyizolovaná DNA byla resuspendována v 50 μl ddH₂O a uložena v -20°C.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Potřebné geny byly amplifikovány metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Složení reakční směsi bylo kromě různých párů primerů vždy stejné, a sice: 5 μl Ex Taq pufru; 4 μl 2,5 mM DTP mix (TaKaRa); 0,25 Ex TaqTM HS polymerázy (TaKaRa); 2 μl každého z obou primerů, 1 μl DNA (50-100 ng/ μl); ddH₂O do 50 μl . Objem reakční směsi byl podle potřeby proporcionálně obměňován v závislosti na počtu reakcí. Směs byla vložena do termocykleru, PCR program byl upraven v závislosti na teplotě nasedání primerů. PCR se vždy skládala z: 5 minut počáteční denaturace při 94 °C; 30 cyklů po: 1 minuta denaturace při 94 °C, 1 minuta nasedání primerů při T_m = XX °C, doba prodlužování primerů byla stanovena podle velikosti budoucího produktu (1 min/1 kbp) při 72 °C; 10 minut závěrečného prodlužování primerů.

Tab. 1: Sekvence a nasedací teploty primerů použitých při PCR.

Primery použité při polymerázové řetězové reakci pro geny z izolátů CT 11, CT 24			
Gen	Primery	Sekvence primerů (5' - 3')	Tm
18S rRNA	18SchF	CGC TTC TCT GAT ACT GAC TGA CTA CAT G	50 °C
	18SchR	ACG CTC TCT TCA AGA GAA TCG AGC AC	
23S rRNA	pLSU1F	CTGAATCATCTTAGTACTCAAAG	48 °C
	pLR3100	TTTTCYACTTATATGCTTTCAGYA	
Sekvenační primery	M13f	GTAAAACGACGGCCAG	53 °C
	M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	

3.4. Elektroforéza na agarózovém gelu, izolace PCR produktu z gelu

K separaci molekul DNA, získaných metodou PCR, byla použita elektroforéza na 1 % (w/v) agarózovém gelu (Serwa, 100 mg/100 ml 1xTAE), ke kterému bylo přidáno 0,1 µl Gel Red (Biotio) /10 ml gelu. Pro zjištění velikosti fragmentů DNA byl použit molekulární marker: 1kb plus DNA ladder (New England Biolabs, Inc.). Produkty byly zviditelněny na UV-transluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Fotodokumentace gelů byla pořízena digitálním fotoaparátem (Kodak) a softwarem Kodak Digital Science 1D verze 3.0.2.

Proužky gelu obsahující DNA určité velikosti byly vyříznuty, vloženy do 1,5 ml mikrozkušavky a rozpuštěny. Nukleová kyselina byla z gelu izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kit podle návodu výrobce (QIAGEN).

3.5. Klonování, transformace, izolace plasmidů

Ligační reakce byla provedena pomocí plasmidu pGEM® T-Easy vector, do kterého byly PCR produkty zaklonovány podle návodu výrobce (Promega).

K ligační směsi bylo přidáno 50µl kompetentních buněk *E. coli* XL1 a poté 30 minut ponecháno na ledu. Destabilizace cytoplazmatických membrán byla provedena tepelným šokem (45 sekund, 42 °C) a následným zchlazením na ledu po dobu 2 minut. K transformovaným buňkám bylo pak přidáno 250 µl SOC a směs byla třepána 1 hodinu při 200 rpm v 37 °C. Na Petriho misky s agarem (LB agar, Roth) a ampicilinem bylo rozetřeno 40 µl X-galu, 4 µl IPTG, a poté 150 µl bakterií. Misky byly uloženy v termoboxu při 37 °C po dobu 16 hodin. Po kultivaci byly vybrány bílé kolonie a provedena srovnávací PCR. Bakteriální kolonie, obsahující plasmid s PCR inzertem, byly přeneseny do zkumavky s 3 ml LB média (Roth), ke kterému bylo přidáno 12 µl ampicilinu. Následná inkubace probíhala 12-14 hodin v 37 °C při 200 rpm.

Izolace plasmidů byla provedena pomocí QIAprep®Spin Miniprep Kit podle návodu výrobce (Promega).

3.6. Sekvenování

Plasmidová DNA o koncentraci 250-300 ng/μl byla sekvenována za použitím primerů M13f a M13r v laboratoři genomiky. Sekvenační reakce byla analyzována přístrojem ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.7. Úpravy a identifikace sekvencí

Získané sekvence byly analyzovány v programu Sequence Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Sekvence vektoru byly odstraněny pomocí programu VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Sekvence inzertu byly upraveny programem DNASTAR - SeqMan II (DNASTAR, Inc.) a identifikovány pomocí NCBI BlastSearch (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8. Příprava datasetů a alignment sekvencí

Sekvence genů pro přípravu datasetů byly získány z NCBI GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Poté byly tyto sekvence spolu s mými nově získanými sekvencemi alignovány v programu Muscle (Edgar, 2004) a výsledné alignmenty editovány programem SeaView (Gouy et al., 2010).

3.9. Fylogenetické analýzy

Fylogenetické analýzy byly provedeny metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood, dále jen ML) pomocí programu RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006). Pro výpočty byla použita GTR substituční matice s gama korekcí (4 kategorie). Nejvěrohodnější topologie byla vybrána ze stovky nezávislých opakování, z nichž každé začínalo znáhodněnou počáteční topologií. Robustnost větvení byla určena jednak pomocí neparametrické bootstrap analýzy za využití ML (RAxML, 500 opakování) a maximum parsimony [DNAPARS (Felsenstein, 1989), 500 opakování]. Bayesiánská posterior probability, jako další forma odhadu robustnosti, byla vypočtena pomocí PhyloBayes 3.2 (Lartillot et al., 2009). Pro analýzu byla použita kombinace CAT admixture modelu (respektive jeho empirická varianta C20, kde je počet kategorií omezen na 20) s GTR substituční maticí. Výsledná posterior probability byla vypočtena ze dvou nezávislých markovových řetězců (Monte Carlo Markov Chain, MCMC), které běžely souběžně, dokud jejich maximální rozdíl neklesl pod 0.2 a efektivní vzorek odhadovaných parametrů nepřesáhl 200.

4. Výsledky

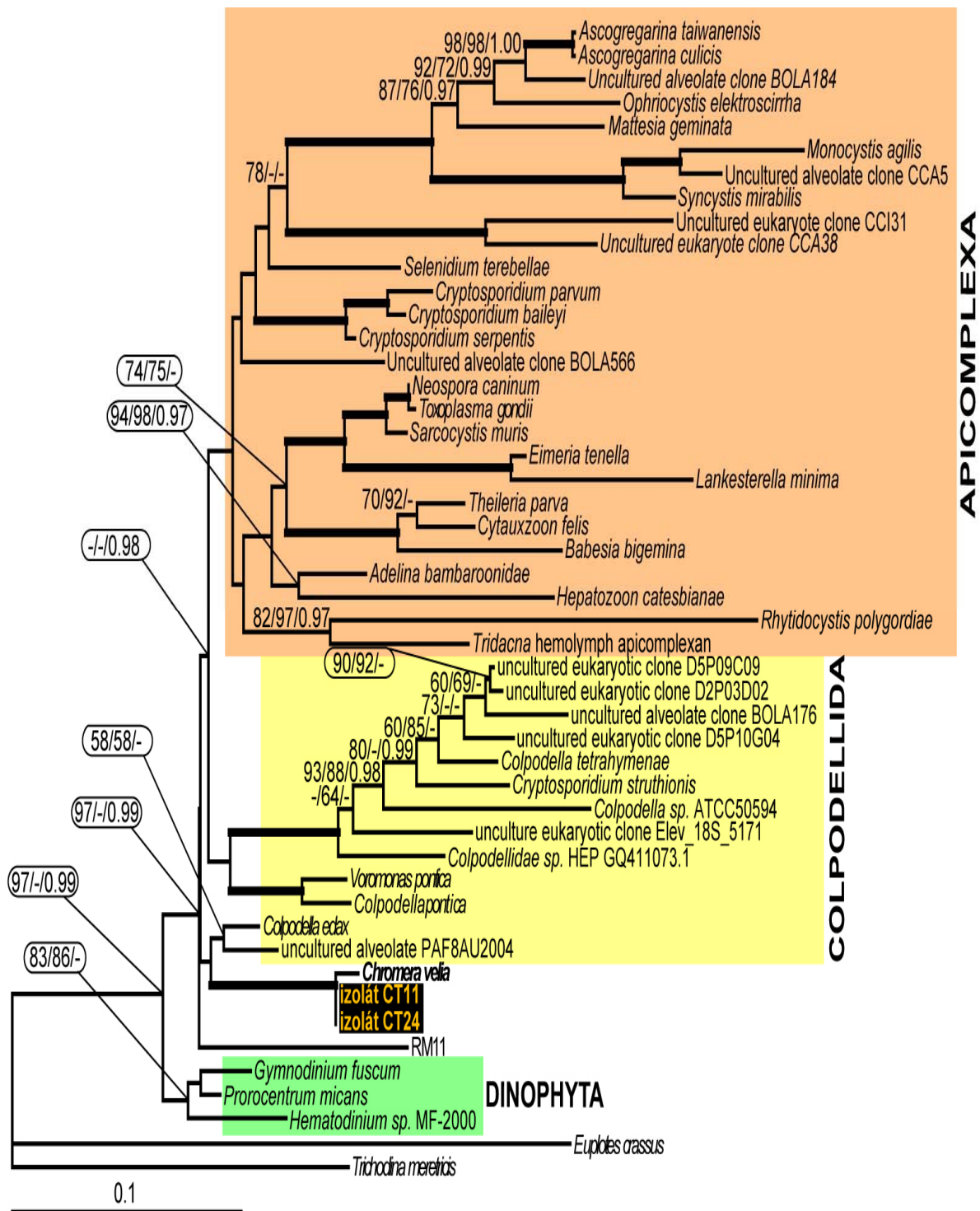
Pomocí PCR jsem amplifikovala geny pro 18S rRNA a 23S rRNA ze dvou nových izolátů CT 11 a CT 24. Získané sekvence těchto genů jsem použila pro fylogenetické analýzy s cílem určit fylogenetickou pozici CT 11 a CT 24.

4.1. Analýza genu pro 18S rRNA

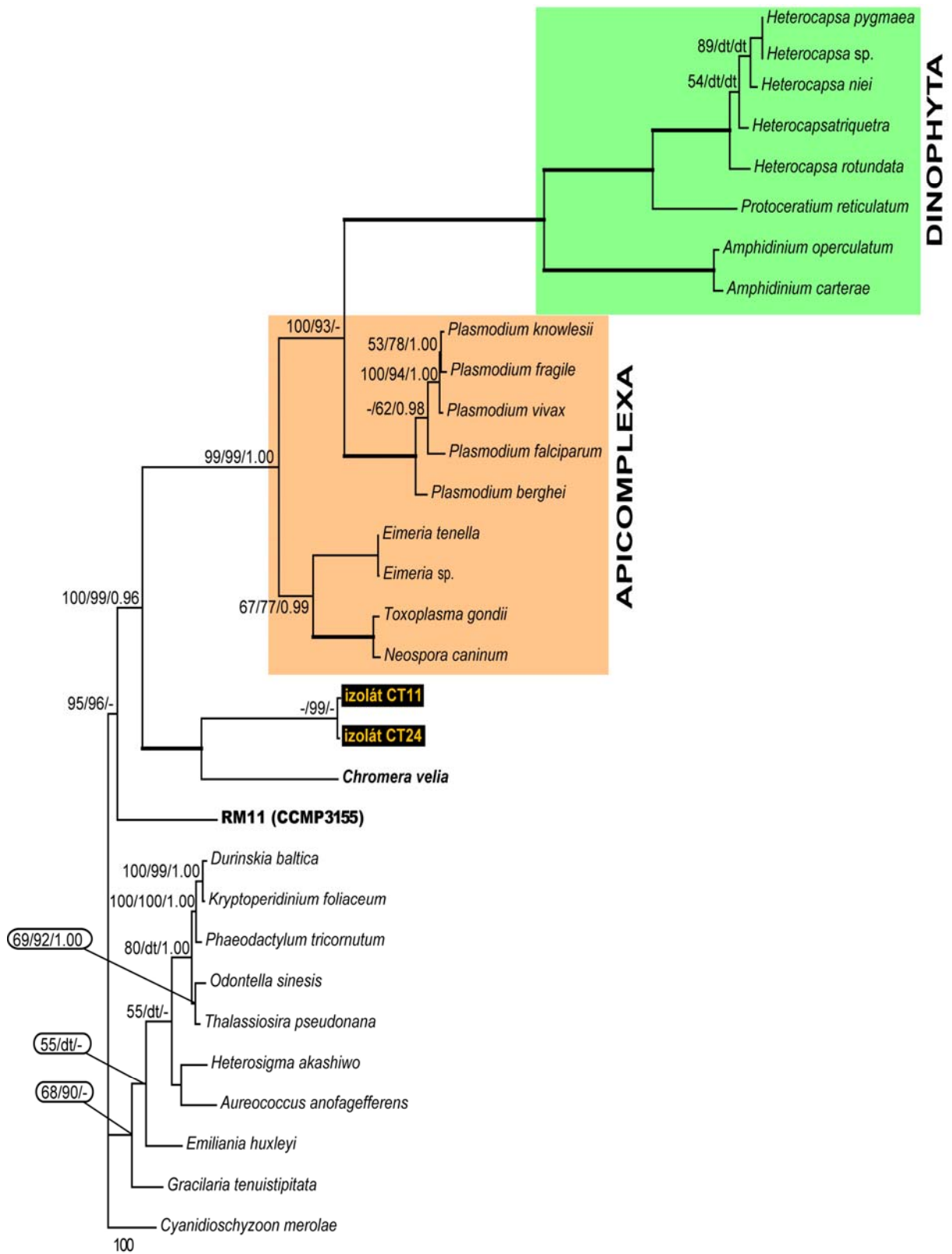
Zjistila jsem, že geny pro 18S rRNA amplifikované z izolátů CT 11 a CT 24 se navzájem sekvenčně neliší. Jelikož mým primárním cílem bylo srovnání těchto izolátů s *C. velia*, porovnála jsem získané sekvence se sekvencí 18S rRNA *C. velia*. Z tohoto srovnání vyplynulo, že oba izoláty a *C. velia* se v tomto genu výrazně sekvenčně neliší. Variabilita byla pouze ve třech nukleotidech. Z dostupných sekvencí genu pro 18S rRNA *C. velia* v databázi GenBank jsem ale zjistila, že to odpovídá vnitrodruhové variabilitě *C. velia*. Přesto jsem sestavila dataset skládající se ze sekvencí 18S rRNA různých zástupců skupiny Alveolata a provedla fylogenetickou analýzu metodami maximum likelihood (ML-RaXML), maximum parsimony (MP-DNAPARS) a bayesiánské fylogenetiky pomocí programu PhyloBayes 3.2 (viz. Obr. 4). Ze získaného fylogenetického stromu vyplývá, že i přes malou sekvenční variabilitu tvoří CT 11, CT 24 sesterskou skupinu ke klasické *C. velia* izolované ze Sydneyského přístavu. Tato topologie je navíc velmi robustní (oba bootstrapy 100 %, posterior probability 1,0).

4.2. Analýza genu pro plastidovou 23S rRNA

Stejně jako v případě genu pro 18S rRNA, se izoláty CT 11 a CT 24 navzájem sekvenčně neliší ani v genu pro 23S rRNA. Podobný výsledek ukázalo i srovnání izolátů s *C. velia*. Celá sekvenční variabilita mezi CT 11, CT 24 a *C. velia* v rámci tohoto genu spočívala v substituci dvou nukleotidů a ve třech delecích (pravděpodobně) v sekvencích izolátů CT 11 a CT 24. Znovu jsem sestavila dataset skládající se ze sekvencí 23S rRNA různých zástupců skupiny Alveolata a Stramenopila a provedla fylogenetickou analýzu metodami maximum likelihood (ML-RaXML), maximum parsimony (MP-DNAPARS) a bayesiánské fylogenetiky pomocí programu PhyloBayes 3.2 (viz. Obr. 5). Výsledná, opět velmi robustní topologie (oba bootstrapy 100 %, posterior probability 1,0) znovu řadí izoláty CT 11 a CT 24 jako sesterskou skupinu k řase *C. velia* izolované ze Sydneyského přístavu.



Obr. 4: ML fylogenetický strom vytvořený programem RAxML 7.2.8. (model GTR, substituční matice s gama korekcí ve 4 kategoriích) na základě sekvencí genu pro 18S rRNA (1218 znaků). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: ML, MP bootstrapová podpora/posterior probability). Zvýrazněné větve značí 100% bootstrapsy a posterior probability 1,0.



Obr. 5: MP fylogenetický strom vytvorený programem DNAPARS (model GTR, substituční matice s gama korekcí ve 4 kategoriích) na základě sekvencí genu pro 23S rRNA (1977 znaků). Statistická podpora je vyjádřena v pořadí: MP, ML bootstrapová podpora/posterior probability). Zvýrazněné větve značí 100% bootstrapy a posterior probability 1,0.

5. Diskuze

V této práci jsem se snažila porovnat nově získané izoláty CT 11 a CT 24 s řasou *Chromera velia*. Bylo zjištěno, že izoláty sdílí s *C. velia* společné morfologické znaky, nicméně v některých znacích, popsaných v úvodu mé práce, se naopak odlišují. Z tohoto důvodu jsem se pokusila odhalit příbuzenský vztah nových izolátů s řasou *C. velia* na základě molekulárních a fylogenetických analýz genů pro 18S rRNA a 23S rRNA. Přestože topologie získané fylogenetickými analýzami naznačují, že nové izoláty jsou sesterskou skupinou klasické *C. velia*, byla pozorovaná variabilita v sekvenovaných genech poměrně nízká.

Fotosyntetická řasa *Chromera velia* byla původně izolovaná z tvrdého korálu *Plesiastrea versipora* v přístavu v Sydney (Moore et al., 2008). Teplota vody v této oblasti se pohybuje okolo 20 °C. Izoláty CT 11 a CT 24 byly získány z kultur RM 11 a RM 24 (CCMP3155), které byly izolovány z tvrdého korálu *Leptastrea purpurea* z Velkého bariérového útesu. V této oblasti dosahuje teplota vody až 26 °C. Dá se tedy předpokládat, že se nové izoláty vyvíjely v jiném potenciálním hostiteli a prostředí výrazně odlišném od toho, kde se vyvíjela původně izolovaná *C. velia*. Proto je potřeba zvážit, zda morfologické znaky, ve kterých se izoláty CT 11, CT 24 liší od *C. velia*, mohou být přímým důsledkem odlišných podmínek, a zda jsou, spolu s rozdíly v sekvenovaných genech, dostatečným důvodem k jejich klasifikaci v rámci nového druhu či nikoliv.

Geny pro ribozomální RNA, zejména pak malá jaderná podjednotka (SSU/18S rRNA), jsou označovány za zlatý standard molekulární fylogenetiky již od jejich počátků (Field et al., 1988; Woese et al., 1990; Chenuil, 2006). Byly použity v nesčetných pracích jako základ pro popis nových druhů, či naopak sloučení několika druhů, popsaných na základě morfologické variability, do druhu jednoho (Blasco-Costa et al., 2010; Heger et al., 2010; Pouličková, 2010; Borovička et al., 2011; Gomez et al., 2011). Mnou získané výsledky variability v sekvencích genů pro ribozomální RNA (jak pro jadernou, tak plastidovou) mě, dle mého názoru, neopravňují prohlásit nové izoláty za validní druh, odlišný od *C. velia*. V poslední době se totiž objevují data ukazující odlišnou variabilitu rRNA na druhové úrovni u různých linií eukaryot a polemizují s rozlišením, které jsou ribozomální RNA geny schopny poskytnout, zejména jedná-li se o blízce příbuzné druhy (např. Weisse, 2008). Studie dvou morfotypů dinoflagelátů *Scrippsiella hangoei* a *Peridinium aciculiferum*, s odlišnou morfologií i biologií, ukázala, že se geny pro rRNA sekvenčně neliší (Logares et al., 2007). Výsledky publikované v této práci, stejně jako v dalších publikacích (Casamatta et al., 2003; Bensch et al., 2004) naznačují, že různé selekční tlaky, způsobené rozdílným prostředím, na vyvíjející-se populace mikroorganismů, mohou hrát významnou roli a že identické sekvence genů pro rRNA, v případě jednobuněčných organismů, nemusí zákonitě znamenat, že jde o jeden druh. Na druhou stranu ani morfologické rozdíly, které jsem u těchto řas našla, nejsou natolik zásadní, aby mohly vést k popsání nového druhu. Navíc se dle informací dostupných k izolovaným řasám zdá (Oborník, osobní sdělení), že *C. velia* byla izolována

také z korálu *Leptastrea purpurea* a že tento korál funguje jako společný hostitel *C. velia* a CCMP3155 (RM 11). Existence dvou různých hostitelů *C. velia* a RM 11 tedy nemusí být vůbec zásadní.

Abychom mohli s jistotou říci, zda jsou izoláty CT 11 a CT 24 samostatným druhem, bude nutné osekvenovat další, pokud možno variabilnější gen. Jako ideální se jeví mezigenové mezerníky ITS. Bylo by také vhodné, pokusit se izolovat jednotlivé genetické linie ze sbírkového kmene *C. velia* a podívat se, zda se tyto izoláty liší morfologicky a zda jsou tyto morfologické odlišnosti stabilní. S informacemi, které mám k dispozici, nemohu, dle mého názoru, otázku druhové příslušnosti izolátů CT 11 a CT 24 definitivně rozhodnout.

6. Závěr

V této práci jsem se zabývala dvěma novými liniemi jednobuněčných fotosyntetických organismů (CT 11 a CT 24) izolovaných z kultur alveoláta CCMP3155. Mým cílem bylo odhalit vztah těchto izolátů s řasou *Chromera velia* na základě molekulárních a fylogenetických analýz genů pro jadernou 18S rRNA a plastidovou 23S rRNA.

Fylogenetické analýzy ukázaly příslušnost izolátů CT 11 a CT 24 do rodu *Chromera*. Srovnáním variability v sekvencích studovaných genů těchto izolátů a *C. velia* jsem dospěla k závěru, že se s největší pravděpodobností jedná o linie *C. velia*.

7. Citace

Adl S. M., Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J R., Bowser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., James T. Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., Mc Court R. M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S. E., Nerad T. A., Shearer C. A., Smirnov A. V., Spiegel F. W., Taylor M. F. J. R. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Euk. Microbiol.* **52**, 399-451

Aldritt S. M., Joseph J. T., Wirth D. F. (1989) Sequence identification of cytochrome *b* in *Plasmodium gallinaceum*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3614-3620

Archibald J. M., Keeling P. J. (2002) Recycled plastids: a ' green movement ' in eukaryotic evolution. *Trends Genet.* **18**, 577-584

Bensch S., Perez-Tris J., Waldenstrom J., Hellgren O. (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences inavian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* **58**, 1617–1621

Bhattacharya D.,Yoon H. S., Hackett J. D. (2004) Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *BioEssays* **26**, 50-60

Bhattacharya D., Archibald J. M., Weber A. P. M., Reyes-Prieto A. (2007) How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays* **29**, 1239-1246

Björnland T., Liaaen-Jensen S. (1989) Distribution Patterns of Carotenoids in Relation to Chromophyte Phylogeny and Systematics. In: Green J.C., Leadbeater B. S. C., Diver W. I. (eds) The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives, The Systematics Association Special Volume No. 38. Clarendon Press, Oxford, pp 37-60

Blanchard J. L., Hicks J. S. (1999) The non-photosynthetic plastid in malarial parasite and other apicomplexans is derived from outside the green plastid lineage. *J. Euk. Microbiol.* **46**, 367-375

Blasco-Costa I., Balbuena J. A., Raga J. A., Kostadinová A., Olson P. D. (2010) Molecules and morphology reveal cryptic variation among digeneans infecting sympatric mullets in the Mediterranean. *Parasitology* **137(2)**, 287-302

- Borovička J., Noordeloos M. E., Gryndler M., Oborník M.** (2011) Molecular phylogeny of *Psilocybe cyanescens* complex in Europe, with reference to the position of the secotioid *Weraroa novae-zelandiae*. *Mycol Progress* **10**, 149-150
- Casamatta D. A., Vis M. L., Sheath R. G.** (2003) Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquat. Bot.* **77**, 295–309
- Chan Y. H., Kwok A. C. M., Tsang J. S. H., Wong J. T. Y.** (2006) Alveolata histone-like proteins have different evolutionary origins. *J. Evol. Biol.* **19**, 1717-1721
- Chenuil A.** (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*
- Dodge J.** (1975) A survey of chloroplast ultrastructure in the Dinophyceae. *Phycologia* **4**, 253-263
- Dodge J.** (1989) Phylogenetic Relationships of Dinoflagellates and their Plastids. In: Green J.C., Leadbeater B. S. C., Diver W. I. (eds) *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives*, The Systematics Association Special Volume No. 38. Clarendon Press, Oxford, pp 207-227
- Douglas S. E.** (1998) Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 655-661
- Edgar R.C.** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic. Acids. Res.* **32(5)**, 1792-1797.
- Elbrächter M., Schnepf E.** (1996) *Gymnodinium chlorophorum*, a new green, bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae, Gymnodiniales) with a vestigial prasinophyte endosymbiont. *Phycologia* **35**, 381- 393
- Fast N. M., Kissinger J. C., Roos D. S., Keeling P. J.** (2001) Nuclear-encoded, plastid targeted genes suggests a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 418- 426
- Feagin J. E.** (1992) The 6-Kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**, 145-148
- Felsenstein, J.** (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fichera M. E., Bhopale M. K., Roos D. S.** (1995) In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action agents *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1530-1537

- Field K. G., Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Ghiselin M. T., Raff E. C., Pace N. R. & Raff R. A.** (1988). Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* **239**(4841), 748-753
- Glöckner G., Rosenthal A. & Valentin K.** (2000) The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.* **51**, 382-390
- Gomez F., Lopez-Garcia P., Moreira D.** (2011) Molecular phylogeny of Dinophysoid Dinoflagellates: the systematic position of *Oxyphysis oxytoxoides* and the *Dinophysis hastata* group (Dinophysales, Dinophyceae). *J. Phycol.* **47**(2), 393-406
- Gouy M., Guindon S. & Gascuel O.** (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**(2), 221-224.
- Gray M. W.** (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 678-687
- Hansen G., Daugbjerg N., Henriksen P.** (2000) Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *J. Phycol.* **36**, 394-410
- Harper J. T., Keeling P. J.** (2003) Nucleus-encoded, plastid targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1730-1735
- He C. Y., Shaw M. K., Pletcher C. H., Striepen B., Tilney L. G., Roos D. S.** (2001) A plastid segregation defekt in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* **20**, 330-339
- Hedges S. B., Blair J. E., Venturi M. L., Shoe J. L.** (2004) A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* **4**, 2
- Heger T. J., Mitchell E. A. D., Todorov M., Golemansky V., Lara E., Leander B. S., Pawlowski J.** (2010) Molecular phylogeny of euglyphid testate amoebae (Cercozoa: Euglyphida) suggests transitions between marine supralittoral and freshwater/terrestrial environments are infrequent. *Mol. Phyl. Evol.* **55**(1), 113-122
- Hewes C. D., Mitchell B. G., Moisan T. A., Vernet M., Reid F. M. H.** (1998) The phycobilin signatures of chloroplasts from three dinoflagellate species: A microanalytical study of *Dinophysis caudata*, *D. fortii*, and *D. acuminata* (Dinophysiales, Dinophyceae) *J. Phycol.* **34**, 945-951
- Howe C. J., Barbrook A. C., Koumandou V. L., Ellen R., Nisbet R. E. R., Symington H. A., Wightman T. F.** (2003) Evolution of the chloroplast genome. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**, 99-107

Ishida K., Green B. R. (2002) Second-hand and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (14), 9294-9299

Janouškovec J., Horák A., Oborník M., Lukeš J., Keeling P. J. (2010) A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate and heterodont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **107**, 10949-10954

Jeffrey S. W. (1989) Chlorophyll c Pigments and their Distribution in the Chromophyte Algae. In: Green J.C., Leadbeater B. S. C., Diver W. I. (eds) *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives*, The Systematics Association Special Volume No. 38. Clarendon Press, Oxford, pp 13-36

Joseph J. T., Aldritt S. M., Unnasch T., Puijalón O., Wirth D. F. (1989) Characterization of a conserved extrachromosomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3621- 3629

Kalina T., Váňa J. (2005) *Sinice, řasy houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii.* nakl. Karolinum

Keeling P. J. (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am. J. Bot.* **91**, 1481-1493

Kilejian A. (1974) Mitochondrial DNA from *Plasmodium lophurae*. *J. Protozool.* **21**, 434

Kilejian A. (1975) Circular mitochondrial DNA from avian malarial parasite *Plasmodium lophurae*. *Biochim. Biophys. Acta* **390**, 276-284

Köhler S., Delwiche C. F., Denny P. W., Tilney L. G., Webster P., Wilson R. J. M., Palmer J. D., Roos D. S. (1997) A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* **275**, 1485-1489

Lartillot N., Lepage T., Blanquart S. (2009) PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* **25**, 2286-2288

Levine N. D., Corliss J. O., Cox F. E. G., Deroux G., Grain J., Honigberg B. M., Leedale G. F., Loeblich A. R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E. G., Page F. C., Poljansky G., Sprague V., Vávra J., Wallace F. G. (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**, 37-58

Logares R., Rengefors K., Kremp A., Shalchian-Tabrizi K., Boltovskoy A., Tengs T., Shurtleff A. and Klaveness D. (2007) Phenotypically Different Microalgal Morphospecies with Identical Ribosomal DNA: A Case of Rapid Adaptive Evolution? *Microbial Ecol.* **53**, 549–561

Martin B., Nowack E. C. M. & Melkoniam M. (2005) A plastid in the making: Evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* **156**, 425-432

- Martin W., Herrmann R. G.** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, What happens, and why? *Plant Physiol* **118**, 9-17
- McFadden G. I., Reith M. E., Munholland J., Lang-Unnasch N.** (1996) Plastid in human parasites. *Nature* **381**, 482
- McFadden G. I., Waller R. F.** (1997) Plastids in parasites of humans. *Bioessays* **19**, 1033-1040
- McFadden G. I.** (1999) Plastids and protein targeting. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 339-346
- Moore R. B., Oborník M., Janouškovec J., Chrudimský T., Vancová M., Green D. H., Wright S. W., Davies N. W., Bolch C. J. S., Heimann K., Šlapeta J., Hoegh-Guldberg O., Logsdon J. M., Carter D. A.** (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* **451**, 959-963
- Oborník M., Janouškovec J., Chrudimský T., Lukeš J.** (2009) Evolution of the apicoplast and its host: From heterotrophy to autotrophy and back again. *International Journal for Parasitology* **39**, 1-12
- Oborník M., Vancová M., Lai D. H., Janouškovec J., Keeling P. J., Lukeš J.** (2011) Morphology and ultrastructure of multiple life cycle stages of the photosynthetic relative of apicomplexa, *Chromera velia*. *Protist* **162**, 115-130
- Okamoto N., McFadden G. I.** (2008) The mother of all parasites. *Future Microbiol.* **3** (4), 391-395
- Palmer J. D.** (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *J. Phycol.* **39**, 4-11
- Pfefferkorn E. R., Nothagel R. F., Borotz S. E.** (1992) Parasitocidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug resistant mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1091- 1096
- Pouličková A.** (2010) Pseudocryptic Diversity versus Cosmopolitanism in Diatoms: a Case Study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and Morphologically Similar Taxa. *Protist* **161**(3), 353-369
- Ralph S. A., van Dooren G. G., Waller R. F., Crawford M. J., Fraunholz M. J., Foth B. J., Tonkin C. J., Roos D. S., McFadden G. I.** (2004) Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 203-216
- Rizzo P. J.** (2003) Those amazing dinoflagellate chromosomes. *Cell Res.* **13**, 215-217
- Rodriguez-Ezpeleta N., Brinkmann H., Burey S. C., Roure B., Burger G., Löffelhardt W., Bohnert H. J., Philippe H., Lang B. F.** (2005) Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae and glaucophytes. *Curr. Biol.* **15**, 1325-1330

- Sambrook J., Russel D. W.** (2001) Molecular cloning, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schnepf E., Elbrächter M.** (1988) Cryptophycean-like double-membrane bounded chloroplast in the dinoflagellate, *Dinophysis* Ehrenb. Evolutionary, phylogenetic and toxicological implications. *Bot. Acta* **101**, 196-203
- Schnepf E., Elbrächter M.** (1999) Dinophyte chloroplasts and phylogeny – a review. *Grana* **38**, 81-97
- Stamatakis A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690
- Stoebe B., Kowallik K. V.** (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet.* **15**, 344-347
- Sugiura M.** (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* **19**, 149-168
- Suplick K., Akella R., Saul A., Vaidya A. B.** (1988) Molecular cloning and partial sequence of a 5.8 kilobase pair repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**, 289-290
- Suplick K., Morrisey J., Vaidya A. B.** (1990) Complex transcription from the extrachromosomal DNA encoding mitochondrial functions of *Plasmodium yoelii*. *Mol. Cell Biol.* **10**, 6381-6388
- Suzuki R., Ishimaru T.** (1992) Characteristics of photosynthetic pigment composition of *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami ex Oda. *J. Oceanogr.* **48**, 367-375
- Tangen K., Björnland T.** (1981) Observations on pigment and morphology of *Gyrodinium aureolum* Hulbert, a marine dinoflagellate containing 19'-hexanoyloxyfucoxanthin as the main carotenoid. *J. Plankton Res.* **3**, 389-401
- Taylor F. J. R.** (1987) The biology of dinoflagellates. *Blackwell Scientific Publications*
- Toso M. A. & Omoto C. K.** (2007) *Gregarina niphandrodes* may lack both a plastid genome and organelle. *J. Eukaryot. Microbiol.* **54**, 66-72
- Tuteja R.** (2007) Malaria – an overview. *FEBS J.* **274**, 4670-4679
- van Dolah F. M.** (2000) Marine algal toxins, health effects and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.* **108** (Supplement 1), 133-141
- Vaidya A. B., Akella R., Suplick K.** (1989) Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**, 97-107

- Vesteg M., Vacula J., Krajčovič J.** (2009) On the origin of chloroplasts, import mechanisms of chloroplast-targeted proteins, and loss of photosynthetic ability. *Folia Microbiol.* **54**, 303-321
- Waller R. F., Keeling P. J., Donald R. G. K., Strepen B., Handman E. A., Lang-Unnasch N., Cowman A. F., Besra G. S., Roos D. S., McFadden G. I.** (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* **95**, 12352-12357
- Watanabe M. M., Suda S., Inouye I., Sawaguchi T., Chichara M.** (1990) *Lepidodinium viride* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyta), a green dinoflagellate with a chlorophyll *a*- and *b*-containing endosymbiont. *J. Phycol.* **26**, 741-751
- Woese C., Kandler O., Wheelis M.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** (12), 4576–9
- Wong J. T. Y., New D. C., Wong J. C. W., Hung V. K. L.** (2003) Histone-like proteins of the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* have homologies to bacterial DNA-binding proteins. *Euk. Cell.* **2**, 646-650
- Xu P., Widmer G., Wang Y., Ozaki L. S., Alves J. M., Serrano M. G., Puiu D., Manque P., Akiyoshi D., Mackey A. J., Pearson W. R., Dear P. H., Bankier A. T., Peterson D. L., Abrahamsen M. S., Kapur V., Tzipori S., Buck G. A.** (2004) The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* **431**, 1107-1112
- Yoon H. S., Hackett J. D., Ciniglia C., Pinto. G., Bhattacharya D.** (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 809-818
- Zhang Z., Green B. R., Cavalier-Smith T.** (1999) Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. *Nature* **400**, 155-159
- Zhang Z. D., Cavalier-Smith T., Green B. R.** (2000) Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. *J. Mol. Evol.* **51**, 26-40
- Zhu G., Marchewka M. J., Keithly J. S.** (2000) *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology* **146**, 315-321

8. Přílohy

f/2 médium: 35 g Marine Tropic Salt +20 ml Marine Watter Solution / 1 l ddH₂O; pH = 8,0

TAE (50x): 242 g Tris + 100 ml 0,5M EDTA (pH = 8,0) + 57,1 ml kyseliny octové; doplnit do 1 l ddH₂O

SOC médium: 0,5 % bacto-yeast extract; 2 % bacto-trytone; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂;
10 mM MgSO₄; 20 mM glukóza; pH = 7,0