

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv prostředí na strukturu polárních
planktonních společenstev**

Diplomová práce

Bc. Nikola Jachníková

Školitel: Mgr. Aleš Horák, Ph.D.

Konzultantka: MSc Olga Flegontova, Ph.D.

České Budějovice 2020

Jachníková, N., 2020: Vliv prostředí na strukturu polárních planktonních společenstev. [The impact of the environment on the structure of polar planktonic communities. Mgr. Thesis, in Czech.] - 40 p., Faculty of Science. University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Using DNA metabarcoding and bioinformatic analysis this study shows, how planktonic communities react on environmental variables (temperature, oxygen concentration, depth, fluorescence, salinity, latitude and longitude). This study also compares arctic and antarctic diptonemid communities.

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

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 odevzdání 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 odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 9.12. 2020.

Bc. Nikola Jachníková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Alešovi Horákovi za cenné rady, připomínky, trpělivost a celkové vedení mé práce. Dík také patří Olze Flegontové za pomoc a vedení při práci v laboratoři, zpracování výsledků a jejich konzultaci. Dále bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za veškerou podporu, kterou mi po celou dobu mého studia poskytovali.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Ekosystém oceánu	1
1.2 Efekty prostředí podmiňující výskyt a biologii planktonu	1
1.3 DNA Metabarkódování	3
1.3.1 Poznatky o planktonu na základě DNA metabarkódování	4
1.4 Nejhojnější planktonní organismy v oceánu	6
1.4.1 <i>Metazoa</i>	6
1.4.2 <i>Dinozoa</i>	6
1.4.3 <i>Rhizaria</i>	6
1.4.4 <i>Diatoma</i>	7
1.4.5 <i>Stramenopila</i>	7
1.4.6 <i>Diplonemida</i>	7
2. Cíle práce	10
3. Metodika	11
3.1 Vzorky a izolace	11
3.2 Polymerázová řetězová reakce	11
3.3 Gelová elektroforéza a izolace PCR produktů	11
3.4 Sekvence a úprava sekvencí	12
3.5 Bioinformatická analýza	13
4. Výsledky	15
4.1 Diplonemy	15
4.1.1 Vliv prostředí na distribuci diplomem	15
4.1.2 Hlubkový profil	17
4.1.3 Porovnání arktických a antarktických diplomem	18
4.2 Eukaryota	20
4.2.1 Vliv prostředí na Eukaryota	22
5. Diskuze	27
6. Závěr	32
7. Seznam použité literatury	33

1. Úvod

1.1 Ekosystém oceánu

Moře a oceány pokrývají víc než 70% povrchu Země (Mora et al., 2011), jsou největším zemským biotem, který má velký vliv na globální ekosystém (Sigman a Hain, 2012). Oceán je součástí uhlíkového cyklu. Biologicky zprostředkované části uhlíkového cyklu zahrnují produkci i obrat organických látek. Fotosyntézou a biosyntézou organických látek vzniká primární produkce, která je klíčovým regulátorem ekologických procesů. Primární produkci oceánu dominuje fytoplankton (Field et al., 1998). Svrchní vrstva oceánu funguje jako biogeochemická membrána mezi prostředím oceánu a atmosférou. V této vrstvě se vyskytují planktonní organismy fixující oxid uhličitý do biologické hmoty, která následně vstupuje do potravních sítí (de Vargas et al., 2015). Hluboký oceán představuje největší zásobárnu rozpuštěného organického uhlíku (Edgcomb, 2016).

Oceán je také považován za důležitou součást klimatického systému. Mezi oceánem a atmosférou dochází k výměně velkého množství, tepla a vody. Je také důležitou součástí redistribuce tepla z tropů do polárních oblastí. Dochází zde k výměně, absorpci a emisi řady radiačně důležitých plynů. Je to hlavní přírodní zdroj atmosférických aerosolů (Bigg et al., 2003).

1.2 Efekty prostředí podmiňující výskyt a biologii planktonu

Mikroskopické planktonní organismy tvoří většinu oceánské biomasy a druhové bohatosti (de Vargas et al., 2015).

Efekt prostředí je pravděpodobně nejlépe prostudovaný pro koncentraci kyslíku. Strmé gradienty kyslíku jsou běžné ve vodním prostředí. Téměř všechna *Eukaryota* jsou závislá na dýchání kyslíku. Na druhou stranu je kyslík toxický, protože redukce jeho molekul vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku, například peroxidu (Fenchel a Finlay, 2008). Posloupnost organismů podél gradientu kyslíku je zdokumentována pro *Prokaryota* a heterotrofní prvky (Chen et al., 2017; Fenchel a Bernard, 1996). Gooday et al. (2000) ve své práci zjistil, že koncentrace kyslíku silně ovlivňuje strukturu bentických dírkonošců.

Dalším efektem ovlivňujícím distribuci organismů v oceánu je teplota. Teplota je faktor, který extrémně ovlivňuje biologické procesy mikrobiálních organismů (Šolić et al., 2018). Podle Righettiho et al. (2019) je nejdůležitějším faktorem druhového bohatství povrchová teplota moře, která je nejsilnějším prediktorem diverzity v pozorovaných oblastech. Zhao et al. (2017) zjistil, že teplota společně s koncentrací chlorofylu A má největší vliv na složení komunit nálevníků v oceánu. Teplota má také vliv na velikost buněk. Atkinson et al. (2003) vyčíslil inverzní vztah mezi objemem buňky a teplotou u velkého množství vodních prvoků. Zjistil, že při zvýšení teploty z 15 °C na 16 °C dojde ke zmenšení buněk asi o 2,5%. To může být adaptací na podmínky, které naznačují rostoucí rychlost růstu populace. Ale také bylo zjištěno, že ve sladké vodě u *Cylindrospermopsis raciborskii* hraje teplota zanedbatelnou roli při určení jejího rozšíření (Ryan et al., 2017). Oteplování povrchu oceánu může vést k tropikalizaci diverzity většiny planktonních skupin v mírných a polárních oblastech, což může mít rozsáhlé důsledky pro fungování mořského ekosystému, například na uhlíkový cyklus (Ibarbalz et al., 2019).

Zeměpisná šířka ovlivňuje většinu taxonomických skupin a projevuje se ubývajícím počtem druhů od tropů k pólům (Brayard et al., 2005). Tento pokles druhového bohatství byl pozorován v suchozemském i vodním prostředí, nicméně několik taxonů vykazuje reverzní nebo žádný gradient zeměpisné šířky (Hildebrand a Azovsky, 2001). Výsledky Hildebranda a Azovského (2001) ukazují, že rozsivky a pravděpodobně i další jednobuněčné a malé mnohobuněčné organismy nevykazují rozdělení druhové bohatosti podle gradientu zeměpisné šířky. Dále zjistili, že velké organismy mají největší pokles druhové bohatosti od tropů k pólům a to díky své velikosti. Podle Brayarda et al. (2005) ovlivňuje gradient zeměpisné šířky teplota povrchu moře. K jedné změně sklonu grafického modelu dochází při teplotě 10 °C, ke druhé dochází při 22 °C až 24 °C. To znamená, že při 10 °C je nejnižší druhová bohatost a při 22 °C až 24 °C naopak nejvyšší.

Podle Ibarbalze et al. (2019) poklesla diverzita mořských planktonních organismů se zvyšujícím se množstvím chlorofylu A, přičemž nejsilnější efekt je patrný pro *Metazoa*. Logares et al. (2020) ve své studii zjistil, že koncentrace chlorofylu A vysvětluje odchylku mezi komunitami prokaryot, ale není signifikantní pro pikoeukaryota. Také Gimmler et al. (2016) pozorovala signifikantní korelaci mezi bohatostí operačních taxonomických jednotek (OTU) nálevníků a chlorofylem A. Žádný jiný z měřených environmentálních parametrů nekoreloval signifikantně s jejich OTU bohatostí.

V oceánu klesá bohatství druhů s hloubkou. Místa s největší druhovou bohatostí se vyskytují v hloubce do sta metrů, kvůli vyšší teplotě vody a produktivitě. V hloubce mezi nula až sto metry bylo nalezeno téměř čtyřikrát více druhů, než v hloubce mezi sto a dvěma sty metry (Costello et al, 2017).

1.3 DNA Metabarkódování

Nejběžnější klasickou metodou pro pozorování planktonních organismů je světelná mikroskopie, která je ovšem časově náročná a vyžaduje vysokou úroveň taxonomických znalostí (Sze et al., 2018). Ke zkoumání mikrobiální druhové diverzity se také využívá analýz DNA. Základní myšlenkou tohoto principu je, že jedinci daného druhu nesou unikátní sekvenci vhodného genetického markeru (pro většinu prvků je to SSU rRNA), která může být při porovnání s ostatními sekvencemi v databázi použita jako identifikátor. Další používanou metodou je FISH, která se používá pro podrobný průzkum. Metoda FISH používá sondy cílené na rRNA v ribozomech. To umožňuje fluorescenčně značeným sondám vázat se na buňku s komplementární sekvencí DNA/RNA. Rozsáhlá databáze SSU rRNA umožňuje vývoj sond specifických pro širokou škálu taxonů. TRFLP může poskytnout rychlý náhled do mikrobiální komunity, ale často má omezené fylogenetické rozlišení. Proto musí být vybráno vysoce konzervované restriční místo, jinak může na elektroforeogramu dojít ke shlukování vzdálených taxonů a špatné interpretaci výsledků. K provedení analýz u virů ve vodním prostředí je nutné použití pulzní gelové elektroforézy, která dokáže rozlišit specifické typy virů. Tato metoda využívá toho, že každý virus má specifickou velikost genomu. Rozdělí jednotlivé genomy podle velikosti a dokáže tak poskytnout obraz o složení dané komunity (Fuhrman et al., 2002).

Dnes se k analýzám diverzity planktonu využívá environmentální DNA (eDNA), což je DNA přítomná ve vodním či suchozemském prostředí. eDNA je nástroj pro detekci druhů přítomných v daném prostředí. Použití eDNA je neinvazivní, na rozdíl od konvenčních výzkumných metod. Navíc také vykazuje vyšší detekční schopnost a efektivitu nákladů. Možné způsoby využití eDNA jsou například eDNA barkódování a eDNA metabarkódování. Cílem eDNA barkódování je identifikace jednoho druhu v daném prostředí s využitím specifických primerů (Valentini et al., 2016) a Sangerova sekvenování. Cílem eDNA metabarkódování je identifikovat několik druhů najednou. Pro tento účel musí být použity univerzální primery a metody sekvenování nové generace (NGS) (Taberlet et al., 2012). Jedním z limitujících faktorů použití eDNA metabarkódování je PCR, během které mohou vzniknout chyby, jako substituce, inserce či delece bází (Taberlet et al., 2012).

Problémem je také selektivita oligonukleotidů, případně inhibitory PCR, které mohou snížit senzitivitu PCR reakce nebo díky nim může dojít k získání falešně pozitivních výsledků (Schrader et al., 2012). Použití eDNA metabarkódování v mořském prostředí je často popisováno jako problematické, kvůli naředění eDNA ve velkém objemu vody a kvůli abiotickým faktorům, jako je například salinita, které mohou ovlivnit její transport a degradaci. Nicméně výzkum mořských ryb z pobřežních vod ukázal, že eDNA odhalila větší taxonomickou diverzitu než klasické metody (Deiner et al., 2017). Malé a symbiotické druhy dlouhou dobu unikaly tradiční mikroskopické detekci, ale dnes mohou být pomocí metabarkódingu identifikovány (Sze et al., 2018).

Ficetola et al. (2008) studoval, zda může být eDNA spohlivě použita k určení přítomnosti určitého druhu, konkrétně v tomto případě pulců žab. Ukázal, že tato technika lze použít ke zjišťování druhů v mokřadu a že je schopná rozlišit mezi přítomností a nepřítomností druhů i při nízké hustotě. Sze et al. (2018) studoval diverzitu planktonních obrněnek pomocí DNA metabarkódování a odhalil jejich větší diverzitu oproti dřívějším studiím založených na mikroskopickém pozorování.

1.3.1 Poznatky o planktonu na základě DNA metabarkódování

V posledních letech je snaha o prozkoumání role oceánu v biogeochemických cyklech a vlivu klimatických změn na procesy v oceánu a mořskou biodiverzitu. Mezi významné expedice patří Sorcerer II (2003-2010), Malaspina (2010-2011) nebo expedice Tara Oceans (2009-2013). Expedice Sorcerer II a Malaspina zajistily průzkum prokaryotických metagenomů z hladiny oceánu a bathypelagické vrstvy. Expedice Tara Oceans doplnila tyto výzkumy o vzorky planktonních organismů z hladiny oceánů a mezopelagické vrstvy (Pesant et al., 2015). Byly tak získány vzorky od virů po malý zooplankton o velikosti 0.02 μm až několik milimetrů (Bork et al., 2015).

Zvýšená pozornost se věnuje především heterotrofním mořským prvokům, kteří jsou základní součástí mořského planktonu, s počtem druhů výrazně převyšujícím počet všech fotosyntetických eukaryot (de Vargas et al., 2015; Pernice et al., 2015). Mořský plankton podporuje biologické a geochemické procesy v oceánech (de Vargas et al., 2015). Prvoci jsou považováni za důležitou součást mikrobiálního společenství v uhlíkovém cyklu (Aristegui et al., 2009). Dále jsou v moři také nedílnou součástí potravních sítí a vykazují komplexní vztahy s mikrobiálními skupinami (Edgcomb, 2016). Podle Fenchela (1988) mají fototrofní a heterotrofní organismy důležitou roli v cyklování látek v moři, potravní řetězce planktonu mají více trofických úrovní a primární produkce není přímo

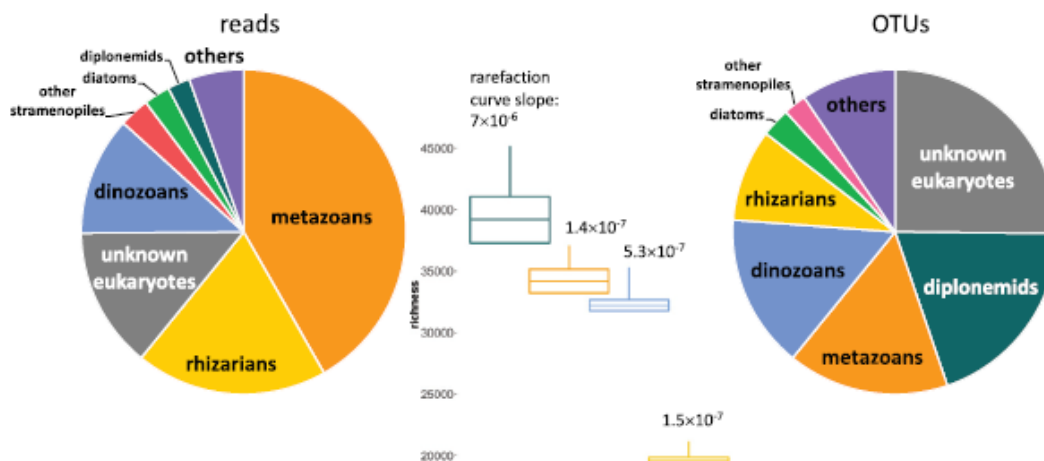
konzumována herbivory, ale dostává se skrz bakteriální produkci k fagotrofním organismům. Nejčastější příčinou úhynu eukaryotních a prokaryotních mikroorganismů v oceánu jsou lyze virů, fagotrofie prvoků a parazitismus (Edgcomb, 2016).

de Vargas et al. (2015) se ve své práci zabývá diverzitou eukaryot z planktonních komunit fotické zóny ze vzorků získaných během expedice Tara Oceans v tropickém a mírném oceánu. Podle této studie bylo odhaleno asi 75% z celkové eukaryotické ribozomální diverzity v globálně distribuované vodní mase oceánu. Bezpochybně nepřekvapivější složkou nově objevené diverzity byly sekvence diplomem. Vysoce diverzifikované a hojné jsou v této zóně skupiny *Alveolata* a *Rhizaria*. Bylo odhaleno, že na shlukování komunit má vliv především velikost organismu, přičemž pikoplankton má lepší soudržnost než větší organismy.

Mezopelagická vrstva není homogenní a obsahuje silné gradienty, které ovlivňují mikrobiální a živočišnou biotu (Robinson et al., 2010). Je to oblast, kde dochází ročně k přeměně 90% organického uhlíku na oxid uhličitý (Robinson et al., 2010). V této vrstvě se vyskytuje vysoce diverzifikovaná a aktivní komunita virů, bakterií, archeí, prvoků, zooplanktonu a nektonu (Koppelman a Frost, 2008).

Pernice et al. (2015) se ve své studii zabývá diverzitou bathypelagických mikrobiálních eukaryot o velikosti 0.8-20 μm . Vzorky byly získány během expedice Malaspina v roce 2010. Složení eukaryot v bathypelagické vrstvě vykazuje velkou variabilitu mezi jednotlivými vzorky, kterou lze špatně vysvětlit pomocí geografické vzdálenosti, ale lépe pomocí složení vodní masy a poměrem v hojnosti buněk mezi proakryoty a mikrobiálními eukaryoty. Nejdůležitější složkou bathypelagického mikrobiálního společenství jsou po prokaryotech nejvýznamnější heterotrofní mikrobiální eukaryota, která jsou považována za požírače bakterií (bacterial grazers). V bathypelagické vrstvě dominuje pouze několik skupin mikrobiálních eukaryot: *Collocladia*, *Basidiomycota*, *Chrysophyceae*, *MALV-II* a *Dinophyceae*.

Podle Flegontovy et al. (2016) jsou nejhojnějšími skupinami planktonních organismů v oceánu *Metazoa*, *Dinozoa* (obrněnky), *Rhizaria*, *Diatoma* (rozsivky), *Stramenopila* a *Diplonemida* (viz Obr. 1).



Obr. 1: Koláčový graf ukazující bohatost a hojnost planktonních eukaryot, které jsou nejvíce diverzifikované v datasetu z expedice Tara Oceans (Flegontova et al., 2016).

1.4 Nejhojnější planktonní organismy v oceánu

1.4.1 Metazoa

Nejhojnějším druhem skupiny *Metazoa* jsou *Copepoda* (klanonožci). Malí mořští planktonní klanonožci jsou nejhojnější skupinou metazoí na Zemi. Nevíme moc o potravě těchto živočichů, předpokládá se, že planktonní klanonožci se živí buňkami fytoplanktonu. Jasně je to, že se jimi živí mnoho živočichů z vyšších trofických úrovní. Například naupliová larva je kořistí pro larvy ryb a jiné planktonožravé organismy (Turner, 2004).

1.4.2 Dinozoa

Mořské obrněnky jsou kosmopolitní (Jeong, 1999). I podle fosilních záznamů byly obrněnky všudypřítomné. Obrněnky mají tři možné způsoby potravní strategie: autotrofie, mixotrofie a heterotrofie. Mixotofní a heterotrofní obrněnky jsou schopné se žít na různé kořisti, například na pikoeukaryotech, jiných obrněnkách, heterotrofních prvocích nebo metazoách. Na druhou stranu jsou dobrou kořistí pro mixotofní a heterotrofní prvoky a *Metazoa* (Jeong et al., 2010).

1.4.3 Rhizaria

Rhizaria patří do superskupiny *Eukaryota*, jsou příbuzné liniím *Stramenopila* a *Alveolata*. *Rhizaria* jsou požírači bakterií, proto mají klíčovou pozici v mikrobiálních potravních sítích. Je také známo několik fotosynteticky aktivních druhů a parazitujících

druhů skupiny *Rhizaria*. V současné době je známo více informací o fosilních druzích než o biologii současných zástupců. Mezi v současné době známé skupiny patří například *Cercozoa*, *Radiolaria*, *Haplosporidia* nebo *Acantharea* (Burki a Keeling, 2014).

1.4.4 *Diatoma*

Rozsivky jsou řasy spadající do infraříše *Stramenopila* (Chepurnov et al., 2008). Jsou to jednobuněčné eukaryotické organismy, pro které jsou typické jejich křemičité buněčné stěny a žlutohnědá pigmentace. Buňka rozsivky se skládá ze dvou více či méně identických thék, z nichž jedna je o trochu větší než druhá. Buňky jsou většinou samostatné, ale některé taxony vytváří kolonie. Jsou považovány za identifikátory znečištěné vody (Battarbee et al, 2002). Rozsivky jsou ekologicky velmi významnou skupinou, vytváří asi 20% primární produkce Země (Chepurnov et al., 2008). Společně s obrněnkami jsou hlavními fotosyntetizujícími druhy v moři (Marshall a Orr, 1928). První evidence rozsivek z geologických záznamů je z Jury. První rod rozsivek byl popsán v roce 1791 jako *Bacillaria* Gmelin (Battarbee et al, 2002).

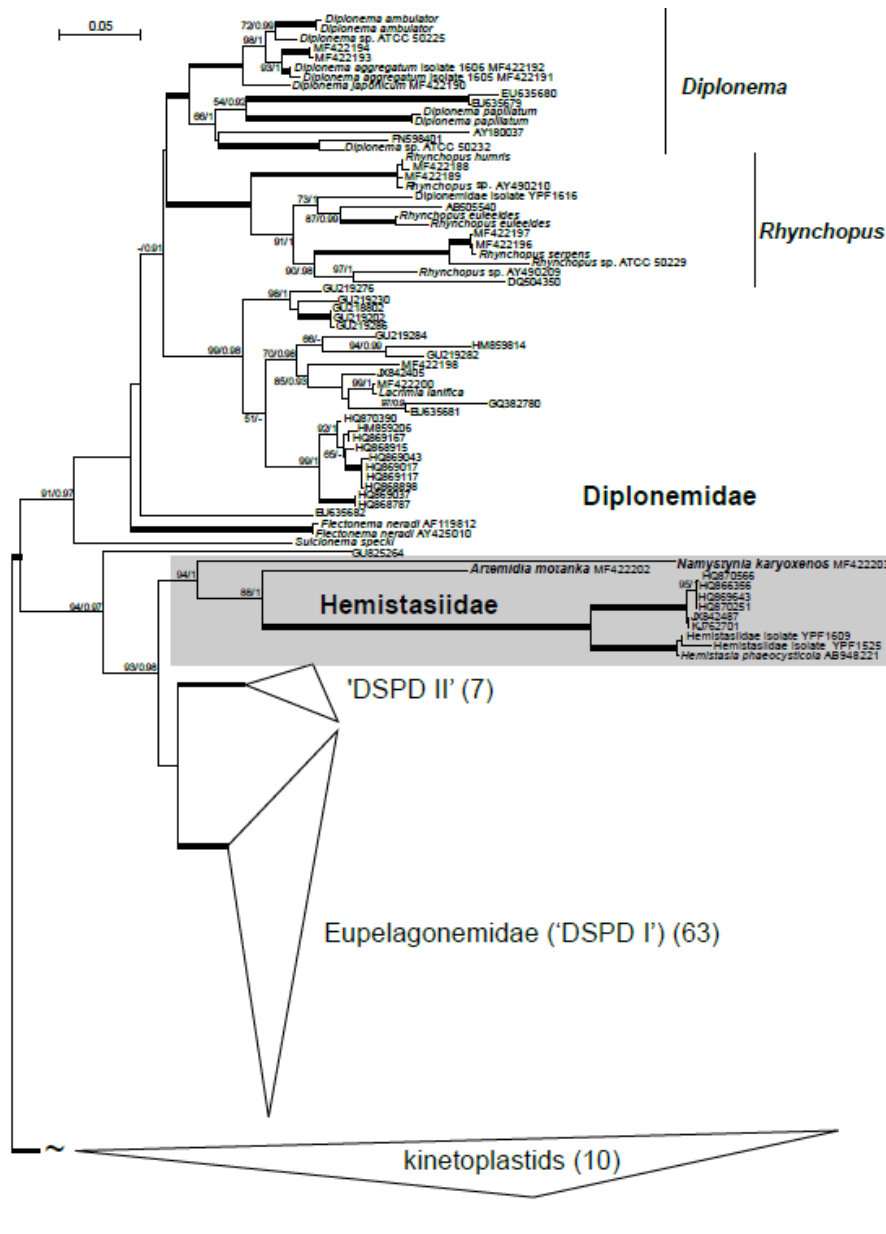
1.4.5 *Stramenopila*

Mořská stramenopila jsou diverzifikované eukaryotní mikroorganismy. Předpokládá se, že několik linií MAST obsahuje heterotrofní nanoflageláty. MAST se skládá ze dvanácti nezávislých fylogenetických klastrů (MAST-1 až MAST-12), přičemž žádný z nich není přítomný v izolovaných kulturách. Není známá trofická role u všech klastrů MAST. Zdá se, že MAST-3 obsahuje parazitické druhy. Některé MAST jsou aktivními predátory bakterií a/nebo pikoplanktonu (Lin et al.,2012), patří sem také fototrofní, fagotrofní, osmotofní nebo volně žijící organismy. Fototrofními zástupci mořských stramenopil jsou například rozsivky (Massana et al., 2004).

1.4.6 *Diplonemida*

Diplonemy jsou heterotrofní, dvoubičkatí prvoci. Řadíme je do říše *Excavata*, kmene *Euglenozoa*, kam patří například také *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Phytomonas* nebo *Euglena* (Lukeš et al., 2015; Adl et al., 2019). Rozeznáváme čtyři linie diplonem: *Diplonemidae*, *Hemistasiidae*, *Eupelagonemidae* a *DSPD II* (deep-sea pelagic diplonemids II) (viz Obr.2) (Tashyreva et al., 2018), přičemž *Eupelagonemidae* a *DSPD II* se nevyskytují v kulturách (Lara et al., 2009; Tashyreva et al., 2018). Diplonemy mají velký mitochondriální genom, složený z tisíců kruhových molekul DNA, které jsou buď relaxované a propojené v jednu síť nebo volné a nadšroubicovité (Lukeš et al., 2015).

Podle Lary et al. (2009) jsou fylotypy mořských diplonem kosmopolitní se stratifikovanou distribucí ve vodním sloupci. Jsou velmi vzácné v povrchových vodách, jejich oblíbeným prostředím je hluboký oceán (Lara et al., 2009; Lukeš et al., 2015). To může být důvod, proč byly dlouho dobu přehlíženy (Gawryluk et al., 2016), přestože první zmínka o nich se objevila před téměř dvaceti lety (López-García et al., 2001). To se změnilo po expedici Tara Oceans, která odhalila velkou diverzitu diplonemid v oceánu (Lukeš et al., 2015).



Obr. 2: Fylogeneze diplonemidů typu maximum likelihood, založená na datasetu 18S rRNA. Kinetoplastida jsou použita jako outgroup (Tashyreva et al., 2018).

Ačkoli jsou diplonemy v oceánu tak hojné, neznáme jejich roli v ekologii ekosystému oceánu. Z možných životních strategií můžeme vyloučit pouze fototrofii a myxotrofii,

protože se vyskytují vzácně ve fotické vrstvě (Flegontova et al., 2016). Výsledky de Vargase et al. (2015) naznačují, že druhově bohaté skupiny planktonních organismů mají převážně parazitický způsob života. Proti parazitickému způsobu života u diplomem je to, že jejich abundance roste s hloubkou a je signifikantní i v hloubce kolem 5000 metrů, kde není příliš velká škála jejich možných hostitelů (Lukeš et al., 2015). Tashyreva et al. (2018) objevila endosymbiózu u diplomemid. Jejich endosymbiontem je bakterie rodu *Holospira*. Oba endosymbionti sídlí v cytoplasmě a mitochondriích, což je extrémně vzácný případ.

Výsledky Flegontovy et al. (2020) ukazují, že diplomemida jsou citlivé na koncentraci kyslíku ve vodě. Preferují nízké až střední hodnoty (do 7,5 mg/l) a vyhýbají se oblastem s jeho vyššími koncentracemi. Dále byly pozorovány dva píky bohatství diplomem ve vztahu k teplotě. Došlo tak k rozlišení fotické a mesopelagické skupiny diplomem. Nejlepší model byl v této studii vytvořen pro bohatství diplomem versus koncentrace chlorofylu A. Byla pozorována negativní závislost. To naznačuje, že většina diplomemid se vyhýbá prostředí preferovaném řasami, tedy fotické vrstvě.

Diplonemy se nevyskytují pouze v oceánech, ale byly nalezeny i ve sladkovodním prostředí. Ačkoli se zde nevyskytují v tak vysokém počtu jako v oceánu, jsou i v nejstarším a nejhlubším jezeře světa, v jezeře Bajkal, a to v hlubším vodním sloupci (Yi et al., 2017). Diplonemy byly také objeveny v pěti hlubokých sladkovodních jezerech v Japonsku: Biwa, Ikeda, Motosu, Sai a Chuzenji (Mukherjee et al., 2019). Do své další studie zahrnul Mukherjee et al. (2020) i pět evropských jezer: Římov, Medard, Zurich, Constance a Lugano. Během této studie bylo zjištěno, že sekvence získané z geograficky vzdálených sladkovodních jezer si byly velmi podobné a zdají se být sesterskou skupinou k několika mořským izolátům.

2. Cíle práce

V této práci se budu zabývat vlivy prostředí (teplota vody, koncentrace kyslíku, hloubka, fluorescence, salinita, zeměpisná šířka a délka) na planktonní organismy polárních oblastí. K tomuto účelu bude použito DNA metabarkódování a následně bude provedena bioinformatická analýza v programu RStudio (Boston, MA, USA).

Hypotézy této práce jsou:

1. Arktické a antarktické komunity diplomem si budou podobné, protože žijí ve stejném prostředí.
2. Antarktické planktonní komunity reagují na environmentálními vlivy a na základě těchto vlivů vytvářejí funkční skupiny.

Z těchto hypotéz vychází cíle této práce:

1. Na příkladu diplomem porovnat strukturu arktických a antarktických planktonních společenstev a posoudit vliv izolace vzdáleností.
2. Zjistit, jakým způsobem reagují jednotlivé nejpočetnější skupiny planktonu na základní parametry prostředí a na základě toho určit funkční skupiny planktonu.

3. Metodika

3.1 Vzorky a izolace

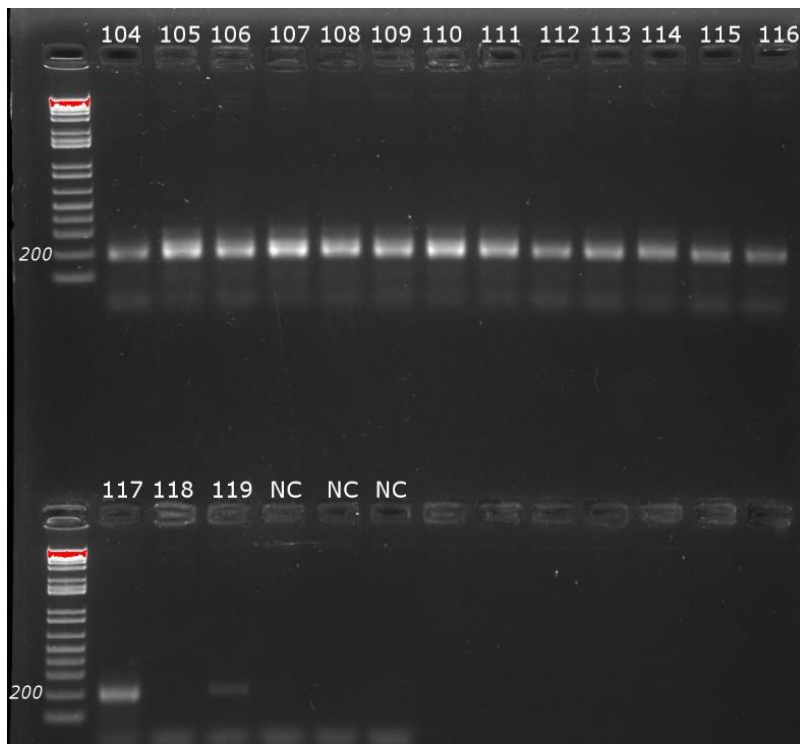
Vzorky použité v této práci byly sbírány Olgou Flegontovou od února do dubna 2019 ve Weddelově moři během expedice PS118 výzkumného plavidla Polarstern. Vzorky vody byly odebírány pomocí 10 litrových Niskinových lahví připojených na vzorkovač vybavený CTD. U jednotlivých vzorků byly zaznamenány informace o hloubce, zeměpisných souřadnicích, intenzitě fluorescence, koncentraci kyslíku, salinitě a teplotě vody. Filtrace a uchování vzorků před filtrací bylo při +4 °C v temnu. Filtrace 10 litrů vody trvala dvě až čtyři hodiny a byla provedena pomocí stolní peristaltické pumpy Cole-Palmer Masterflex přes systém tří filtrů. Byl tak získán mořský piko-nano plankton o velikosti 0,8 µm -20 µm, který byl na filtrech uchován v 1 ml lyzačního pufru PW1 z izolačního kitu PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO, USA) při -20 °C. DNA byla vyizolována z filtrů pomocí kitu PowerWater DNA Isolation Kit (MO BIO, USA), postupovalo se podle přiloženého návodu. Koncentrace získané DNA byla změřena přístrojem Qubit 2.0 (Invitrogen).

3.2 Polymerázová řetězová reakce

V9 oblast 18S rRNA byla namnožena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití univerzálních eukaryotických primerů (5'-TTGTACACACCGCCC-3', 5'-CCTTCYGCAGGTTACCTAC-3'). Celkový objem všech reakcí byl 50 µl. Rozpis pro jednu amplifikaci byl: 25 µl 2X Master Mix (New England BioLabs), 1 µl forward primeru (5'-TTGTACACACCGCCC-3'), 1 µl reverse primeru (5'-CTTCYGCAGGTTACCTAC-3'), 5 µl DNA a 18µl dH₂O. Protokol PCR reakce byl následující: 94°C / 15 s, 62°C / 30 s, 68°C / 30 s, 30 cyklů.

3.3 Gelová elektroforéza a izolace PCR produktů

Průběh PCR reakcí byl ověřen pomocí gelové elektroforézy. Vzorky byly nanášeny na 1,5% agarózový gel. Pro přípravu gelu bylo použito 1,2 g agarózy (ThermoFisher), 80 ml TAE (Merck) a 8 µl GelRed (Biotium) fluorescentního barviva pro vizualizaci DNA. Na gel bylo nanášeno 5 µl vzorku. Elektroforéza probíhala přibližně 30 minut při 100 V. Po dokončení elektroforézy byl gel osvětlen pod UV světlem pro vizualizaci fragmentů DNA.



Obr. 3: Snímek agarózového gelu s antarktickými vzorky. Velikost získaného produktu je 200 bp.

Produkty získané při PCR reakci byly vyizolovány pomocí Expin Combo GP izolačního kitu (GeneAll, Germany).

3.4 Sekvence a úprava sekvencí

Amplikony V9 byly sekvenovány pomocí Illumina HiSeq v Genome Quebec (Montreal, Canada) a byly získány pomocí 150 bp pair-end čtení. K těmto antarktickým sekvencím byly přidány sekvence arktické z expedice Tara Oceans. Sekvence primerů byly odstraněny použitím cutadapt v. 1.15 s následujícím nastavením: --no-indels, --discard-untrimmed, --minimumlength 50, --overlap 4, -e 0.2, -a TTGTACACACCGCCC ... GTAGGTGAACCTGCRGAAGG, -A CCTTCYGCAGGTTCACCTAC ... GGGCGGTGTGTACAA. Následně byla čtení spojena pomocí bbmerge ve výchozím nastavení. Pomocí bbdup byly z čtení odstraněny neurčené báze (Ns) a byla odfiltrována čtení s kvalitou čtení menší než 20. Takto připravená čtení byla spojena do barkódů pomocí vsearch v. 2.7.1 s výchozím nastavením. Barkódy byly seskupeny do operačních taxonomických skupin (OTUs), tzv. swarmů pomocí swarm v. 2.2.2 (Mahé et al., 2015) s následujícím nastavením: -d 1, -f, -z. Celkem bylo vygenerováno 46560 eukaryotických swarmů, které reprezentují 153 milionů readů.

3.5 Bioinformatická analýza

Swarmy byly taxonomicky anotovány nástrojem ggsearch36. Jako reference pro anotaci byly použity sekvence z databáze PR2 (<https://github.com/pr2database/pr2database>) doplněné aktualizovanými sekvencemi pro Discoba a Metamonada (Kolisko et al. 2020) převzatých z databáze EukRef (<https://github.com/eukref/curation>). Před taxonomickým přiřazením byla vyextrahována oblast V9.

Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu RStudio (Boston, MA, USA).

Pro analýzu diplomem byly vybrány swarmy jejichž hojnost byla ≥ 100 čtení a podobnost k referenci $\geq 80\%$. Takto bylo vybráno 983 swarmů, které představují 21,4 milionu readů. Abychom získali přehled o rozdílech ve zkoumané komunitě použili jsme techniky redukce dimenzionality, bylo provedeno nonmetrické vícerozměrné škálování (NMDS) (vegan, ggplot2) a analýza redundance (RDA) (vegan, ggplot2), beroucí v úvahu proměnné prostředí. Pro zjištění jak proměnné prostředí ovlivňují relativní hojnost a druhovou bohatost diplomem, byly vytvořeny grafy distribuce biologických proměnných (relativní hojnost a bohatost) v porovnání s proměnnými prostředí (teplota, koncentrace kyslíku, salinita, zeměpisná šířka a délka) (balíček ggplot2). Byl vytvořen hloubkový profil (balíček ggplot2). K porovnání arktických a antarktických diplomem byly swarmy rozděleny pomocí balíčku indicspecies na fotické a afotické a podle oblasti výskytu na arktické a antarktické (polární) a nepolární. Poté byly vytvořeny Vennovy diagramy (balíček VennDiagram). Dále bylo pro porovnání arktických, antarktických a nepolárních diplomem provedeno nonmetrické vícerozměrné škálování NMDS (vegan, ggplot2).

Pro analýzu eukaryot byly vyloučeny z následující analýzy swarmy, které měly hojnost < 100 čtení a podobnost $< 90\%$ k nejpodobnější sekvenci v referenční databázi. Tímto způsobem bylo k analýze vybráno 20 eukaryotických skupin (definovaných podle Adl et al., 2019) reprezentovaných alespoň 300000 čteními. Abychom zjistili, jak je relativní hojnost vybraných skupin Eukaryot ovlivněna proměnnými prostředí, byl vypočítán párový Spearmanův korelační koeficient pro relativní hojnost všech vybraných eukaryotických skupin, který odhaluje monotónní závislosti mezi vybranými skupinami Eukaryot. Pro tuto matici bylo použito hierarchické klastrování a byl vytvořen dendrogram (balíček hclust R, metoda complete). Byl vytvořen graf čtení versus swarmy (balíčky ggplot2, scales), který zobrazuje skupiny s velkým množstvím vzácných operačních taxonomických skupin (OTUs). Abychom poznali linie trendů jednotlivých skupin, byly vytvořeny grafy

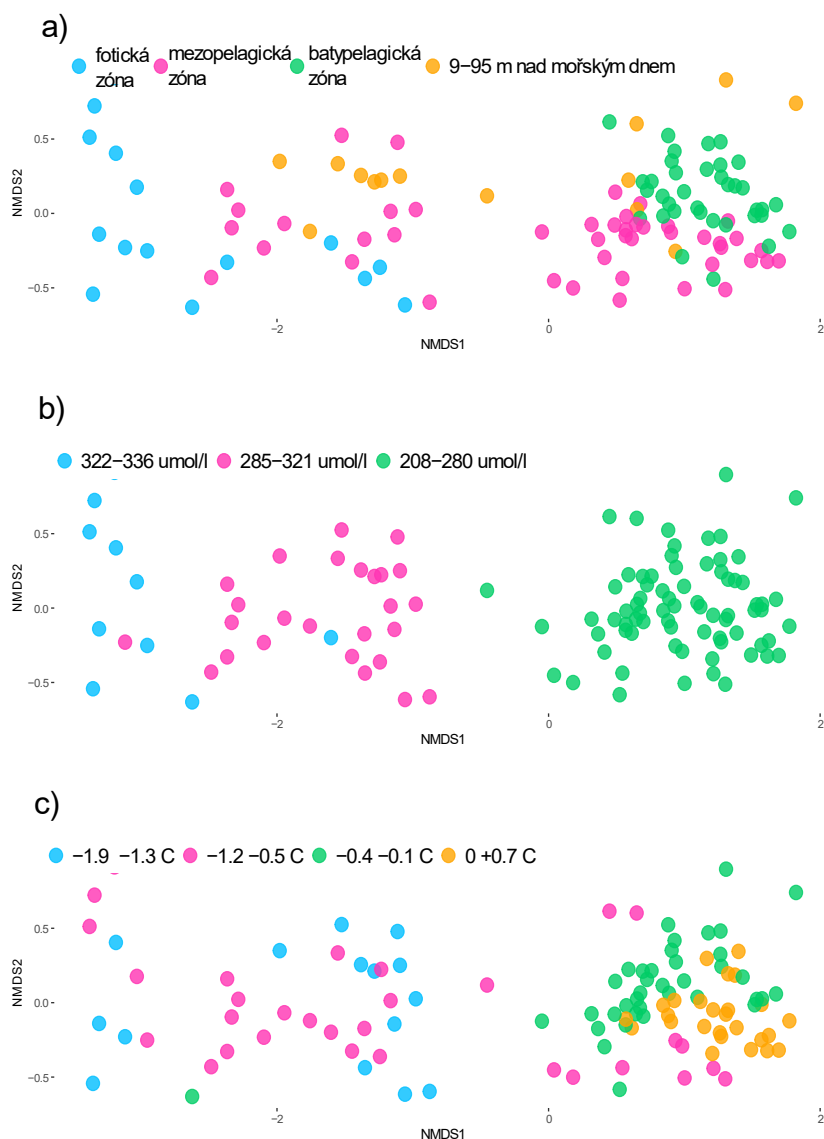
distribuce relativní hojnosti ve srovnání s proměnnými prostředí (hloubka, koncentrace kyslíku, teplota vody) pomocí generalizovaných aditivních modelů (GAM) implementovaných v balíčku mgcv R. GAM ($y \sim s(x)$) bylo nastaveno na základě gamma distribuce, která je vhodná pro pozitivní spojité proměnné (bohatost). Bylo použito nastavení „link = identity“. Pro každou skupinu byl také vytvořen graf závislosti druhové bohatosti na vzdálenosti ode dna (balíček ggplot2).

4. Výsledky

4.1 Diplonemy

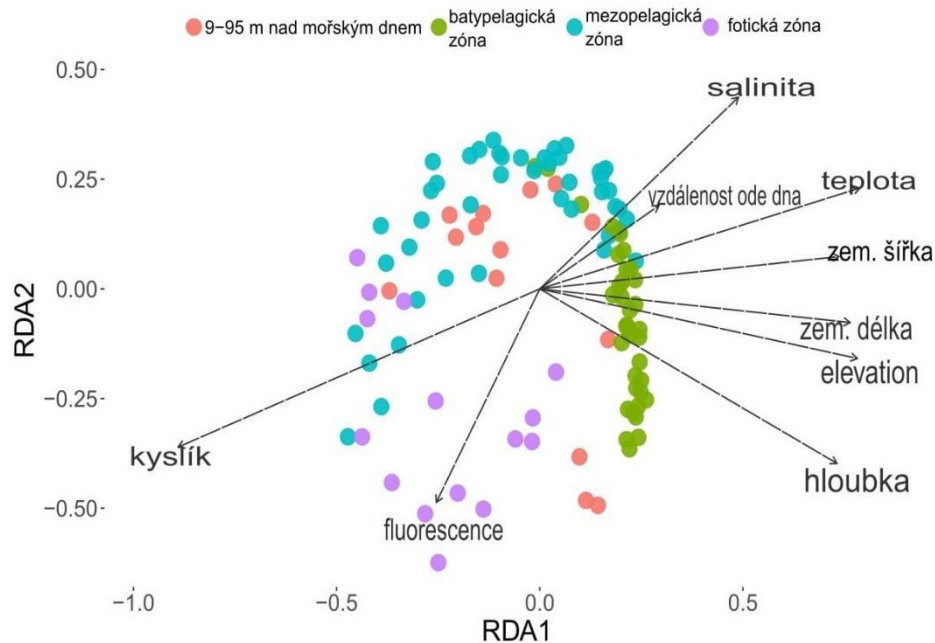
4.1.1 Vliv prostředí na distribuci diplonem

Data Flegontovy et al. (2020) ukazují, že diplonemy jsou citlivé na koncentraci kyslíku ve vodě. Pro zjištění, která proměnná prostředí nejvíce ovlivňuje distribuci antarktických diplonem jsme provedli nonmetrické vícerozměrné škálování NMDS (viz Obr. 4) a analýzu redundance (RDA) (viz Obr. 5).



Obr. 4: Nonmetrické vícerozměrné škálování antarktických diplonem podle a) hloubky, b) koncentrace kyslíku, c) teploty vody.

NMDS ukazuje, že nejvíce je distribuce diplonem ovlivněna koncentrací kyslíku.

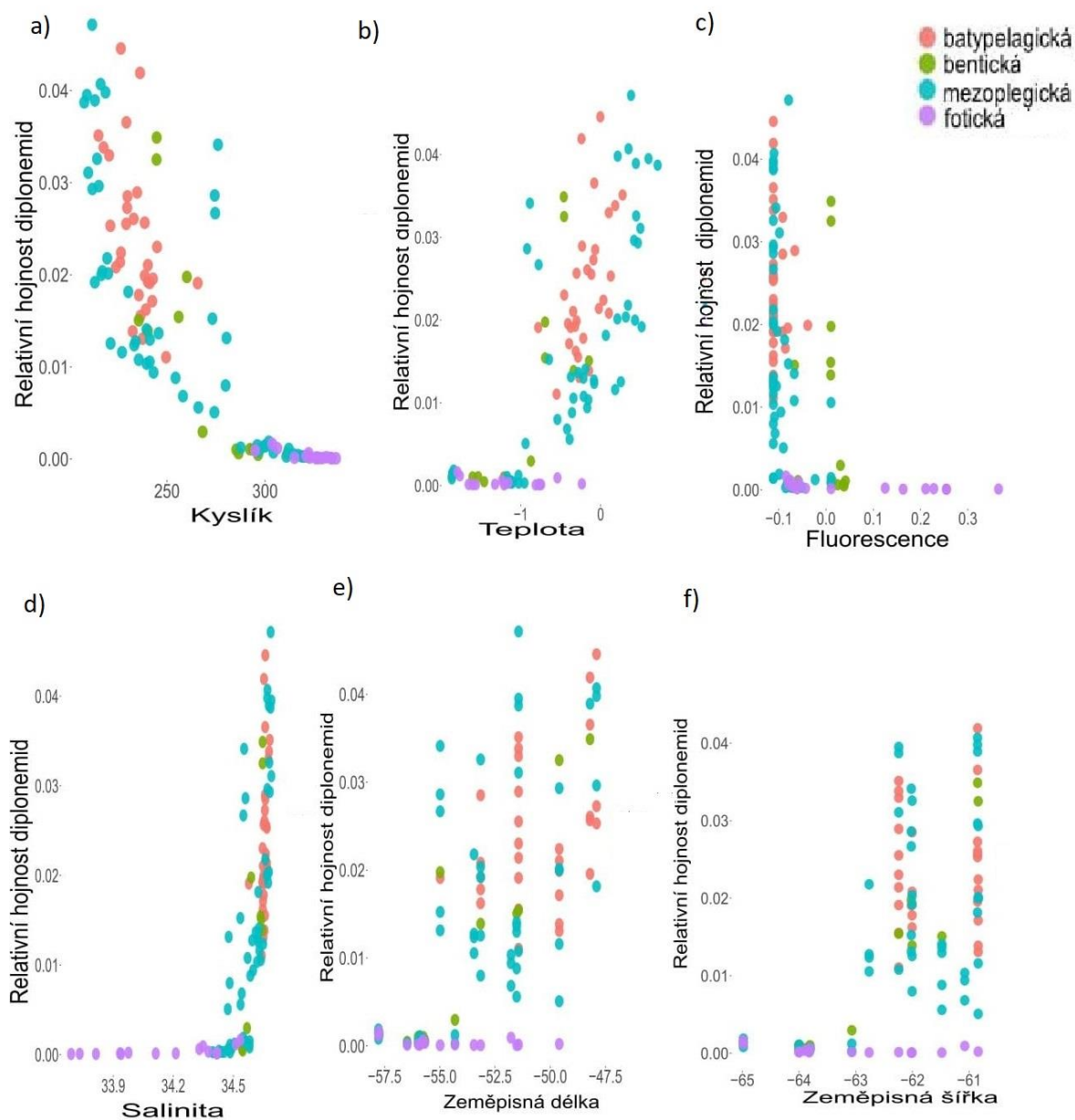


Obr. 5: Redundantní analýza antarktických diplonem.

RDA ukazuje, stejně jako NMDS, že na distribuci diplonem má největší vliv koncentrace kyslíku.

Následně byly vytvořeny grafy distribuce relativní hojnosti a druhové bohatosti v závislosti na jednotlivých proměnných prostředí. Výsledky jsou zaměřeny na relativní hojnost, protože ta je z hlediska ekosystému důležitější než druhové bohatství. Tyto grafy ukazují, že diplonemy preferují nižší koncentrace kyslíku (viz Obr.6a) a že jejich hojnost roste s teplotou vody (viz Obr. 6b).

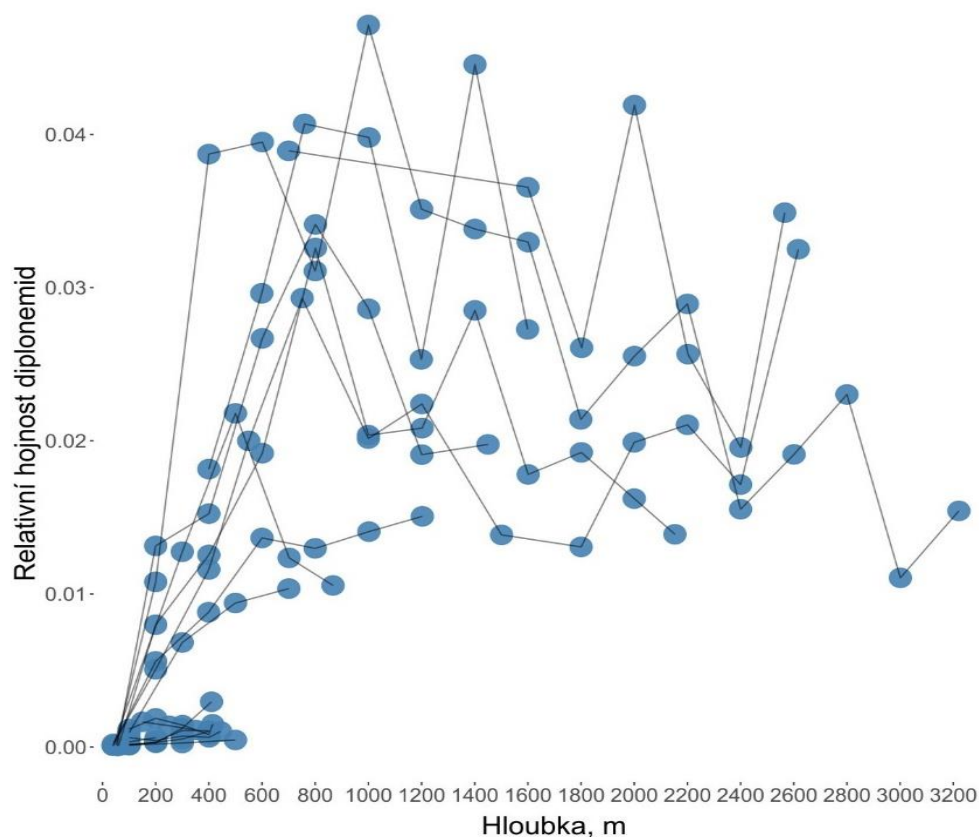
Na rozdíl od výše uvedených parametrů, fluorescence (viz Obr.6c), salinita (viz Obr. 6d), zeměpisná délka (viz Obr. 6e) ani šířka (viz Obr. 6f) nemají na diplonemy zřejmý vliv.



Obr.6: Relativní hojnost antarktických diplomemid v závislosti na a) koncentraci kyslíku, b) teplotě vody, c) fluorescenci, d) salinitě, e) zeměpisné délce, f) zeměpisné šířce.

4.1.2 Hlubkový profil

Předchozí data ukazují, že diplomemy preferují spíše hlubší vrstvy oceánu (Flegontova et al., 2016). Podrobnější data jsou však k dispozici pouze pro dvě lokality v Jaderském moři (Flegontova et al., 2020). Vzorky prezentované v této práci nám umožňují podobné srovnání i pro vody kolem Antarktidy.



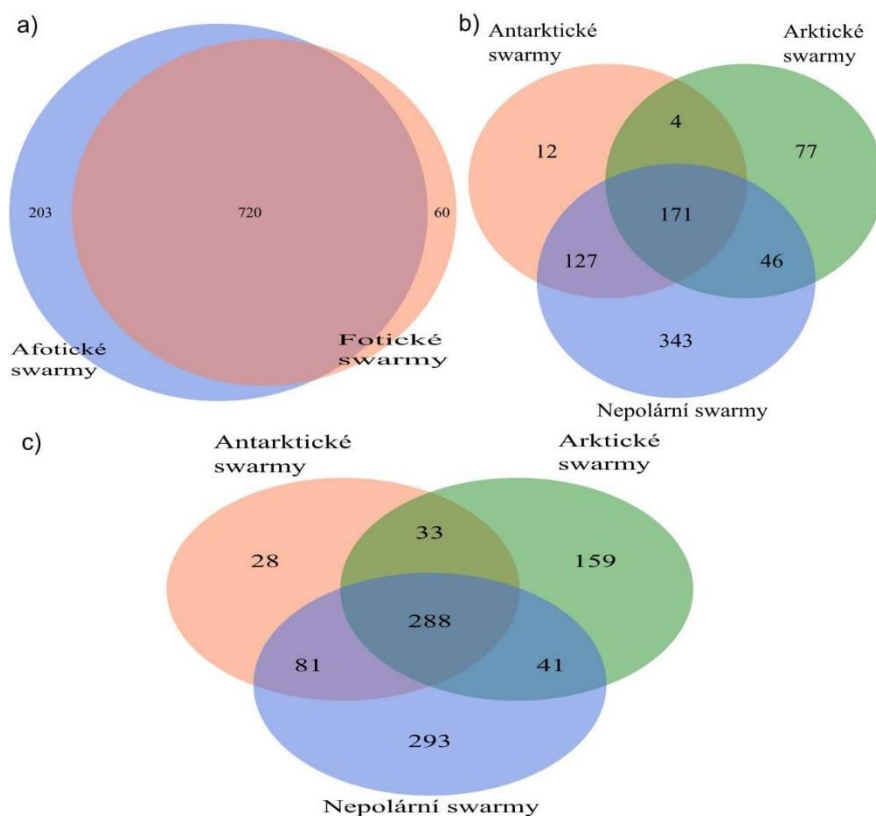
Obr. 7: Hloubkový profil antarktických diplonem. Vzorky se ze stejné lokality jsou propojeny čarami.

Hloubkový profil (viz Obr. 7) ukazuje, že relativní hojnost antarktických diplonem roste do 1000 m, kde je největší a poté začne klesat. Nejnižší relativní hojnost je od 0 m do 200 m, ve fotické zóně.

4.1.3 Porovnání arktických a antarktických diplonem

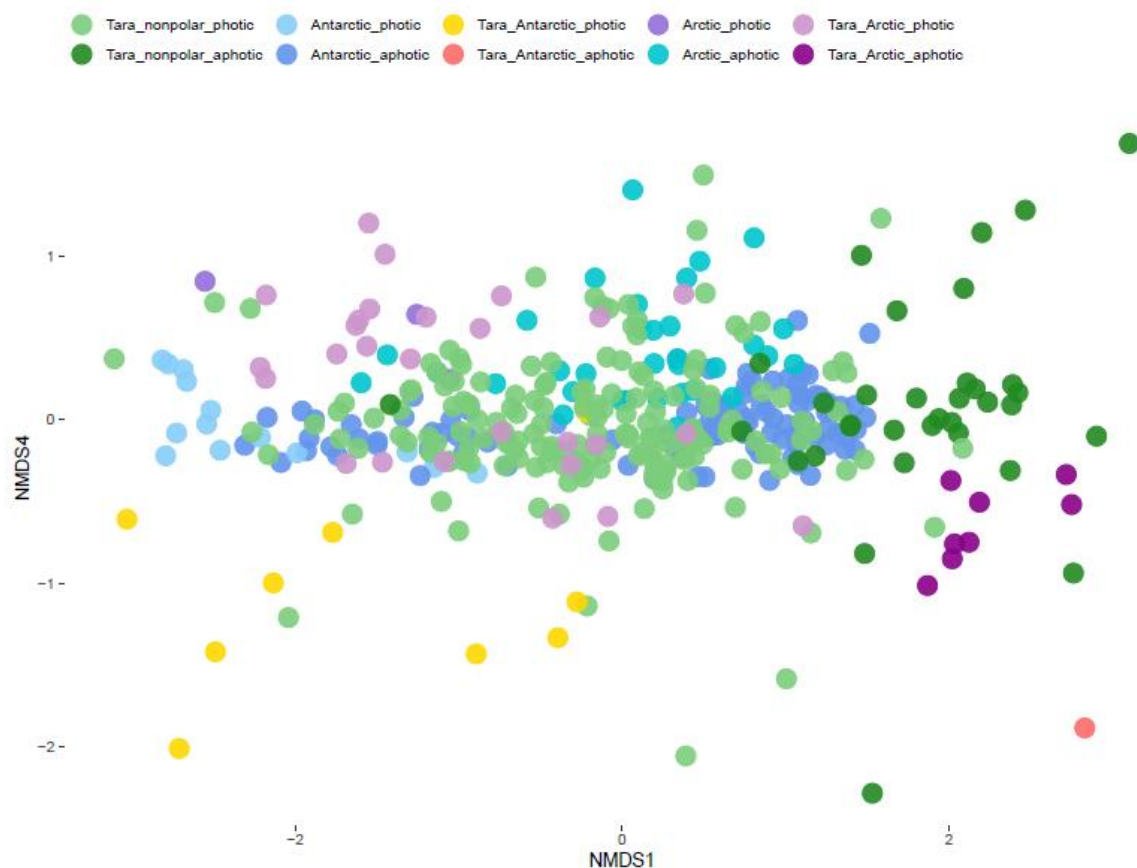
Podle výsledků Flegontovy et al. (2016) jsou diplonemy vzácné ve fotické vrstvě, což ukazuje i Obr. 7. Proto byl vytvořen Vennův diagram porovnávající množství fotických a afotických swarmů v datasetu. Ten ukazuje, že větší zastoupení mají afotické než fotické swarmy, ovšem největší množství je těch, které se vyskytují jak ve fotické tak i afotické zóně (viz Obr. 8a).

Následně jsme vytvořili Vennův diagram pro fotické swarmy (viz Obr. 8b). Tento diagram ukazuje, že nejvíce swarmů je z nepolární oblasti (343), naopak nejméně je antarktických (12). Stejně vypadá i diagram pro afotické swarmy (viz Obr. 8c), nejvíce swarmů je nepolárních (293) a nejméně antarktických (28).



Obr. 8: Vennovy diagramy a) porovnání počtu fotickýc a afotickýc swarmů v datasetu, b) rozdělující fotické swarmy na antarktické, arktické a nepolární, c) rozdělující afotické swarmy na antarktické, arktické a nepolární.

Při porovnání těchto diagramů vidíme, že rozdělení diverzity diplomem je stejné ve fotické i afotické zóně, ale celkově je větší diverzita diplomem v afotické zóně. Rozdělení fotických a afotických swarmů ukazuje minimální sdílení swarmů mezi arktickými a antarktickými diplomemami. Vypadá to, že obě oblasti jsou účinně odděleny „nepolárním oceánem“. Nicméně tento výsledek je na úrovni jednotlivých swarmů, pro porovnání celých komunit jsme vytvořili NMDS (viz Obr. 9).



Obr. 9: Nonmetrické vícerozměrné škálování arktických, antarktických a nepolárních diplomem.

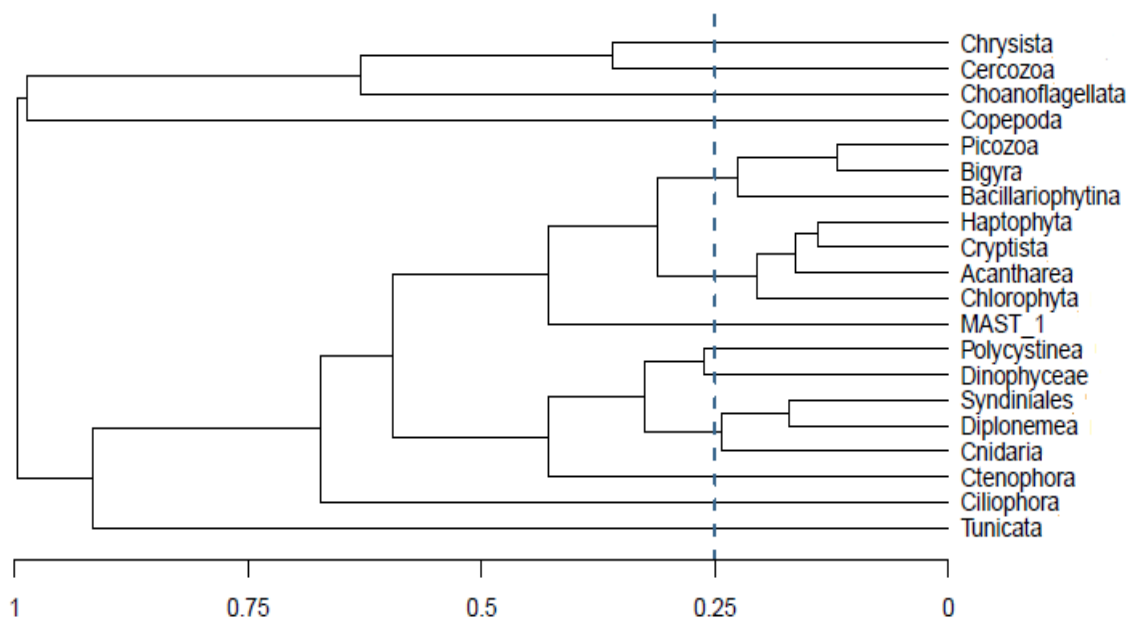
NMDS arktických, antarktických a nepolárních diplomem ukazuje, že tyto komunity jsou si podobné i přes vzdálenost mezi nimi, což neodpovídá předchozímu výsledku.

4.2 Eukaryota

Pro následující analýzu byla kritéria nastavena tak, že relativní hojnost musela být alespoň ≥ 100 čtení a podobnost k referenci $\geq 90\%$, finálně bylo vybráno 20 skupin s alespoň 300000 čteními. Konkrétně byly vybrány taxonomické skupiny *Acantharea*, *Bacillariophytina* (rozsivky), *Bigyra*, *Cercozoa*, *Ciliophora* (nálevníci), *Cnidaria* (žahavci), *Copepoda* (klanonožci), *Cryptista* (skrytěnky), *Ctenophora* (žebnatky), *Dinophyceae*, *Diplonemea*, *Haptophyta*, *Chlorophyta*, *Choanoflagellata*, *Chrysis*, *MAST-1*, *Picozoa*, *Polycystinea*, *Syndiniales* a *Tunicata* (pláštěnci).

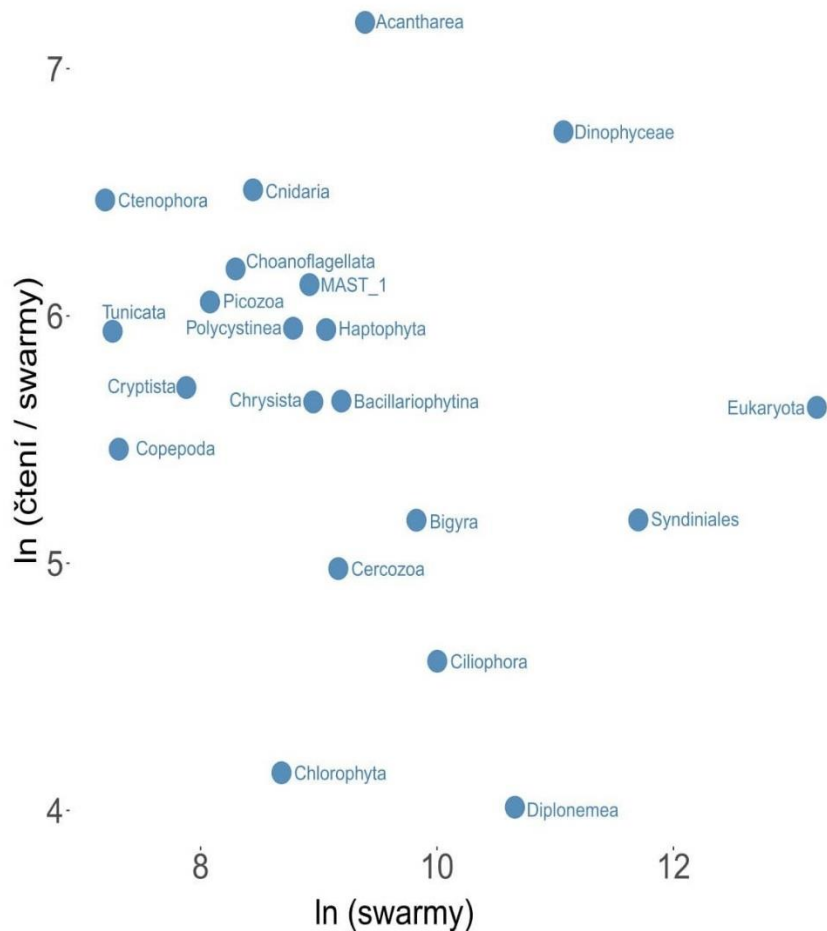
Pro zjištění vzájemného vztahu (korelace) relativních hojností jednotlivých skupin byl vypočítán Spearmanův korelační koeficient a byl vytvořen dendrogram seskupující dohromady skupiny s podobnou relativní hojností (viz Obr. 10). Tento dendrogram ukazuje, že relativní hojnost je vysoce korelována mezi *Picozoa* a *Bigyra*, *Haptophyta* a *Cryptista*,

Syndiniales a *Diplonemea*. Párový Spearmanův korelační koeficient je pro tyto skupiny $>0,75$, to znamená že je mezi těmito skupina úzká korelace. Organismy s korelovanou relativní hojností mohou záviset stejně na měřených proměnných prostředí.



Obr. 10: Dendrogram relativní hojnosti 20 vybraných eukaryotických skupin.

Následně jsme vytvořili graf závislosti počtu čtení na počtu swarmů, který ukazuje skupiny obsahující velké množství vzácných operačních taxonomických skupin (OTUs) (viz Obr. 11). Tento graf ukazuje, že nejvíce vzácných OTUs má skupina *Diplonemea*, naopak nejméně vzácných OTUs má skupina *Acantharea*.



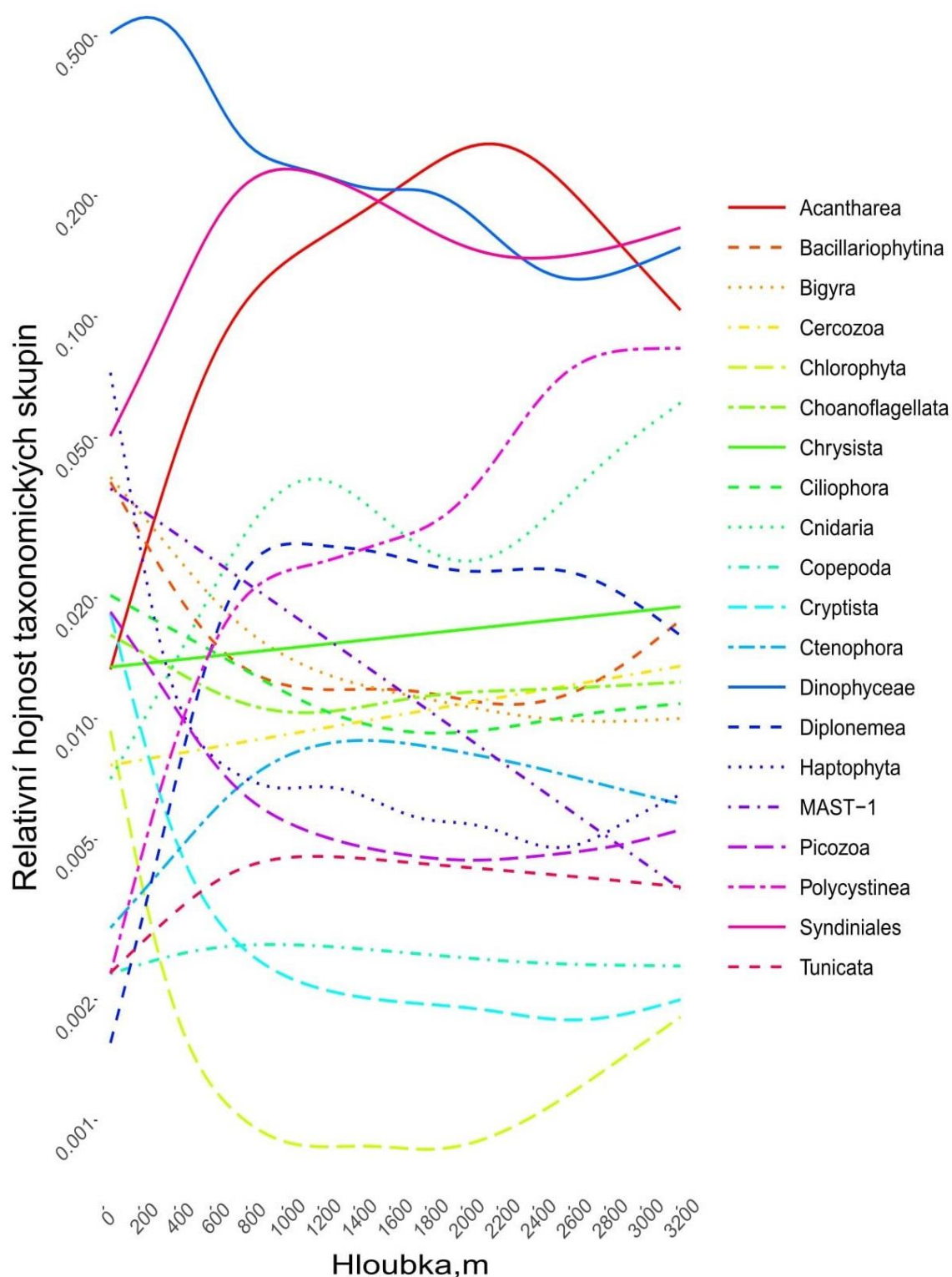
Obr. 11: Graf zobrazující počet čtení vs. počet swarmů.

4.2.1 Vliv prostředí na Eukaryota

Výsledky Ibarbalze et al. (2019) ukazují, že teplota se jeví jako nejlepší prediktor diverzity planktonu. My jsme pro zjištění, jak jednotlivé skupiny reagují na parametry prostředí, vytvořili grafy relativních hojností jednotlivých skupin v závislosti na hloubce, vzdálenosti ode dna, koncentraci kyslíku a teplotě vody.

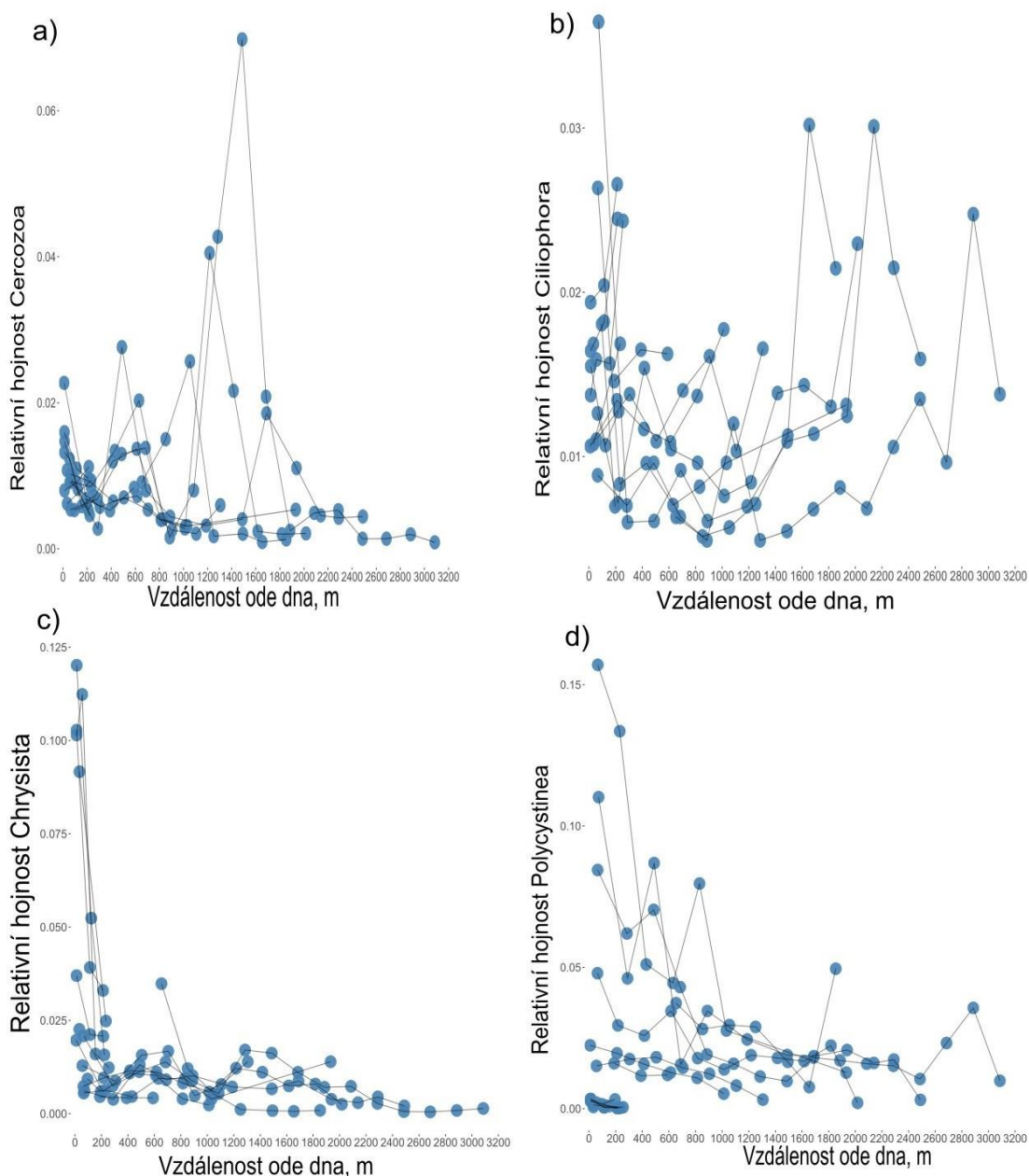
Vliv hloubky rozdělil vybraná Eukaryota do šesti skupin. Řasy jsou nejhojnější ve fotické zóně. Do této skupiny spadají *Bacillariophytina*, *Bigyra*, *Cryptista*, *Dinophyceae*, *Haptophyta*, *Chlorophyta*. Jejich relativní hojnost se s hloubkou snižuje. Druhá skupina má stejný trend jako diplomemy, do určité hloubky jejich hojnost roste a poté začne klesat. Do této skupiny patří *Acantharea*, *Diplonemea* a *Syndiniales*. Třetí skupinou jsou Eukaryota, u kterých není patrný žádný trend závislosti hojnosti na hloubce. Patří sem *Cercozoa*, *Copepoda*, *Choanoflagellata*, *Chrysiata*, *Tunicata*, *Ciliophora*, *Cnidaria* a *Ctenophora*. *MAST-1*, *Picozoa* a *Polycystinea* tvoří samostatné skupiny. Relativní hojnost *MAST-1* se snižuje s hloubkou. *Picozoa* má optimum v hloubce kolem 200 m až 400 m.

Relativní hojnost *Polycystinea* narůstá s hloubkou. Relativní hojnosti jednotlivých skupin v závislosti na hloubce viz Obr. 12.



Obr. 12: Relativní hojnosti vybraných taxonomických skupin v závislosti na hloubce. Osa y je zlogaritmována.

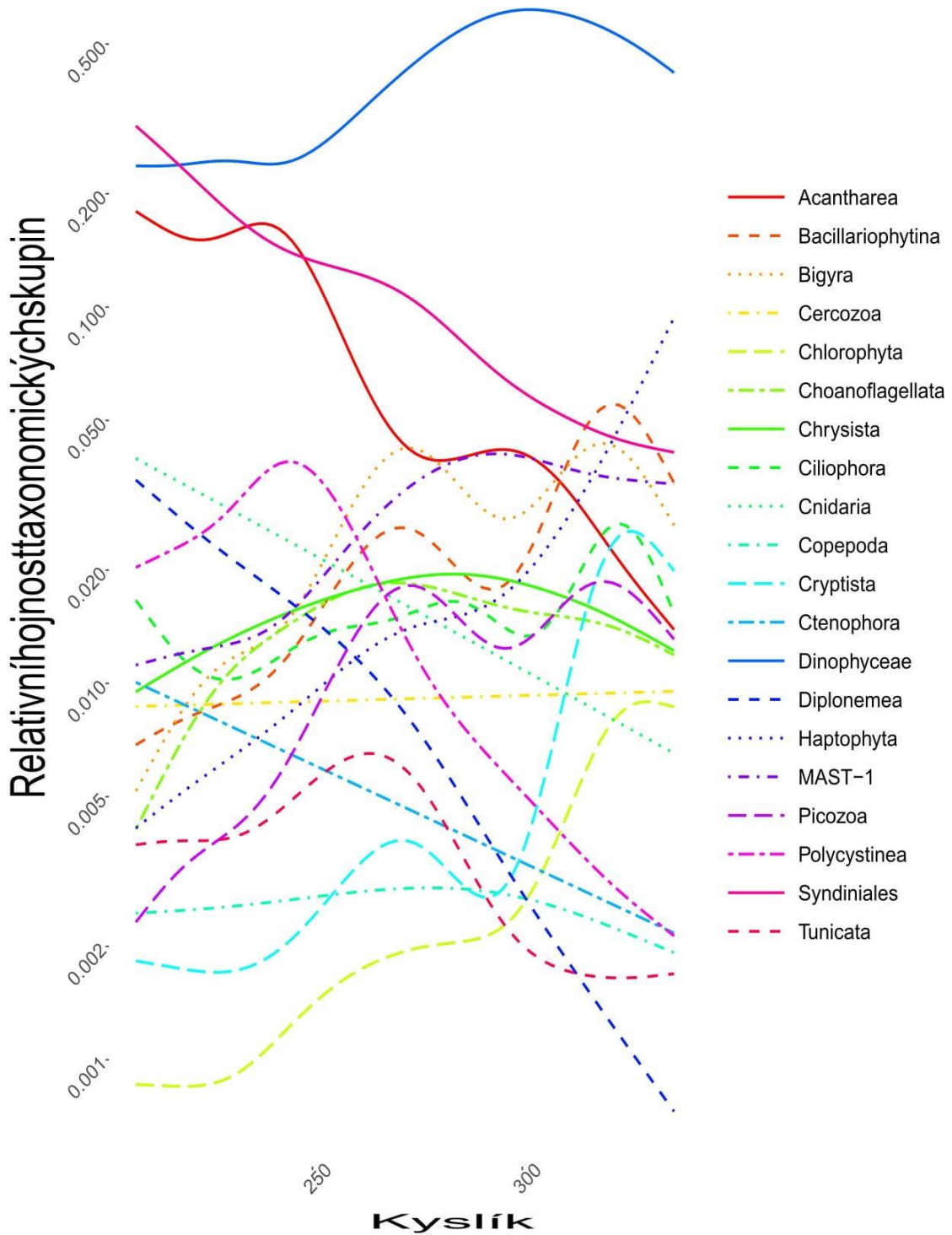
Vytvořením grafů závislosti relativní hojnosti na vzdálenosti ode dna byly nalezeny skupiny planktonních Eukaryot vyskytujících se převážně na oceánském dně nebo těsně nad ním. Jsou to *Cercozoa*, *Ciliophora*, *Chrysista* a *Polycystinea* (viz Obr. 13).



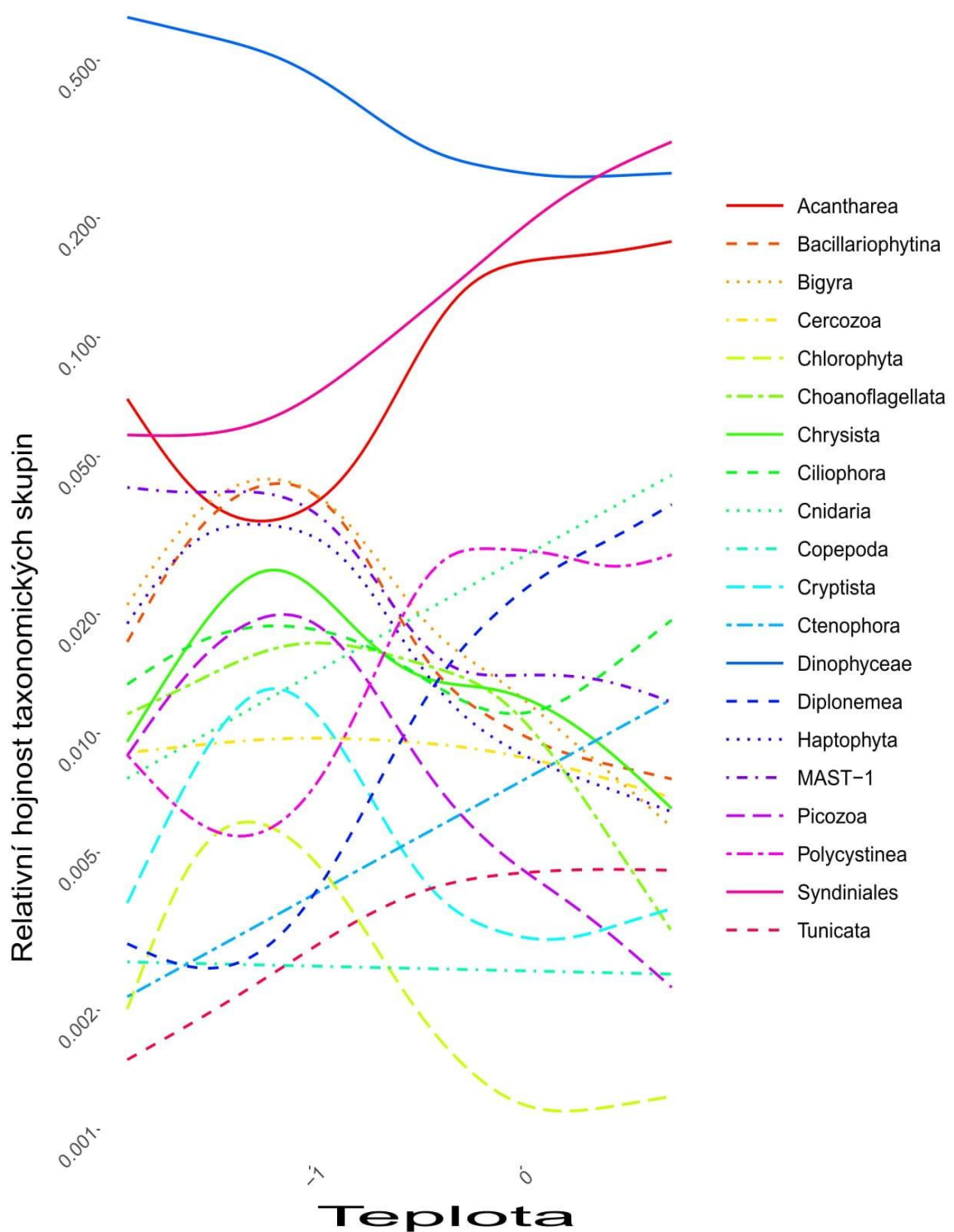
Obr. 13: Relativní hojnosti bentických druhů Eukaryot v závislosti na vzdálenosti ode dna
a) *Cercozoa*, b) *Ciliophora*, c) *Chrysista*, d) *Polycystinea*.

Na základě závislosti relativní hojnosti vybraných skupin Eukaryot na koncentraci kyslíku (viz Obr. 14) a teplotě vody (viz Obr. 15) byla Eukaryota rozdělena do následujících skupin. První skupina se vyhýbá nízkým teplotám a vysokým koncentracím kyslíku. Do této skupiny patří *Acantharea*, *Ciliophora*, *Cnidaria*, *Ctenophora*, *Diplonemea*, *Polycystinea*

a *Syndiniales*. Druhá skupina naopak preferuje nízké teploty a vysoké koncentrace kyslíku, patří sem *Cryptista*, *Haptophyta* a *Chlorophyta*. Další skupina má optimum pro teplotu vody i koncentraci kyslíku. Do této skupiny spadají *Bacillariophytina*, *Bigyra*, *Copepoda*, *Dinophyceae*, *Choanoflagellata*, *MAST-1*, *Picozoa* a *Tunicata*. Poslední skupinou jsou bentické druhy, bez zjevného trendu. Do této skupiny patří *Cercozoa* a *Chrysista*.



Obr. 14: Závislost taxonomických skupin na koncentraci kyslíku. Osa y je zlogaritmována.



Obr. 15: Závislost taxonomických skupin na teplotě vody. Osa y je zlogaritmována.

Na základě získaných výsledků, vlivu hloubky, kyslíku a teploty na relativní hojnost, i podle Spearmanova korelačního koeficientu, můžeme říct, že *Diplonemea* se *Syndiniales* a *Haptophyta* s *Cryptista* společně tvoří komunitu, ve které mezi nimi možná dochází k interakcím, jejichž povaha je zatím neznámá a musí být ověřena experimentálně.

5. Diskuze

Oceán je domovem velkého množství planktonních organismů, které podporují fungování mořského ekosystému (Ibarbalz et al., 2019). Je obecně přijímáno, že komunity prvků jsou rozvrstvené podél gradientů biotických a abiotických faktorů, jako je světlo, koncentrace kyslíku, teplota, tlak, salinita a živiny, které určují jejich distribuci (Diehl, 2002, Arístegui et al., 2009, Orcutt et al., 2011).

Pro získání výsledků této práce byly použity statistické metody NMDS, RDA, Spearmanův korelační koeficient a GAM. NMDS a RDA jsou metody redukující dimenzionalitu. NMDS je standartně používaná metoda. RDA je lineární metoda (Palmer, 2008), užitečná pro detekci adaptivní variace (Capblancq et al., 2018). Spearmanův korelační koeficient je relativně jednoduchá technika, kterou lze použít pro průzkumnou analýzu dat (Gauthier, 2001), v této práci byla použita pro zjištění, jak je relativní hojnost vybraných skupin Eukaryot ovlivněna proměnnými prostředí. Abychom poznali linie trendů jednotlivých skupin, byly vytvořeny GAM. Silnou stránkou GAM je to, že se dokáží vyrovnat s nelineárními a nemonotónními vztahy odpovědí a množinou vysvětlujících proměnných. Je to proto, že data určují povahu vztahu mezi odpovědí a množinou vysvětlujících proměnných, spíše než předpokládají nějakou formu parametrického vztahu (Guisan et al., 2002). Metody RDA, Spearmanův korelační koeficient a GAM použila ve své práci také Flegontova et al. (2020).

Ve vodním prostředí jsou běžné strmé gradienty kyslíku. Ty vznikají tam, kde produkce nebo spotřeba kyslíku přesahuje transportní rychlosti molekulární difuze (Fenchel a Finlay., 2008). Posloupnost organismů podél gradientu kyslíku je zdokumentována pro *Prokaryota* a heterotrofní prvky (Chen et al., 2017; Fenchel a Bernard, 1996). Distribuci diplomem ve Weddellově moři nejvíce ovlivňuje obsah kyslíku. Diplonemy preferují prostředí s nižšími koncentracemi kyslíku. Stejný trend pozorovala i Flegontova et al. (2020). Zjistila že diplomem preferují nízkou až střední koncentraci kyslíku, do 7,5 mg/l, a vyhýbají se oblastem s jeho vyššími koncentracemi. To může být způsobeno toxicitou kyslíku (Fenchel a Finlay, 2008). V anoxických zónách byla druhová bohatost diplomemid nejnížší, ale relativní hojnost diplomemidů nebyla výjimečně nízká (Flegontova et al., 2020).

Teplota oceánu výrazně ovlivňuje biologické procesy mikrobiálních organismů (Šolić et al., 2018). Povrchová teplota je nejsilnějším prediktorem druhového bohatství fytoplanktonu v pozorovaných oblastech (Righetti et al., 2019). Teplota vody také ovlivňuje koncentraci kyslíku v ní. Manasrah et al. (2006) zjistil že mezi teplotou vody a koncentrací

kyslíku je pozitivní vztah, ale když teplota vody stoupne nad 25 °C koncentrace kyslíku se může snížit v důsledku jeho nižší rozpustnosti v teplé mořské vodě. Teplota také ovlivňuje velikost buněk organismů (Atkinson et al., 2003). Na strukturování prokaryotické komunity má význam teplotně řízená selekce. Zdá se však, že na pikoeukaryota nemá teplota výrazný vliv (Logares et al., 2020). Teplota společně s chlorofylem A jsou nejsilnějšími faktory, které ovlivňují složení komunit nálevníků v oceánu (Zhao et al., 2017). Relativní hojnost antarktických diplomem se zvětšuje s rostoucí teplotou vody. V Jaderském moři byly pozorovány dva píky diplomem v závislosti na teplotě, došlo tak k oddělení diplomem z fotické a mesopelagické vrstvy, protože vzorky z mezopelagické vrstvy byly chladnější než ty z fotické vrstvy (Flegontova et al., 2020).

Fluorescence jako proxy koncentrace chlorofylu A, který je součástí buněk fototrofních organismů, vysvětluje 31% variace komunity prokaryot, ale není signifikantní pro pikoeukaryota (Logares et al., 2020). Diverzita planktonních organismů poklesla se zvyšujícím se obsahem chlorofylu A. Nejsilnější korelace je patrná mezi koncentrací chlorofylu A a skupinou *Metazoa* (Ibarbalz et al., 2019). V této práci nebyl pozorován vliv fluorescence na antarktické diplomem. Flegontova et al. (2020) pozorovala negativní závislost mezi relativní hojností diplomem a koncentrací chlorofylu A, ale pozitivní závislost mezi relativní hojností diplomem a fluorescencí. Tyto výsledky naznačují, že diplomem nepreferují výskyt ve fotické zóně.

Hojnost *Pseudo-nitzschia* významně pozitivně koreluje se salinitou. *Pseudo-nitzschia* je druh planktonních rozsivek pozorovaný celosvětově od pobřežních vod po otevřený oceán (Van Meerssche a Pinckney, 2017). Složení bakteriální komunity se postupně mění podél gradientu salinity a rozdíl ve složení komunity významně koreluje s rozdílem v salinitě (Hu et al., 2016). Hu et al. (2016) poprvé ukázala vzorec závislosti složení eukaryotického planktonu na salinitě pomocí molekulárních dat. Flegontova et al. (2020) zjistila, že salinita má vliv na hojnost, druhové bohatství a strukturu komunity diplomem. Diplomem se podle této studie vyhýbají oblastem s vysokou salinitou. Naše výsledky ukazují, že na antarktické diplomem nemá salinita zřejmý vliv. Důvody nejsou zřejmé a k objasnění bude třeba dalších dat a analýz.

Zeměpisná šířka ovlivňuje většinu taxonomických skupin a projevuje se ubývajícím počtem druhů od tropů k pólům (Brayard et al., 2005). Rozsivky nevykazují rozdělení druhové bohatosti podle gradientu zeměpisné šířky (Hildebrand a Azovsky, 2001). Gradient zeměpisné šířky byl u jednobuněčných organismů dlouhou dobu zpochybňován, ale výsledky Ibarbalze et al. (2019) ukazují, že postupný pokles druhové rozmanitosti

je všudypřítomným rysem mořského planktonu. V chladnějších vyšších zeměpisných šířkách je pozorován úbytek relativní hojnosti fototrofních bakterií, zatímco relativní hojnost fototrofních eukaryot, především rozsivek, se zvýšila (Ibarbalz et al., 2019). Nebyl pozorován vliv zeměpisné šířky na relativní hojnost diplomem ve Weddelově moři. Je možné, že se tento vliv v této práci neprojevil kvůli malému rozptylu zeměpisných šířek mezi jednotlivými vzorky. Flegontova et al. (2020) pozorovala podstatné snížení druhového bohatství diplomemid při vysokých zeměpisných šířkách.

Vliv zeměpisné délky se ve středozemním moři projevil nárůstem diverzity tintinnid, skupina nálevníků, od západu k východu (Dolan, 2000). Zeměpisná délka není příliš významnou proměnnou rozlišující fotické a mezopelagické skupiny diplomem (Flegontova et al., 2020). Zeměpisná délka neovlivňuje distribuci relativní hojnosti diplomem ve Weddelově moři.

Druhová bohatost klesá s hloubkou. Místa s největší druhovou bohatostí jsou v hloubce do 100 metrů, kvůli vyšší teplotě a produktivitě (Costello et al., 2017). Ve fotické zóně jsou vysoce diverzifikované a hojné *Alveolata* a *Rhizaria* (de Vargas et al., 2015). V mezopelagické vrstvě se vyskytuje vysoce diverzifikovaná a aktivní komunita virů, bakterií, archeí, prvoků, zooplanktonu a nektonu (Koppelman a Frost, 2008). V bathypelagické vrstvě dominuje pouze několik skupin mikrobiálních eukaryot: *Colodaria*, *Basidiomycota*, *Chrysophyceae*, *Syndiniales* a *Dinophyceae* (Pernice et al., 2015). Relativní hojnost antarktických diplomem je největší v hloubce kolem 1000 m a poté začne klesat. Stejný trend byl pozorován i v Jaderském moři. Může to být způsobeno negativní závislostí druhové bohatosti diplomem na koncentraci chlorofylu A ve vodním sloupci (Flegontova et al., 2020), nebo preferováním větších hloubek, kde se organismy obsahující chlorofyl A vyskytují jen málo.

Vennovy diagramy ukazují, že diverzita antarktických diplomem je větší v afotické zóně. Tento výsledek se dal předpokládat, protože diplomem se vyskytují především v hlubších vrstvách oceánu (Lukeš et al., 2015, Flegontova et al., 2016), což ukazují i výsledky získané v této práci. Z diagramů je také patrné, že v našem datasetu bylo více arktických než antarktických swarmů. Podle Flegontovy et al. (2016) jsou diplomem kosmopolitní bez zjevného biogeografického vzoru, ale Flegontova et al. (2020) pozorovala závislost diplomem na zeměpisné šířce. Z Vennových diagramů se zdá, že arktické a antarktické diplomem si nejsou příliš podobné mezi sebou. Protože počet swarmů sdílených mezi arktickými a antarktickými diplomemami je menší než mezi arktickými a nepolárními nebo mezi antarktickými a nepolárními. Protože Vennovy diagramy

porovnávají komunity pouze na úrovni swarmů, bylo použito NMDS, z jehož výsledků je patrné, že složení antarktických a arktických společenstev diplomem podobné je. NMDS na rozdíl od Vennových diagramů porovnává celé komunity, takže je toto porovnání přesnější. Podobné složení těchto dvou společenstev můžeme vysvětlit modelem disperse (Finlay, 2002). Podle tohoto modelu je hojnost mikrobiálních eukaryot tak velká, že je jejich disperse jen zřídka omezena geografickými překážkami. Model také předpovídá nízký počet globálních druhů a vysokou lokální druhovou bohatost (Finlay, 2002). Nicméně de Vargas et al. (2015) zjistil, že počty planktonních organismů v oceánu jsou podhodnocené a ukázal signifikantní vztah mezi složením eukaryotických komunit a geografickou vzdáleností. Při porovnání dírkonošců (*Foraminifera*) v antarktických a arktických vodách byly nalezeny stejné morfotypy, některé z nich byli dokonce geneticky identické (Finlay, 2002).

Vybrané linie planktonních eukaryot byly rozděleny do skupin a to podle hloubky, ve které se vyskytují, teploty vody a koncentrace kyslíku. Při rozdělení do jednotlivých skupin, byly vždy *Diplonemea* se *Syndiniales* a *Haptophyta* s *Cryptista* ve stejné skupině a hodnota Spearmanova korelačního koeficientu mezi nimi byla $>0,75$, což naznačuje, že spolu vytváří komunitu a že mezi nimi může docházet k nějakým interakcím.

Syndiniales jsou diverzifikovanou parazitickou skupinou běžnou v mořském prostředí (Clarke et al., 2019), Všechny popsané druhy *Syndiniales* zabíjejí své hostitele, což jsou prvoci (*Dinoflagellata*, *Cercozoa*, *Radiolaria*) a *Metazoa* (*Copepoda*, vajíčka ryb) (Guillou et al., 2008). *Diplonemea* jsou jednou z nejdíverzifikovanějších skupin eukaryot v oceánu, jejich životní strategie není známá (Flegontova et al., 2016). *Syndiniales* obývají všechny prozkoumané vrstvy oceánu, od povrchu po sedimenty (Guillou et al., 2008). *Diplonemea* jsou velmi vzácné v povrchových vodách, jejich oblíbeným prostředím je hluboký oceán (Lukeš et al., 2015). Anderson a Harvey (2020) zjistili, že relativní hojnost *Syndiniales* je ovlivněna teplotou, nejvyšší relativní hojnosti dosahují v teplých letních měsících. Z této práce vyplývá, že obě tyto skupiny mají největší relativní hojnost kolem 1000 m, vyhýbají se nízkým teplotám vody a vysokým koncentracím kyslíku. Z dat získaných v této práci nemůžeme říct zda a případně k jakým interakcím mezi těmito skupinami dochází. Lima-Mendez et al. (2015) na základě dat z expedice Tara Oceans odhalila spoustu potenciálních interakcí mezi *Syndiniales* a jejich hostiteli (nejvíce se zooplanktonem), ale u diplomem bylo interakcí relativně málo a byly nejednoznačné.

Haptophyta jsou velmi diverzifikovanou a ekologicky důležitou skupinou planktonních společenstev fotické zóny. Mají doplňkový fotosyntetický pigment, který se nachází pouze v buňkách skupiny *Haptophyta*. Jejich ekologický a evoluční úspěch,

pravděpodobně založený na mixotrofii, mohl významně ovlivnit uhlíkový cyklus v oceánu (Liu et al., 2009). *Cryptista* (skrytěnky) jsou jednobuněční eukaryotičtí bičíkovci vyskytující se ve slané i sladké vodě. Skrytěnky jsou fotosyntetické druhy (Dunstan et al., 2005). Výsledky této práce ukazují, že *Haptophyta* a *Cryptista* patří podle závislosti jejich relativních hojností na hloubce do skupiny řas, jejichž hojnost klesá s hloubkou. Na základě závislosti relativní hojnosti na teplotě vody a koncentraci kyslíku, *Haptophyta* i *Cryptista* preferují nižší teploty vody a vyšší koncentrace kyslíku.

Grafy závislosti relativní hojnosti na vzdálenosti ode dna oddělily skupiny planktonních Eukaryot vyskytujících se převážně na oceánském dně nebo těsně nad ním. Jsou to skupiny *Cercozoa*, *Ciliophora*, *Chrysista* a *Polycystinea*. Je možné, že u skupin *Cercozoa* a *Polycystinea* může být tento výsledek způsoben tím, že některé mají schránky, které vydrží neporušené i když už nejsou živé a klesnou na mořské dno. Na oceánském dně je velký objem zachovaných schránek skupiny *Radiolaria*, kam patří i *Polycystinea* (Suzuki a Oba, 2015). Dvě třídy skupiny *Cercozoa* také vytváří schránky: *Thecofilosea* a *Imbricatea*. Jejich schránky jsou tuhé a trvalé a jsou používány jako bioindikátory v paleontologických studiích (Dumacka a Siemensma, 2020).

6. Závěr

Z této práce vyplývá, že planktonní společenstva ve Weddelově moři jsou ovlivněna zejména hloubkou, teplotou vody a koncentrací kyslíku. Antarktické diplonemy jsou nejvíce ovlivněny obsahem kyslíku, přičemž preferují jeho nižší koncentrace. Na jejich distribuci nemá zřejmý vliv fluorescence, salinita, zeměpisná šířka ani délka.

Při porovnání arktických a antarktických diplomem jsme zjistili, že na základě NMDS jsou si tyto komunity mezi sebou navzájem podobné i přes vzdálenost, která je odděluje.

Eukaryota byla v závislosti relativní hojnosti na hloubce rozdělena do šesti skupin a na základě teploty a koncentrace kyslíku do čtyř skupin. Díky tomuto rozdělení jsme zjistili, že *Diplonemea* se *Syndiniales* a *Haptyphyta* s *Cryptista* mají podobné ekologické nároky a mohou být funkčně provázané. Povaha jejich potenciální interakce je však neznámá. Vzdálenost ode dna oddělila skupiny planktonních Eukaryot vyskytujících se převážně na oceánském dně nebo těsně nad ním.

7. Seznam použité literatury

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Scoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana i Molera, R., Mitchell, E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella i Cortes, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., Zhang, Q. (2019) Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4-119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>.

Anderson, S.R., Harvey, E.L. (2020) Temporal Variability and Ecological Interactions of Parasitic Marine Syndiniales in Coastal Protist Communities. *mSphere* 5:e00209-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00209-20>.

Arístegui, J., Gasol, J.M., Duarte, C.M., Herndl, G.J. (2009) Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnol. Oceanogr.* 54: 1501-1529.

Atkinson, D., Ciotti, B.J., and Montagnes, D.J.S. (2003) Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5%.C. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 2605–2611. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2538>. Šolić et al., 2018

Battarbee, R.W., Jones, V.J., Flower, R.J., Cameron, N.G., Bennion, H., Carvalho, L., Juggins, S., (2002) Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. *Developments in Paleoenvironmental Research*: 155-202. https://doi.org/10.1007/0-306-47668-1_8.

Bigg, G.R., Jickells, T.D., Liss, P.S., Osborn, T.J. (2003) REVIEW THE ROLE OF THE OCEANS IN CLIMATE. *Int. J. Climatol.* 23: 1127–1159. DOI: 10.1002/joc.926.

Bork, P., Bowler, C., de Vargas, C., Karsenti, E., Wincker, P. (2015) Tara Oceans studies plankton at planetary scale. *Science* 348: 873-875. DOI: 10.1126/science.aac5605.

Brayard, A., Escarguel, G., and Bucher, H. (2005) Latitudinal gradient of taxonomic richness: combined outcome of temperature and geographic mid-domains effects? *J Zoolog Syst Evol Res* 43: 178–188. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2005.00311.x>.

Burki, F., Keeling, P.J. (2014) Rhizaria. *Current Biology* 24: R103-R107. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.025>.

- Capblancq, T., Luu, K., Blum, M.G.B., Bazin, E. (2018) Evaluation of redundancy analysis to identify signatures of local adaptation. *Molecular Ecology Resources* 18: 1223-1233. doi: 10.1111/1755-0998.12906
- Clarke, L.J., Bestley, S., Bisset, A., Deagle, B.E. (2019) A globally distributed Syndiniales parasite dominates the Southern Ocean micro-eukaryote community near the sea-ice edge. *The ISME Journal* 13:734–737. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0306-7>.
- Costello, M.J., and Chaudhary, C. (2017) Marine biodiversity, biogeography, Deep-Sea gradients, and conservation. *Curr Biol* 27: R511–R527. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.04.060>.
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., et al. (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* 348: 1261605. <https://doi.org/10.1126/science.1261605>.
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., de Vere, N., Pfender, M.E., Bernatchez, L. (2017) Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 26: 5872-5895. doi: 10.1111/mec.14350.
- Diehl, S. (2002). Phytoplankton, light, and nutrients in a gradient of mixing depths. *Theor. Ecol.* 83, 386–398. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[0386:PLANIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[0386:PLANIA]2.0.CO;2).
- Dolan, J.R. (2000) Tintinnid ciliate diversity in the Mediterranean Sea: longitudinal patterns related to water column structure in late spring-early summer. *Aquat Microb Ecol* 22: 69-78.
- Dumacka, K., Siemensma, F. (2020) Shell Colour in Cercozoa; a Simple Trait to Distinguish Thecofilosea from Imbricatea? *Protist* 171: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2020.125718>.
- Dunstan, G.A., Brown, M.R., Volkman, J.K. (2005) Cryptophyceae and rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. *Phytochemistry* 66: 2557–2570. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.015>.
- Edgcomb, V.P. (2016) Marine protist associations and environmental impacts across trophic levels in the twilight zone and below. *Curr Opin Microbiol* 31: 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.001>.
- Fenchel, T. (1988) MARINE PLANKTON FOOD CHAINS. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 19-38. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.19.110188.000315>.

- Fenchel, T., and Bernard, C. (1996) Behavioural responses in oxygen gradients of ciliates from microbial mats. *Eur J Protistol* 32: 55–63. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80039-3](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80039-3).
- Fenchel, T., and Finlay, B.J. (2008) Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biol Rev* 83: 553–569. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00054.x>.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4: 423-425. doi:10.1098/rsbl.2008.0111.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281: 237-240. DOI: 10.1126/science.281.5374.237.
- Finlay, B.J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061–1063. DOI: 10.1126/science.1070710.
- Flegontova, O., Flegontov, P. Castañeda Londoño, P.A., Walczowski, W., Šantić, D., Edgcomb, V.P., Lukeš, J., Horák, A. (2020) Environmental determinants of the distribution of planktonic diplomonads and kinetoplastids in the oceans. *Environmental Microbiology* 22: 4014-4031. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15190>.
- Flegontova, O., Flegontov, P., Malviya, S., Audic, S., Wincker, P., de Vargas, C., Bowler, C., Lukeš, J., Horák, A. (2016) Extreme diversity of diplomonad eukaryotes in the ocean. *Curr Biol* 26: 3060–3065. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.031>.
- Fuhrman, J.A., Griffith, J.F., Schwalbach, M.S. (2002) Prokaryotic and viral diversity patterns in marine plankton. *Ecological Research* 17: 183-194.
- Gauthier, T.D. (2001) Detecting Trends Using Spearman's Rank Correlation Coefficient. *Environmental Forensics* 2: 359-362. DOI: 10.1080/713848278.
- Gawryluk, R.M.R., del Campo, J., Okamoto, N., Strasser, J.F.H., Lukeš, J., Richards, T.A., et al. (2016) Morphological identification and single-cell genomics of marine diplomonads. *Curr Biol* 26: 3053–3059. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.013>.
- Gimmler, A., Korn, R., De Vargas, C., Audic, S., and Stoeck, T. (2016) The Tara oceans voyage reveals global diversity and distribution patterns of marine planktonic ciliates. *Sci Rep* 6: 33555. <https://doi.org/10.1038/srep33555>.

- Gooday, A.J., Bernhard, J.M., Levin, L.A., and Suhr, S.B. (2000) Foraminifera in the Arabian Sea oxygen minimum zone and other oxygen-deficient settings: taxonomic composition, diversity, and relation to metazoan faunas. *DeepSea Res Part 2 Top Stud Oceanogr* 47: 25–54. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(99\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(99)00099-5).
- Guillou, L., Viprey, M., Chambouvet, A., Welsh, R.M., Massana, R., Scanlan, D.J., Worden, A.Z. (2008) Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Environmental Microbiology* 10: 3349–3365. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01731.x.
- Guisan, A., Edwards Jr, T.C. Hastie, T. (2002) Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: setting the scene. *Ecological Modelling* 157: 89-100. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(02\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(02)00204-1).
- Hildebrand, H., Azovsky, A.I. (2001) Body size determines the strength of the latitudinal diversity gradient. *Ecography* 24: 251-256.
- Hu, Y.O.O., Karlson, B., Charvet, S., Andersson, A.F. (2016) Diversity of Pico- to Mesoplankton along the 2000 km Salinity Gradient of the Baltic Sea. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-17. doi: 10.3389/fmicb.2016.00679.
- Chen, J., Hanke, A., Tegetmeyer, H.E., Kattelman, I., Sharma, R., Hamann, E., et al. (2017) Impacts of chemical gradients on microbial community structure. *ISME J* 11: 920–931. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.175>.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., von Dassov, P., Vanormelingen, P., Gillard, J., Inzé, D., Sabbe, K., Vyverman, W. (2008) In search of new tractable diatoms for experimental biology. *BioEssays* 30:692-702. <https://doi.org/10.1002/bies.20773>.
- Ibarbalz, F.M., Henry, N., Brandao, M.C., Martini, S., Busseni, G., Byrne, H., et al. (2019) Global trends in marine plankton diversity across kingdoms of life. *Cell* 179:1084–1097. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.008>.
- Jeong, H.J. (1999) The Ecological Roles of Heterotrophic Dinoflagellates in Marine Planktonic Community. *Eukaryot. Microbiol.* 46: 390-396.
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Kim, J.S., Seong, K.A., Kang, N.S., Kim, T.H. (2010) Growth, Feeding and Ecological Roles of the Mixotrophic and Heterotrophic Dinoflagellates in Marine Planktonic Food Webs. *Ocean Sci. J.* 45: 65-91. DOI 10.1007/s12601-010-0007-2.

- Kolisko, M., Flegontova, O., Karnkowska, A., Lax, G., Maritz, J.M., Pánek, T., Táborský, P., Carlton, J.M., Čepička, I., Horák, A., Lukeš, J., Simpson, A.G.B., Tai, V. (2020) EukRef-Excavates: Seven curated SSU ribosomal RNA gene databases. *DATABASE*: 1-31.
- Koppelman, R., Frost, J. (2008) The ecological role of zooplankton in the twilight and dark zones of the ocean. In: Mertens, L.P. (Ed.), *Biological Oceanography Research Trends*. Nova Science Publishers, Inc., NY, pp.67–130.
- Lara, E., Moreira, D., Vereshchaka, A., and López-García, P. (2009) Pan-oceanic distribution of new highly diverse clades of deep-sea diplomonads. *Environ Microbiol* 11: 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01737.x>.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S., Ignacio-Espinosa, J.C., Roux, S., Vincent, F., Bittner, L., Darzi, Y., Wang, J., Audic, S., Berline, L., Bontempi, G., Cabello, A.M., Coppola, L., Cornejo-Castillo, F.M., d'Ovidio, F., De Meester, L., Ferrera, I., Garet-Delmas, M.-J., Guidi, L., Lara, E., Pesant, S., Royo-Llonch, M., Salazar, G., Sánchez, P., Sebastian, M., Souffreau, C., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Kandels-Lewis, S., Tara Oceans coordinators, Gorsky, G., Not, F., Ogata, H., Speich, S., Stemmann, L., Weissenbach, J., Wincker, P., Acinas, S.G., Sunagawa, S., Bork, P., Sullivan, M.B., Karsenti, E., Bowler, C., de Vargas, C., Raes, J. (2015) Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science* 348: 1-9. DOI:10.1126/science.1262073.
- Lin, Y.-C., Campbell, T., Chung, C.-C., Gong, G.-C., Chiang, K.-P., Worden, A.Z. (2012) Distribution Patterns and Phylogeny of Marine Stramenopiles in the North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*: 3387-3399. DOI: 10.1128/AEM.06952-11.
- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., Not, F., de Vargas, C. (2009) Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans. *PNAS* 106: 12803-12808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905841106>.
- Logares, R., Deutschmann, I.M., Junger, P.C., Giner, C.R., Krabberød, A.K., Schmidt, T.S.B., et al. (2020) Disentangling the mechanisms shaping the surface ocean microbiota. *Microbiome* 8: 55. <https://doi.org/10.21203/rs.2.17228/v1>.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., Moreira, D. (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409: 603-607. <https://doi.org/10.1038/35054537>.

- Lukeš, J., Flegontova, O., Horák, A. (2015) Diplonemids. *Current Biology* 25: R702-R704.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M. (2015) Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3:e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>
- Manasrah, R., Raheed, M., Badran, M.I. (2006) Relationships between water temperature, nutrients and dissolved oxygen in the northern Gulf of Aqaba, Red Sea. *Oceanologia* 48: 237-253.
- Marshall, S.M., Orr, A.P. (1928) The Photosynthesis of Diatoms Cultures in the Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*: 321-360.
- Massana, R., Castresana, J., Balague', V., Guillou, L., Romari, K., Groisillier, A., Valentin, K., Pedrós-Alio', C. (2004) Phylogenetic and Ecological Analysis of Novel Marine Stramenopiles. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 70: 3528-3534. DOI: 10.1128/AEM.70.6.3528–3534.2004.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *Plos Biology* 9: e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.
- Mukherjee, I., Hodoki, Y., Okazaki, Y., Fujinaga, S., Ohbayashi, K., Nakano, S. (2019) Widespread Dominance of Kinetoplastids and Unexpected Presence of Diplonemids in Deep Freshwater Lakes. *Front. Microbiol.*: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02375>.
- Mukherjee, I., Salcher, M.M., Andrei, A.S., Kavagutti, V.S., Shabarova, T., Grujčić, V., Haber, M., Layoun, P., Hodoki, Y., Nakano, S., Šimek, K., Ghai, R. (2020) A freshwater radiation of diplonemids. *Environmental Microbiology*: 1-34. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15209>.
- Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., and Edwards, K.J. (2011). Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 75, 361–422. DOI: 10.1128/MMBR.00039-10.
- Palmer, M.W. (2008) Ordination Methods - an overview. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.540.1194&rep=rep1&type=pdf> :1-27.

- Pernice, M.C., Giner, C.R., Logares, R., Perera-Bel, J., Acinas, S.G., Duarte, C.M., et al. (2015) Large variability of bathypelagic microbial eukaryotic communities across the world's oceans. *ISME J* 10: 1–14. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.170>.
- Pesant, S., Not, F., Picheral, M., Kandels-Lewis, S., Le Bescot, N., Gorsky, G., Iudicone, D., Karsenti, E., Speich, S., Troublé, R., Dimier, C., Searson, S. & Tara Oceans Consortium Coordinators (2015) Open science resources for the discovery and analysis of Tara Oceans data. *Scientific Data*:1-16. DOI: 10.1038/sdata.2015.23.
- Righetti, D., Vogt, M., Gruber, N., Psomas, A., and Zimmermann, N.E. (2019) Global pattern of phytoplankton diversity driven by temperature and environmental variability. *Sci Adv* 5: eaau6253.
- Robinson, C., Steinberg, D. K., Anderson, T. R., Arístegui, J., Carlson, C. A., Frost, J. R., Ghiglione, J-F., Herna'ndez-Leo'n, S., Jackson, G. A., Koppelman, R., Que'guiner, B., Ragueneau, O., Rassoulzadegan, F., Robinson, B. H., Tamburini, C., Tanaka, T., Wishner, K. F., Zhang, J. (2010) Mesopelagic zone ecology and biogeochemistry – a synthesis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 57: 1504-1518. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.02.018>.
- Ryan, C.N., Thomas, M.K., Litchman, E. (2017) The effects of phosphorus and temperature on the competitive success of an invasive cyanobacterium. *Aquatic Ecology* 51: 463-472. DOI 10.1007/s10452-017-9629-0.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Sigman, D.M., Hain, M (2012) The Biological Productivity of the Ocean. *Nature Education Knowledge* 3: 1-16.
- Suzuki, N., Oba, M. (2015) Oldest Fossil Records of Marine Protists and the Geologic History Toward the Establishment of the Modern-Type Marine Protist World. *Marine Protists*: 359-394. DOI 10.1007/978-4-431-55130-0_15.
- Sze, Y., Miranda, L.N., Sin, T.M., Huang, D. (2018) Characterising planktonic dinoflagellate diversity in Singapore using DNA metabarcoding. *Metabarcoding & Metagenomics* 2: 1-14. DOI 10.3897/mbmg.2.25136.

- Šolić, M., Šantić, D., Šestanović, S., Bojanić, N., Ordulj, M., Jozić, S., Vrdoljak, A. (2018) The effect of temperature increase on microbial carbon fluxes in the Adriatic Sea: an experimental approach. *FEMS Microbiol Ecol* 94: fiy169.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E. (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21: 2045-2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>.
- Tashyreva, D., Prokopchuk, G., Votýpka, J., Yabuki, A., Horák, A., Lukeš, J. (2018) Life Cycle, Ultrastructure, and Phylogeny of New Diplonemids and Their Endosymbiotic Bacteria. *mBio* 9: e02447-17. DOI: 10.1128/mBio.02447-17.
- Tashyreva, D., Prokopchuk, G., Yabuki, A., Kaur, B., Faktorová, D., Votýpka, J., et al. (2018) Phylogeny and morphology of new diplomonads from Japan. *Protist* 169: 158–179. <https://doi.org/10.1016/J.PROTIS.2018.02.001>.
- Turner, J.T. (2004) The Importance of Small Planktonic Copepods and Their Roles in Pelagic Marine Food Webs. *Zoological Studies* 43: 255-266.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Moller, P.R., Willerslev, E., Dejean, T. (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25: 929-942. doi: 10.1111/mec.13428.
- Van Meerssche, E., Pinckney, J.L. (2017) The influence of salinity in the domoic acid effect on estuarine phytoplankton communities. *Harmful Algae* 69: 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.10.003>.
- Yi, Z., Berney, C., Hartikainen, H., Mahamdallie, S., Gardner, M., Boenigk, J., Cavalier-Smith, T., Bass, D. (2017) High-throughput sequencing of microbial eukaryotes in Lake Baikal reveals ecologically differentiated communities and novel evolutionary radiations. *FEMS Microbiology Ecology* 93: 1-19. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix073>.
- Zhao, F., Filker, S., Xu, K., Huang, P., and Zheng, S. (2017) Patterns and drivers of vertical distribution of the ciliate community from the surface to the abyssopelagic zone in the Western Pacific Ocean. *Front Microbiol* 8: 2559. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02559>.