

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



DNA barkóding rozsivek a jeho implikace v taxonomii

DNA barcoding of diatoms and its implication in taxonomy

Diplomová práce

Bc. Leona Vaculíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Hydrobiologie

Olomouc 2020

Vedoucí práce: prof. RNDr. Aloisie Poulíčková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Aloisie Pouličkové, CSc. a s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 30. 7. 2020

.....

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji paní prof. RNDr. Aloisii Pouličkové, CSc. za obětavou pomoc, cenné rady a odborné vedení této práce. Upřímný dík také patří Mgr. Janu Kollárovi, který mě odborně provázel po celou dobu tvorby této práce a ochotně poskytoval rady a své zkušenosti. Také děkuji Bc. Tereze Reimerové za poskytnutí vzorků, které jsem mohla použít k dalším analýzám. V neposlední řadě děkuji rodičům za jejich podporu po celou dobu studia a manželovi za povzbudivá slova, nadhled a podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Leona Vaculíková

Název práce: DNA barkóding rozsivek a jeho implikace v taxonomii

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědná fakulta

Vedoucí práce: prof. RNDr. Aloisie Pouličková, CSc.

Rok obhajoby: 2020

ABSTRAKT

DNA barkóding je molekulární metoda využívající krátkého úseku DNA, tzv. barkód markeru, k identifikaci a determinaci organismů. Rozdíly a fylogenetické pozice DNA sekvencí získaných touto metodou je pak možné studovat i z hlediska taxonomického. Cíle této práce jsou především srovnání morfologické a molekulární determinace nově získaných kmenů rozsivek, obohacení DNA barkódové databáze o nová data, dále pak formulace taxonomických hypotéz na základě srovnání rozdílů a fylogenetických pozic DNA sekvencí, morfologie, ekologie a geografie. Podařilo se mi úspěšně osequencovat 32 kmenů. Výsledky morfologické a molekulární determinace se nejčastěji na druhové úrovni shodovaly u sekvencí rozsivek řadících se mezi druhové komplexy. Do barkódové databáze BOLD bylo celkem nahráno 57 sekvencí (od barkód markerů *rbcL*, LSU rDNA a *COX1*) ke 32 kmenům, které byly dále opatřeny ekologickými a geografickými daty a fotografiemi. K detailnímu studiu byl zvolen zejména fylogram založený na *rbcL*, protože byl tento úsek nejdelší a u rozsivek nejpočetněji zastoupen v databázích. Na základě studia morfologie, molekulárních, ekologických, geografických a fylogenetických dat byly vysloveny hypotézy, které si v budoucnu zaslouží podrobnější studium. Jde zejména o odhalení (např. u *Lemnicola hungarica*) či potvrzení (např. u *Navicula cryptocephala*) potenciální přítomnosti kryptické diverzity, odhalení potenciálně nových druhů (např. v rodě *Pinnularia*) či odhalení možné afylie taxonů (např. u rodů *Psammothidium* a *Eolimna*).

Klíčová slova: barkód marker, *COXI*, determinace druhů, epifyton, epilíton, identifikace druhů, kryptická druhová diverzita, LSU rDNA, morfologie, *rbcL*, taxonomické hypotézy

Počet stran: 73

Počet příloh: 6

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

First name and surname of the author: Leona Vaculíková

Name of the thesis: DNA barcoding of diatoms and its implication in taxonomy

Type of thesis: Master

Workplace: Department of Botany, Faculty of Science

Thesis supervisor: prof. RNDr. Aloisie Pouličková, CSc.

Year of defence: 2020

ABSTRACT

DNA barcoding is a molecular technique using short fragments of DNA for unambiguous identification of organisms. However, these short fragments called DNA barcodes (e.g., differences between them or their phylogenetic position) may be useful not only to identification itself but also to taxonomy. The aims of this thesis are (1) establishing the clonal diatom strains, (2) obtaining their DNA barcode markers, (3) their taxonomic identification based on both DNA and morphology (including their comparison), (4) uploading all the newly generated data to the Barcode of Life Database, (5) inference of phylogenetic trees, and (6) using the differences in DNA sequences, phylogenetic positions and all other available data to formulate taxonomic hypotheses. DNA sequences (*rbcL*, *COXI* and/or LSU rDNA) were obtained from 32 diatom strains. Congruence between the morphological and DNA-based identifications was mostly at the level of genus. At the level of species, they were congruent mostly in strains belonging to the (pseudo)cryptic species complexes. However, the cause is most likely not biological but rather the difficulties of morphological identifications and incompleteness of DNA databases with respect to diatoms. In total, 57 DNA sequences of 32 new diatom strains were uploaded to the Barcode of Life Database, along with the photographs, geographic, environmental and taxonomic data. Newly generated sequences were added to the datasets used for inference of the most exhaustive diatom molecular phylogenies to date to investigate the phylogenetic positions of the newly established strains. To this end, the Maximum

Likelihood phylograms based on *rbcL*, *COXI* and LSU rDNA were inferred. Concerning the phylogenetic positions, the phylogram based on the complete *rbcL* was considered the most informative and reliable because the alignment was the longest (1425 bp), the most exhaustive (865 sequences), and the most conservative (thus probably reflecting deep lineage divergences more accurately) relative to the other two genetic markers. The phylogenetic positions, DNA differences and all other data were used to formulate taxonomic hypotheses suggesting (e.g. in the case of *Lemnicola hungarica*) or confirming (e.g., in *Navicula cryptocephala*) presence of (pseudo)cryptic species diversity, presence of a new species (e.g., within genus *Pinnularia*) or aphyly of some taxa (e.g., in genera *Psammothidium* and *Eolimna*).

Keywords: barcode marker, *COXI*, cryptic species diversity, epiphyton, epilithon, LSU rDNA, morphology, *rbcL*, species identification, taxonomic hypotheses

Number of pages: 73

Number of appendices: 6

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍLE PRÁCE	13
3	METODIKA	14
3.1	PŮVOD VZORKŮ.....	14
3.2	IZOLACE A KULTIVACE KMENŮ.....	14
3.3	MORFOLOGICKÁ DETERMINACE	15
3.4	IZOLACE, AMPLIFIKACE A SEKVENCOVÁNÍ DNA.....	15
3.4.1	Izolace DNA.....	15
3.4.2	Polymerázová řetězová reakce	16
3.4.3	Gelová elektroforéza	18
3.4.4	Purifikace DNA a sekvencování	19
3.5	MOLEKULÁRNÍ DETERMINACE A DNA BARKÓDING	19
3.6	MOLEKULÁRNĚ-FYLOGENETICKÉ ANALÝZY	19
3.6.1	Příprava DNA alignmentů.....	19
3.6.2	Eliminace hypervariabilních úseků	19
3.6.3	Výběr modelů nukleotidové substituce	20
3.6.4	Konstrukce fylogenetických stromů	20
3.7	TAXONOMICKÉ ROZLIŠENÍ BARCODE MARKERŮ	21
4	VÝSLEDKY	22
4.1	KMENY A JEJICH TAXONOMICKÁ DETERMINACE	22
4.2	BUDOVÁNÍ DNA BÁRKÓDOVÉ DATABÁZE	27
4.3	FYLOGENETICKÁ POZICE NOVÝCH KMENŮ	30
4.3	TAXONOMICKÉ ROZLIŠENÍ BARKÓD MARKERŮ	39
5	DISKUZE	42
5.1	ZÍSKÁVÁNÍ KMENŮ A DNA	42
5.1.1	Sběr přírodních vzorků.....	42
5.1.2	Úspěšnost procesu od kultivace až po sekvencování	42
5.2	DETERMINACE KMENŮ	44
5.2.1	Morfologická determinace	44
5.2.2	Molekulární determinace	45
5.2.3	Srovnání morfologické a molekulární determinace	46
5.3	FYLOGENETICKÁ POZICE A TAXONOMICKÉ HYPOTÉZY	46
6	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
	SEZNAM PŘÍLOH	67

1 ÚVOD

Rozsivky jsou jednobuněčné fotosyntetizující organismy, které hrají klíčovou roli ve vodních ekosystémech (Round 1981). Řadí se mezi hnědé řasy a spadají do superskupiny SAR, skupiny Stramenopila. Jsou pokládány za nejpočetnější skupinu řas. Odhaduje se, že existuje 30 000 až 200 000 druhů rozsivek (Mann & Droop 1996, Mann & Vanormelingen 2013). Charakteristickým znakem rozsivek je křemičitá schránka, tzv. frustula, kterou vytváří z molekul oxidu křemičitého z okolního prostředí.

Jsou druhově nejbohatší skupinou řas (Mann & Vanormelingen 2013) a jako skupina jsou adaptovány na širokou škálu environmentálních podmínek. I proto se používají při biomonitoringu k hodnocení kvality povrchových vod (Kelly et al. 1998) i v rámci směrnice Evropské unie (The Water Framework Directive 2000/60/EC). Tradičním přístupem k identifikaci a determinaci rozsivek je studium morfologických znaků frustuly. Identifikace i determinace na základě morfologie však vyžaduje hluboké znalosti, zkušenosti a jsou časově náročné. S nástupem metod molekulární biologie se však morfologické determinační metody začaly kombinovat s metodami, které jsou založeny na studiu sekvencí nukleových kyselin a aminokyselin.

Z taxonomického hlediska je jednou z nejvýznamnějších molekulárních metod DNA barkóding. Koncept DNA barkódingu byl poprvé představen v roce 2003 (Hebert et al. 2003a), u rozsivek pak v roce 2007 (Evans et al. 2007). Principem DNA barkódingu je využití krátkého úseku DNA, tzv. barkód markeru, k determinaci jedince do druhu. Protože je DNA barkóding od počátku vyvíjen k rutinnímu určování druhů, kdekoliv je to zapotřebí (např. základní i aplikovaný výzkum, ochrana příroda, biotechnologie, kvalitativní i kvantitativní kontrola produktů potravinářského, farmaceutického a kosmetického průmyslu), musí barkód marker splňovat tři základní kritéria, která jsou v anglické literatuře označována jako (1) *universality*, (2) *practicality* a (3) *resolution*. To znamená, že (1) barkódový marker musí být amplifikovatelný s využitím standardního primerového páru u co nejširší skupiny organismů (Mann et al. 2010; Zimmermann et al. 2011), (2) lze jej osekvenovat pouze jedním čtením, což znamená nízké časové i finanční náklady a (3) pro determinaci samotnou je klíčová rozlišovací schopnost na druhovou úroveň (Hebert et al. 2003; Moritz & Cicero 2004). Pro efektivní využití DNA barkódingu jako rutinní determinační metody je však nezbytná tzv. barkódová databáze (též DNA barkódová knihovna), se kterou bude možné získané sekvence porovnat a zjistit, o jaké organismy se

jedná. Za předpokladu kvalitně vybudované barcode databáze podává DNA barkóding ve většině případů jednoznačnou informaci, která pak může usnadnit dialog diatomologů týkající se nejen otázek taxonomie a evoluce, ale i ekologie, biogeografie a biomonitoringu.

Velkou výhodou DNA barkódingu jako determinační metody je rozlišení tzv. kryptických druhů rozsivek. Za kryptické se označují ty druhy, které dle morfologie nelze rozlišit (tj. jsou nerozlišitelné při aplikaci typologického druhového konceptu; např. Cronquist 1978), ale přesto jsou odděleny vnitřní reprodukční bariérou a/nebo jsou geneticky odlišné (tj. splňují kritéria samostatného druhu dle genetického, fylogenetického, nebo biologického druhového konceptu; např. Mayr 1947, Wheeler & Meier 2000). Takové druhy pak tvoří tzv. druhové komplexy. Většinou se jedná o běžné, rozšířené, euryvalentní taxony (Pouličková et al. 2008b, Schlick-Steiner et al. 2007).

Již klasickým příkladem kryptické diverzity u rozsivek je se svými 50 morfotypy *Sellaphora pupula* agg. (Mann et al. 2008). Některé z morfotypů skutečně vykazují odlišné ekologické nároky vzhledem k trofii (Pouličková et al. 2008). Druhovým komplexem je pak také *Achnantheidium minutissimum* agg., který je považován za jeden z nejčastějších druhů rozsivek na světě, a to ve všech typech vodních habitatů (Potapova & Hamilton 2007, Kollár et al. 2015). Dalšími příklady druhových komplexů je pak *Pinnularia borealis* agg. (Pinseel et al. 2019), *Pinnularia subgibba* agg. (Pouličková et al. 2018), *Nitzschia palea* agg. (Trobajo et al. 2010) či *Eunotia bilunaris* agg. (Vanormelingen et al. 2015). Skutečná frekvence výskytu kryptické druhové diverzity je zatím neznámá, ale bylo ku příkladu zjištěno, že v průměru přibližně 65 % (v závislosti na substrátu 25 až 90 %) epifytických rozsivkových společenstev českých lotických a lentických vod tvoří právě komplexy kryptických druhů (Kollár et al. 2015).

V Evropě se k hodnocení čistoty vod v 74 % využívají biondikační metody, v nichž se organismy určují až na druhovou úroveň (Birk et al. 2012). Rozlišení kryptických druhů tvořících druhové komplexy tak může významně zvýšit senzitivitu těchto metod (Pouličková et al. 2017), jedná-li se o druhy s diverzifikovanou ekologií (Pouličková et al. 2008b). Naopak jejich ignorace může vést k výsledkům zavádějícím (Rimet & Bouchez 2012b).

Kontroverzním tématem se mezi taxonomy s různým předmětem zkoumání stalo použití DNA barkódingu jako klasifikační metody (např. Will & Rubinoff 2004). To znamená, že metoda DNA barkóding je využívána nejen k determinaci jedince, ale své místo nachází také v taxonomii při objevování a popisu nových druhů (Hebert & Gregory 2005). Taková idea

byla vyslovena již v první publikaci zabývající se DNA barkódingem (Hebert et al. 2003a). Hebert a Gregory (2005) však jasně upozorňují, že DNA barkód sám o sobě nemusí k popisu druhu stačit, je pouze jedním z možných nástrojů.

Vědci obhajující potenciální užitečnost DNA barkódingu v taxonomii argumentují tím, že kromě morfologických, ekologických, geografických a dalších dat je pro popis druhu užitečná i znalost fylogeneze. A právě ta může být založena i na datech získaných při DNA barkódingu. Dalším argumentem jsou i samotná kritéria popisu nového taxonu (v případě DNA barkódingu obvykle druhu) v rámci přirozené (tj. evoluční historii odrážející) klasifikace organismů. Protože s sebou takto nově popsany taxon (obvykle) implicitně nese i informaci o fylogenetické příbuznosti (a to minimálně o příbuznosti jemu podřízených taxonů), měl by podléhat stejným principům, jaké jsou aplikovány při budování přirozené klasifikace, tj. mělo by se jednat o taxon monofyletický a definovaný synapomorfii. A právě takovou definující synapomorfii se teoreticky může stát i DNA barkód, a to samozřejmě i přesto, že to není jeho primárním účelem (Kollár 2020).

2 CÍLE PRÁCE

Diplomová práce navazuje na teoretickou i praktickou přípravu v práci bakalářské (Eichlerová 2018). Získané klonové kultury rozsivek byly podrobeny molekulárním analýzám, získané DNA barkódové sekvence (spolu s veškerými ostatními nově získanými daty, např. morfologickými, geografickými a environmentálními) nahrány do databáze Barcode of Life (boldsystems.org) a dále za účelem formulace taxonomických hypotéz podrobeny fylogenetickým analýzám. Celý proces byl rozdělen do následujících fází:

1. Izolace a tvorba unialgálních kultur.
2. Izolace, amplifikace a sekvencování DNA.
3. Taxonomická determinace kmenů na základě morfologie a DNA.
4. Obohacení DNA barkódové databáze o všechna nově získaná data.
5. Konstrukce molekulárně-fylogenetických stromů.
6. Formulace taxonomických hypotéz.

3 METODIKA

3.1 Původ vzorků

Přírodní vzorky byly odebírány v letech 2017–2018. Vzorky ze sezóny roku 2017 jsem odebírala z epilithonu zatopených lomů nacházejících se na Vysočině (Častotice, Kamenná, Kojatín, Pocoucov, Rudíkov) a jednorázově také ze dvou lokalit na Olomoucku (Výkleky, Nová Ves). Vzorky nárůstů jsem odebírala jak z přírodních (ponořené kameny), tak umělých (mikroskopovací podložní skla) substrátů. Detailní popis těchto dvou způsobů sběru je uveden v mé bakalářské práci (Eichlerová 2018, str. 28).

Vzorky z roku 2018 odebírala Bc. Tereza Reimerová v rámci bakalářské práce (Reimerová 2019). Jednalo se o nárosty na přírodních rostlinných i umělých substrátech. Detailní popis metod je uveden v bakalářské práci (Reimerová 2019, str. 44).

Z každého odebraného přírodního vzorku byl vytvořen trvalý preparát, tzv. voucher. Detailní popis jsem uvedla ve své bakalářské práci (Eichlerová 2018). Přehled lokalit se základní charakteristikou lokalit uvádím v tabulce v Příloze 1. Seznam vyhotovených voucherů z přírodních vzorků uvádím v tabulce v Příloze 2. Kód voucheru se skládá ze zkratky lokality, data odběru a iniciál sběratele (LE či LEV = Leona Vaculíková, roz. Eichlerová, TR = Tereza Reimerová).

3.2 Izolace a kultivace kmenů

Nativní přírodní vzorky jsem zpracovávala druhý den po odebrání z lokality. Přírodní vzorky byly inokulovány bakteriologickým ředícím roztěrem v aseptickém prostředí ve flow boxu na agarové plotny (Petriho misky o průměru 10 cm) s WC médiem (Guillard & Lorenzen 1972). Kultivace probíhala po dobu asi dvou až tří týdnů v kultivačním boxu při teplotě 14 ± 1 °C, záření $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a světelném režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma (světlo 7:00–19:00). Po kultivační době (2–3 týdny) jsem prováděla izolaci jednotlivých buněk sterilní skleněnou Pasteurovou pipetou vytaženou do kapiláry. Izolované buňky rozsivek jsem přenášela do serologických desek s 25 jamkami s asi 3–4 ml tekutého WC média. Po 2–4 týdnech jsem mohla pozorovat nárůst klonových kultur.

Unialgální klonové kultury jsem následně přeočkovala do Petriho misek o průměru 5 cm s tekutým WC médiem a dále kultivovala za výše uvedených teplotních a světelných

podmínek, abych získala dostatečnou biomasu pro izolaci DNA. Z těch klonových kultur, ze kterých se v následných krocích povedla osekvenovat DNA, jsem připravila trvalý preparát pro pozdější morfologickou determinaci do druhu, tzv. voucher (Příloha 3). Kód voucheru se skládá ze zkratky lokality, data odběru a iniciál sběratele (LE či LEV = Leona Vaculíková, roz. Eichlerová; TR = Tereza Reimerová). Římská číslice označuje serologickou desku. Značení voucherů jsem však v průběhu práce zjednodušila z praktických důvodů. Vouchery se značením „čísliceR“ jsou ze vzorků, které odebírala Tereza Reimerová. Vlivem kontaminace některých kultur jinými mikroorganismy (zelené řasy, sinice, plísně) jsem některé z nich musela reizolovat přes agarovou plotnu.

3.3 Morfologická determinace

Morfologii rozsivek klonových kultur jsem zdokumentovala z voucherů (Příloha 3) světelným mikroskopem (ang. Light Microscope; LM) Zeiss Primo Star s imerzním objektivem se zvětšením 100× (po započítání zvětšení okulárového tedy bylo celkové zvětšení 1000×) a kamerou AxioCam ERc5s (5MPx) s programem AxionVision 4. Pro morfologickou determinaci jsem využila determinačních klíčů Krammer & Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, 1991b, 2004) a Hoffmann, Lange-Bertalot & Werum (2011).

3.4 Izolace, amplifikace a sekvencování DNA

3.4.1 Izolace DNA

Z unialgálních kultur jsem izolovala DNA dle protokolu inspirovaného Duff et al. 2008, který upravil Mgr. Jan Kollár (Příloha 4). Izolace DNA probíhala dle následujících kroků:

1. Z unialgální klonové kultury pipetou odebereme malé množství nárostu a přeneseme do mikrozkušavky typu Eppendorf (objem 1,5 ml).
2. Mikrozkušavku s odebraným preparátem centrifugujeme po dobu 10 minut, RPM = 15 000. Na dně se usadí buňky rozsivek s těžkými křemičitými frustulami. Supernatant odlejeme.
3. InstaGene Matrix necháme důkladně promíchat na magnetickém míchadlu. Poté ho do mikrozkušavky s peletem napipetujeme 100 µl.

4. Mikrozkušavky vložíme do termobloku na 5 minut při teplotě 95 °C.
5. Po ohřátí mikrozkušavky hned vložíme asi na 1 minutu do ledu.
6. Následuje centrifugace po dobu 2 minut, RPM = 15, 000.
7. Přidáme asi 0,5 g laboratorního zirkonového písku o průměru zrn 100 μm a necháme v třepačce (BeadBeater) protřepat 3,5 minuty při frekvenci 30 Hz.
8. Centrifugujeme po dobu 2 minut, RPM = 15,000.
9. Vzniklý supernatant odpipetujeme do nové mikrozkušavky typu Eppendorf (1,5 ml).
10. Takto připravené vzorky s izolovanou DNA rozsivek se mohou hned použít pro reakci PCR nebo skladovat při -20 °C.

3.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Následujícím krokem ve zpracování izolované DNA je polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. *Polymerase Chain Reaction*) v jejímž důsledku dochází k amplifikaci zvoleného úseku DNA, tzv. markeru. Vybrané úseky musí být ohraničené neměnnými konzervovanými oblastmi, na které může nasednout tzv. primer (Zimmermann et al. 2011). Pro potřeby této diplomové práce jsem amplifikovala tři genetické markery, které jsou zvažovány pro DNA barkóding rozsivek. Jsou jimi části genů *COXI*, *rbcL* a LSU rDNA (např. Mann et al. 2010). Sekvence primerů použitých pro jejich amplifikaci jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Používané DNA barkód markery a jejich primery.

DNA barkód marker	kód primeru	sekvence primeru	směr	zdroj
COX1-5P	GazF2	CAACCAYAAAGATATWGGTAC	>	Saunders 2005
	KEdtmR	AAACTTCWGGRTGACCAAAAA	<	Evans et al. 2007
D1-D3 LSU rDNA	D1R-F	ACCCGCTGAATTTAAGCATA	>	Scholin at al. 1994
	T24U	SCWCTAATCATTCGCTTTACC	<	Hamsher et al. 2011
<i>rbcL</i>	DPrbcL1-F	AAGGAGAAATHAATGTCT	>	Daugbjerg & Andersen 1997
	DPrbcL7-R	AARCAACCTTGTAAGTCT	<	Daugbjerg & Andersen 1997

Příprava DNA izolátů pro PCR probíhá takto:

1. Před každým PCR je nutné si vypočítat objemy jednotlivých složek směsi zvané Master mix (tj. EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix, primery, sterilovaná voda) dle počtu DNA izolátů. Nesmí se zapomenout počítat i se slepým (tzv. *blank*) vzorkem.
2. Jednotlivé složky směsi Master mix napipetujeme do mikrozkušavky typu Eppendorf (1,5 ml) a promícháme na vortexu.
3. Nachystáme si mikrozkušavky typu proužek 8PCR s víčky a popíšeme je. Do každé z nich napipetujeme 39 μ l připravené směsi Master mix.
4. Do každé mikrozkušavky pak přidáme 1 μ l izolátu DNA.
5. Proužky mikrozkušavek centrifugujeme, vortexujeme a opět centrifugujeme. Poté je vložíme do přístroje thermocycler.
6. Dle použitého markeru zvolíme příslušný PCR program, které uvádím v Tabulce 2.
7. Hotové PCR produkty skladujeme v lednici (pokud je budeme do 24 hodin zpracovávat) či v mrazničce.

Tabulka 2. Amplifikační programy pro jednotlivé DNA barkód markery

COX1	LSU rDNA D1–D3	rbcl
95 °C 3 min	95°C 5 min	94°C 3 min
95°C 0,5 min	94°C 1 min	94°C 1 min
50°C 1 min	55°C 1 min	55°C 1 min
72°C 1,5 min	74°C 1 min	72°C 1,5 min
72°C 5 min	72°C 10 min	72°C 5 min
15°C	15°C	15°C

The table includes cycle counts indicated by brackets:

- COX1: 35 x (for 95°C 0,5 min, 50°C 1 min, 72°C 1,5 min)
- LSU rDNA D1–D3: 35 x (for 94°C 1 min, 55°C 1 min, 74°C 1 min)
- rbcl: 40 x (for 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1,5 min)

3.4.3 Gelová elektroforéza

K vizualizaci a kontrole PCR produktů se používá elektroforéza (ELFO) na agarózovém gelu. Při gelové elektroforéze nesmí dojít k pozitivní vizualizaci kontrolního vzorku (blank). Přípravu na gelovou elektroforézu jsem dělala v těchto krocích:

Příprava gelu:

1. Smícháme 1,5 g agarózy se 100 ml 0,5X TAE pufrem. Tento roztok ohřejeme v mikrovlnné troubě asi 2–3 minuty.
2. Do horkého roztoku pak přidáme 1,5 µl barvy SimplySafe pro vizualizaci DNA, vložíme magnetické míchadlo a necháme promíchat.
3. Poté roztok nalijeme do elektroforetické vany a vložíme elektroforetický hřeben. Necháme chladnout asi 20–30 minut při pokojové teplotě.
4. Tuhý gel přemístíme do elektroforetické vany s 0,5X TAE pufrem.

Nanesení PCR produktů do gelu:

1. PCR produkty promícháme na vortexu a centrifugujeme.
2. Do první jamky v gelu napipetujeme 5 µl velikostního markeru (HyperLadder) o definované velikosti jednotlivých fragmentů.
3. Do dalších jamek gelu pipetujeme 5 µl PCR produktů.
4. Elektroforézu spustíme při napětí 100 V na 40 minut, nebo při napětí 200 V na 20 minut.
5. DNA fragmenty vizualizujeme pod UV světlem. Pro ilustraci přikládám fotografie vizualizace DNA fragmentů s negativním kontrolním vzorkem do přílohy (Příloha 5).

3.4.4 Purifikace DNA a sekvencování

Získané PCR produkty se před odesláním na DNA sekvencování purifikují s použitím GenElute™ PCR Clean-Up Kit dle návodu uvedeného výrobcem. Purifikované PCR produkty byly smíchány s příslušnými primery a odeslány k sekvencování do MACROGEN, Inc. (www.dna.macrogen.com).

3.5 Molekulární determinace a DNA barkóding

Molekulární determinace probíhala na základě srovnání získaných sekvencí se sekvencemi v databázích Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) a BoLD. Všechny nově pořízené DNA sekvence, fotografie, taxonomická, geografická i environmentální data související s danými kmeny byly nahrány na Barcode of Life Database (BoLD; www.boldsystems.org). Lze je nalézt v datasetu s kódem DS-LEDIOL (DOI: [dx.doi.org/10.5883/DS-LEDIOL](https://doi.org/10.5883/DS-LEDIOL)).

3.6 Molekulárně-fylogenetické analýzy

3.6.1 Příprava DNA alignmentů

Sekvence byly dle defaultního nastavení v programu Sequencer 5.0 automaticky zastrženy a asemblovány. Všechny takto upravené sekvence jsem vizuálně kontrolovala a případně manuálně upravila podle chromatogramů. Pro potřeby zjištění fylogenetické pozice byly tyto nově získané sekvence přidány k datasetu, který byl použit ke konstrukci dosud nejobsáhlejší molekulární fylogeneze rozsivek vůbec (Nakov et al. 2018). Alignmenty sekvencí jednotlivých genetických markerů byly vytvořeny automaticky prostřednictvím algoritmu MUSCLE, který je součástí programu MEGA-X (Kumar et al. 2018). Všechny takto vytvořené alignmenty jsem vizuálně zkontrolovala a v případě odhalení zjevných chyb zanechaných algoritmem manuálně upravila.

3.6.2 Eliminace hypervariabilních úseků

Molekulární evoluce ribosomálních genů (jakým je například právě LSU rDNA kódující velkou ribosomální podjednotku) probíhá jinak, než u genů kódujících proteiny (Kollár et al. 2019). Protože pro funkčnost ribosomálních genů je důležitá především jejich

sekundární struktura, vyskytují se v nich úseky tzv. smyček, jejichž změny nejsou pod dohledem přírodního výběru. V konečném důsledku to znamená, že přítomnost těchto hypervariabilních úseků v alignmentu zvyšuje riziko výskytu nehomologních pozic a substituční saturace, které snižují přesnost molekulárně-fylogenetické analýzy. Proto je vhodné tyto hypervariabilní úseky z alignmentu odstranit ještě před fylogenetickými analýzami (Lemey et al. 2007). K tomu jsem použila GBLOCKS Server verze 0.91b (Castresana 2002) při defaultním nastavení.

3.6.3 Výběr modelů nukleotidové substituce

Ve fylogenetické analýze založené na maximální věrohodnosti (angl. *Maximum Likelihood*; ML) je nezbytné definovat substituční modely. Ty nejvhodnější byly pro jednotlivé genetické markery vybrány na základě Bayesova informačního kritéria (v angl. literatuře *Bayesian Information Criterion*, BIC) spočítaného v MEGA X (Kumar et al. 2018): GTR+G (pro LSU rDNA; Nei & Kumar 2000) a GTR+G+I (pro *COXI*; Nei & Kumar 2000). Kvůli obsáhlosti *rbcL* alignmentu (865 sekvencí) byla jeho molekulárně-fylogenetická ML analýza provedena na serveru CIPRES (www.phylo.org) programem IqTree v. 1.6.10 (Nguyen et al. 2015). Proto byl substituční model vybrán automaticky pomocí k tomu určené implementované funkce (Chernomor et al. 2016): GTR+F+R10 (Nei & Kumar 2000).

3.6.4 Konstrukce fylogenetických stromů

Pro rekonstrukci fylogeneze, jejímž výsledkem je fylogram (tj. fylogenetický strom zahrnující kromě topologie i délku větví), byla zvolena metoda maximální věrohodnosti. Tyto analýzy byly opět provedeny v programu MEGAX (Kumar et al. 2018) s použitím výše vybraných nukleotidových substitučních modelů pro alignmenty 51 *COXI* sekvencí (z toho 3 nově získané v této DP a 48 z datasetu Nakova et al. 2018) a 193 LSU rDNA sekvencí (z toho 32 nově získaných a 161 z datasetu Nakova et al. 2018) za defaultního nastavení. Pro analýzu alignment LSU rDNA D1-D3 sekvencí (777 bp) bylo nastaveno, že pouze pozice obsažené v alespoň 75% sekvencí budou analyzovány. Důvodem bylo, že drtivá většina LSU rDNA sekvencí rozsivek v databázích neobsahuje region D3, takže jej neobsahoval ani Nakovův LSU rDNA alignment (316 bp). Statistická podpora Bootstrap

(BS) byla vypočítána z 1000 generací. Jak bylo uvedeno výše, kvůli obsáhlosti *rbcL* alignmentu (865 sekvencí, z toho 22 nově získaných) byla jeho molekulárně-fylogenetická ML analýza provedena na serveru CIPRES programem IqTree v. 1.6.10 za defaultního nastavení. Jako statistická podpora byl ponechán defaultní *Ultrafast Bootstrap Support* (UBS) s 1000 generacemi. Fylogenetické stromy byly graficky upraveny v programech FigTree v. 1.4.3 a Inkscape v. 0.92.

3.7 Taxonomické rozlišení barcode markerů

Na základě výsledků fylogenetických analýz jsem vybrala kmeny z celkového alignmentu (tj. včetně sekvencí z Nakov et al. 2018), mezi nimiž byly změřeny genetické vzdálenosti (konkrétně počet rozdílných pozic, angl. *Number of Differences*) v rámci jednotlivých markerů a tím i jejich vnitrodruhová a mezidruhová variabilita. Tím se dá ověřit, zda zde studované barkód markery mají dostatečné taxonomické rozlišení k jednoznačné determinaci druhů. Genetické vzdálenosti byly spočítány v programu MegaX za defaultního nastavení.

4 VÝSLEDKY

4.1 Kmeny a jejich taxonomická determinace

Celkem jsem izolovala asi 80 klonových kultur. DNA izoláty jsem získala ze 43 klonových kultur, přičemž 32 z nich bylo úspěšně osekvencováno. DNA izoláty jsou při -20 °C uchovávány na Katedře botaniky PŘF UP. Pouze u jednoho kmene (LEV021R) se podařilo získat sekvence všech tří barkód markerů, tj. LSU rDNA, *COXI* i *rbcL*. Kmeny byly determinovány pomocí LM a DNA. Srovnání obou způsobů uvádím v Tabulce 3. Porovnání výsledků morfologické a molekulární determinace na základě tří markerů na (a) rodové i (b) druhové úrovni je znázorněno v Tabulce 4.

Nápadná 100% shoda na rodové i druhové úrovni se vyskytuje u všech srovnání molekulární determinace na základě *COXI* sekvencí. Ve všech třech případech *COXI* sekvencí se jedná o druhové komplexy (*Gomphonema parvulum*, *Nitzschia palea*). Nejvyšší procentuální shoda (86 %) se pak vyskytuje u srovnání determinace morfologické s determinací na základě *rbcL* na druhové úrovni. Rovněž se jedná v těchto případech o druhové komplexy (*Gomphonema parvulum*, *Nitzschia palea*).

Pro ilustraci přikládám fotografie vybraných kmenů (Obrázek 1). Kmeny na Obrázku 1 označené písmeny d, f, j, k, spadají mezi druhové komplexy. Taxony řadící se mezi druhové komplexy jsou většinou ekologicky euryvalentní, rozšířené, běžné (Pouličková et al. 2008b, Schlick-Steiner et al. 2007).

Tabulka 3. Srovnání determinace morfologické a molekulární (BLAST *rbcl*, LSU rDNA a COX1 sekvencí; BoLD *rbcl*).
 Použité zkratky: A. = *Achnanthydium*, E. = *Eunotia*, G. = *Gomphonema*, H. = *Halamphora*, L. = *Lemnicola*, N. = *Navicula*, Ni. = *Nitzschia*, Pl. = *Planorhynchium*, Ps. = *Psammothidium*. LSU rDNA/*rbcl*/COX1 = determinace pomocí BLAST srovnání s Genbankem. *rbcl* BoLD det. = determinace pomocí BoLD (DNA barkódová determinace na základě COX1 a LSU rDNA není v BoLD možná), Similarity = podobnost v %. QC = Query Cover = překryv délek srovnávaných sekvencí v procentech; PI = Percent Identity = procentuální podobnost srovnávaných sekvencí; jedná se o hodnoty uváděné v BLAST. S.N. = sekvence nezískána. Kultury označené hvězdičkou byly kontaminovány, kontaminací se rozumí kontaminace prokaryotická (bakteriální), ale i kontaminace jiným druhem roztivky – u kmenů LEV018, LEV032R.

kód kmene	morfologie	<i>rbcl</i> /QC-PI	<i>rbcl</i> BoLD det./Similarity	LSU rDNA/QC-PI	<i>cox1</i> /QC-PI
LEV001	<i>Achnanthydium</i> sp.	A. pyrenaicum/97-99	<i>Achnanthydium</i> sp./98	<i>Achnanthydium</i> sp./99-99	S.N.
LEV005	<i>Gomphonema</i> sp.	A. minutissimum/96-98	<i>Achnanthydium</i> sp./96	<i>Achnanthydium</i> sp./100-96	S.N.
LEV007	<i>Achnanthydium</i> sp.	<i>Achnanthydium</i> sp./97-99	<i>Achnanthydium</i> sp./99	<i>Achnanthydium</i> sp./99-100	S.N.
LEV008	<i>Planorhynchium</i> sp.	A. minutissimum/100-99	<i>Achnanthydium</i> sp./99	<i>Achnanthydium</i> sp./99-99	S.N.
LEV014	<i>Gomphonema</i> sp.	S.N.	S.N.	Ps. papilio/abundans/97-88	S.N.
LEV015	<i>Planorhynchium</i> sp.	Pl. frequentissimum/98-97	Ps. abundans/94	Ps. papilio/abundans/99-88	S.N.
LEV017	<i>Nitzschia</i> sp.*	Ni. acidoclinata/100-99	<i>Pseudo-nitzschia hasleana</i> /93	<i>Nitzschia</i> cf. <i>fonticola</i> /81-99	S.N.
LEV018	<i>E. mucophila</i> *	S.N.	S.N.	Ps. abundans/99-90	S.N.
LEV023	<i>Pinnularia sinistra</i>	<i>Pinnularia</i> sp./100-99	<i>Pinnularia</i> sp./100	<i>Pinnularia acidicola</i> /73-96	S.N.
LEV025	<i>Fragilaria</i> sp.	<i>Fragilaria bidens</i> /97-99	<i>Fragilaria bidens</i> /100	<i>Fragilaria capucina</i> /55-90	S.N.
LEV052	<i>Psammothidium</i> sp.	<i>Sellaphora minima</i> /94-98	<i>Sellaphora</i> cf. <i>minima</i> /98	Ps. papilio/abundans/99-87	S.N.
LEV070	<i>Psammothidium</i> sp.	S.N.	S.N.	Ps. papilio/abundans/98-83	S.N.
LEV072	<i>Psammothidium</i> sp.*	S.N.	S.N.	Ps. papilio/abundans/99-90	S.N.
LEV140	<i>Pl. lanceolatum</i> *	S.N.	S.N.	<i>Psammothidium</i> sp./91-89	S.N.
LEV148	<i>Pl. lanceolatum</i>	S.N.	S.N.	Ps. papilio/abundans/99-89	S.N.
LEV195	není voucher	S.N.	S.N.	<i>Achnanthydium</i> sp./99-97	S.N.
LEV257	není voucher	S.N.	S.N.	N. microdigitoradiata/89-94	S.N.
LEV273	<i>Pl. lanceolatum</i> *	S.N.	S.N.	Ps. papilio/abundans/99-89	S.N.
LEV300	<i>G. parvulum</i>	S.N.	S.N.	S.N.	G. parvulum/100-99
LEV302	<i>G. parvulum</i> *	G. parvulum/99-98	G. parvulum/99	G. okunoi/70-88	S.N.
LEV316	<i>G. parvulum</i>	G. parvulum/100-98	G. parvulum/99	S.N.	G. parvulum/100-93
LEV009R	<i>Psammothidium</i> sp.	<i>Sellaphora minima</i> /96-98	<i>Sellaphora</i> cf. <i>minima</i> /98	Ps. abundans/99-90	S.N.

kód kmene	morfologie	rbcL/QC-PI	rbcL BoLD det.	LSU rDNA/QC-PI	cox1/QC-PI
LEV014R	<i>Navicula</i> sp.	<i>N. cryptocephala</i> /97-98	<i>N. cryptocephala</i> /100	<i>N. microdigitoradiata</i> /93-94	S.N.
LEV018R	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp./98-95	<i>Seminavis cf. robusta</i> /95	<i>N. microdigitoradiata</i> /90-94	S.N.
LEV020R	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp./98-96	<i>Seminavis cf. robusta</i> /95	<i>N. microdigitoradiata</i> /90-94	S.N.
LEV021R	<i>Nitzschia palea</i>	<i>Nitzschia palea</i> /100-99	<i>Nitzschia palea</i> /100	<i>Nitzschia palea</i> /88-99	<i>Nitzschia palea</i> /99-90
LEV023R	<i>Nitzschia palea</i>	<i>Nitzschia palea</i> /99-99	<i>Nitzschia palea</i> /100	<i>Nitzschia palea</i> /88-100	S.N.
LEV024R	<i>Nitzschia palea</i>	<i>Nitzschia palea</i> /99-99	<i>Nitzschia palea</i> /100	<i>Nitzschia palea</i> /88-98	S.N.
LEV028R	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp./97-95	<i>Seminavis cf. robusta</i> /95	<i>N. microdigitoradiata</i> /90-93	S.N.
LEV032R	<i>Achnanthyidium</i> sp.*	<i>L. hungarica</i> /96-95	<i>Ps. abundans</i> /93	<i>Ps. papilio</i> /98-91	S.N.
LEV038R	<i>H. coffeaeformis</i>	<i>Amphora pediculus</i> /98-100	<i>Amphora pediculus</i> /100	<i>H. coffeaeformis</i> /99-84	S.N.
LEV041R	<i>Nitzschia palea</i>	<i>Nitzschia palea</i> /99-99	<i>Nitzschia palea</i> /100	<i>Nitzschia palea</i> /88-99	S.N.

Tabulka 4. Shoda výsledků morfologické a molekulárních determinací na základě tří genetických markerů na rodové (a) a druhové (b) úrovni. Číslo za lomítkem je nejvyšší možný počet případů (na základě počtu dostupných sekvencí), číslo před lomítkem je počet případů, v nichž byla shoda.

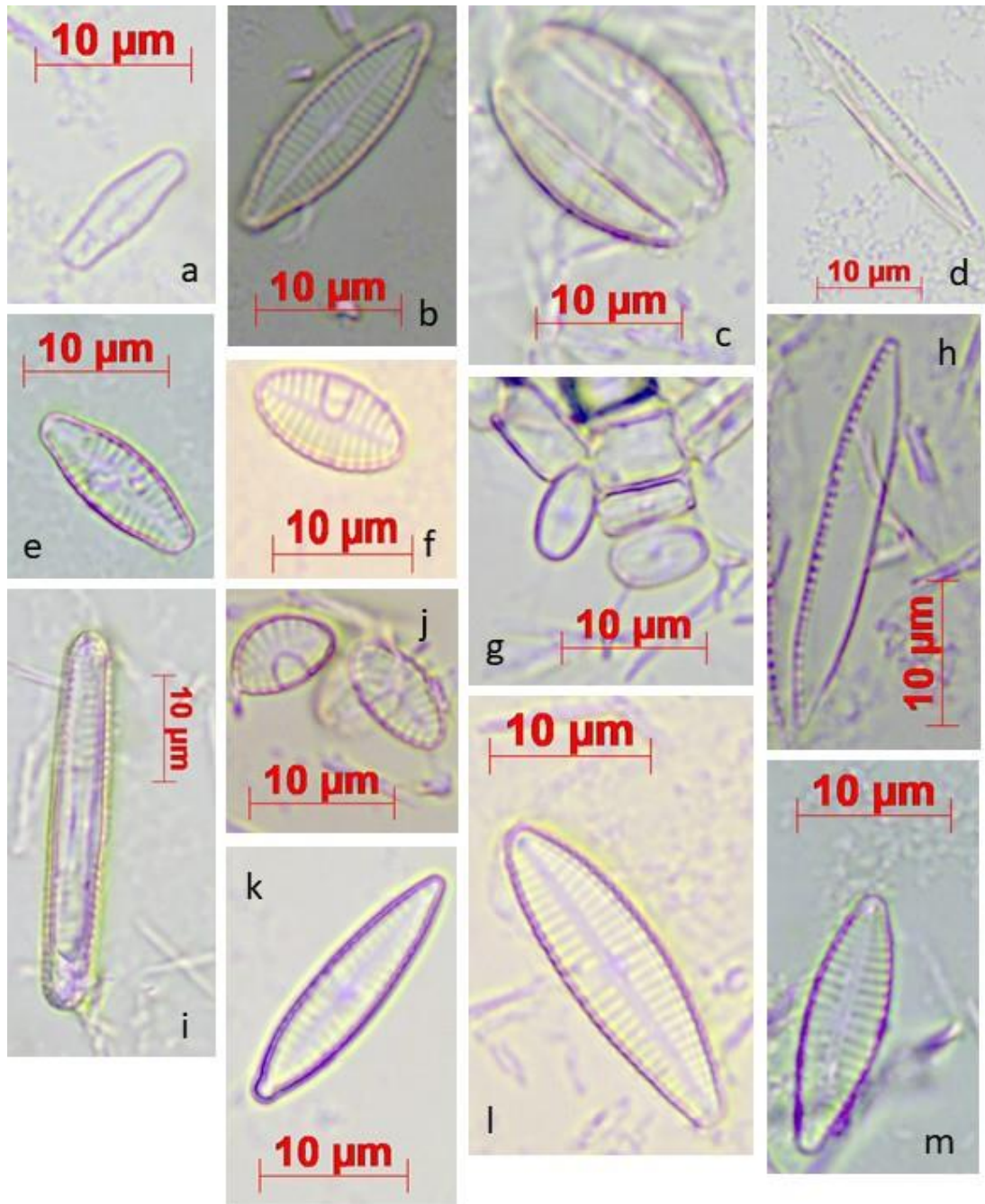
a – rodová úroveň

	morfologie	<i>rbcL</i>	LSU rDNA	<i>COX1</i>
morfologie	X	X	X	X
<i>rbcL</i>	16/22	X	X	X
LSU rDNA	19/30	16/21	X	X
<i>COX1</i>	3/3	2/2	1/1	X

b – druhová úroveň

	morfologie	<i>rbcL</i>	LSU rDNA	<i>COX1</i>
morfologie	X	X	X	X
<i>rbcL</i>	6/7	X	X	X
LSU rDNA	5/10	4/13	X	X
<i>COX1</i>	3/3	2/2	1/1	X

Obrázek 1. Fotografie kmenů. a – LEV032R – morfologické určení: *Achnanthydium* sp., b – LEV020R – *Navicula* sp., c – LEV 038R – *Halamphora coffeaeformis*, d – LEV023R – *Nitzschia palea*, e – LEV008 – *Planothidium* sp., f – LEV140 – *Planothidium lanceolatum*, g – LEV052 – *Psammothidium* sp., h – LEV021R – *Nitzschia* sp., i – LEV023 – *Pinnularia sinistra*, j - LEV148 – *Planothidium lanceolatum*, k – LEV300 – *Gomphonema parvulum*, l – LEV316 – *Gomphonema* sp., m - LEV005 – *Gomphonema* sp. Již známé druhové komplexy – d, f, j, k.



4.2 Budování DNA bárkódové databáze

Všechny nově pořízené DNA sekvence, fotografie, taxonomická, geografická i environmentální data související s danými kmeny byly nahrány na Barcode of Life Database (BoLD; www.boldsystems.org). Lze je nalézt v datasetu s kódem DS-LEDIOL (DOI: [dx.doi.org/10.5883/DS-LEDIOL](https://doi.org/10.5883/DS-LEDIOL)). Sekvence LSU rDNA byly nahrány ke 32 kmenům. Sekvence *rbcL* byly nahrány ke 22 kmenům. Sekvence *COX1* byly nahrány ke 3 kmenům. Fotografie byly opatřeny k 27 kmenům. Taxonomická, geografická a environmentální data byla nahrána ke všem 32 kmenům. Ilustrační karta jednoho z kmenů v databázi BoLD je v Obrázcích 2 a 3.

LEV008 - Barcoding Diatoms at Palacky University in Olomouc [DIOL]

Specimen Details

Sample ID: LEV008
 Process ID: DIOL006-20
 Project: DIOL
 Institution Storing: Palacky University Olomouc
 Field ID: V-040517
 Museum ID:
 Collection Code:
 Reference Link:
 Note:

Voucher Status:
 Tissue Description:
 Sex:
 Reproduction:
 Life Stage:
 Extra Info:
 Associated Taxa:
 Associated Specimens:

Taxonomy

Phylum: Bacillariophyta
 Class: Bacillariophyceae
 Order: Actinocyclusales
 Family: Actinocyclusaceae
 Subfamily: Planodiaceae
 Genus: Planodium
 Species:

Identification: Planodium
 Rank: Genus
 Identifier: Leona Ešterova
 Identification Method:
 Identifier Institution: Palacky University Olomouc
 Identifier Email: leonaes@univ.uz.zim.cz
 Taxonomy Note:

Collection Data

Country: Czech Republic
 Province/State: Olomouc
 Region/Country: Vyškov
 Sector:
 Exact Site:
 LAT/LON: 49.5567, 17.4826
 Elevation:
 Elevation Accuracy:
 Depth:
 Depth Accuracy:
 Collection Event ID:
 Collection Notes:

Collector: Leona Ešterova
 Date Collected: 04-May-2017
 Date Accuracy:
 Time Collected:
 Site Code:
 Habitat: epilithon
 Sampling Protocol:
 Coord. Source:
 Coord. Accuracy:

Map

Recent Activities

Timestamp	Who	Action
Mar-24, 2020 05:01	Leona Ešterova	Modify Specimen
Mar-23, 2020 09:48	Leona Ešterova	Modify Specimen
Mar-16, 2020 15:24	Leona Ešterova	New Image(s)
Mar-14, 2020 15:05	Leona Ešterova	New Record

Showing 1 to 4 of 4 entries

Download History: [Last Week](#) [Last Month](#) [Last 6 Months](#)

Comments

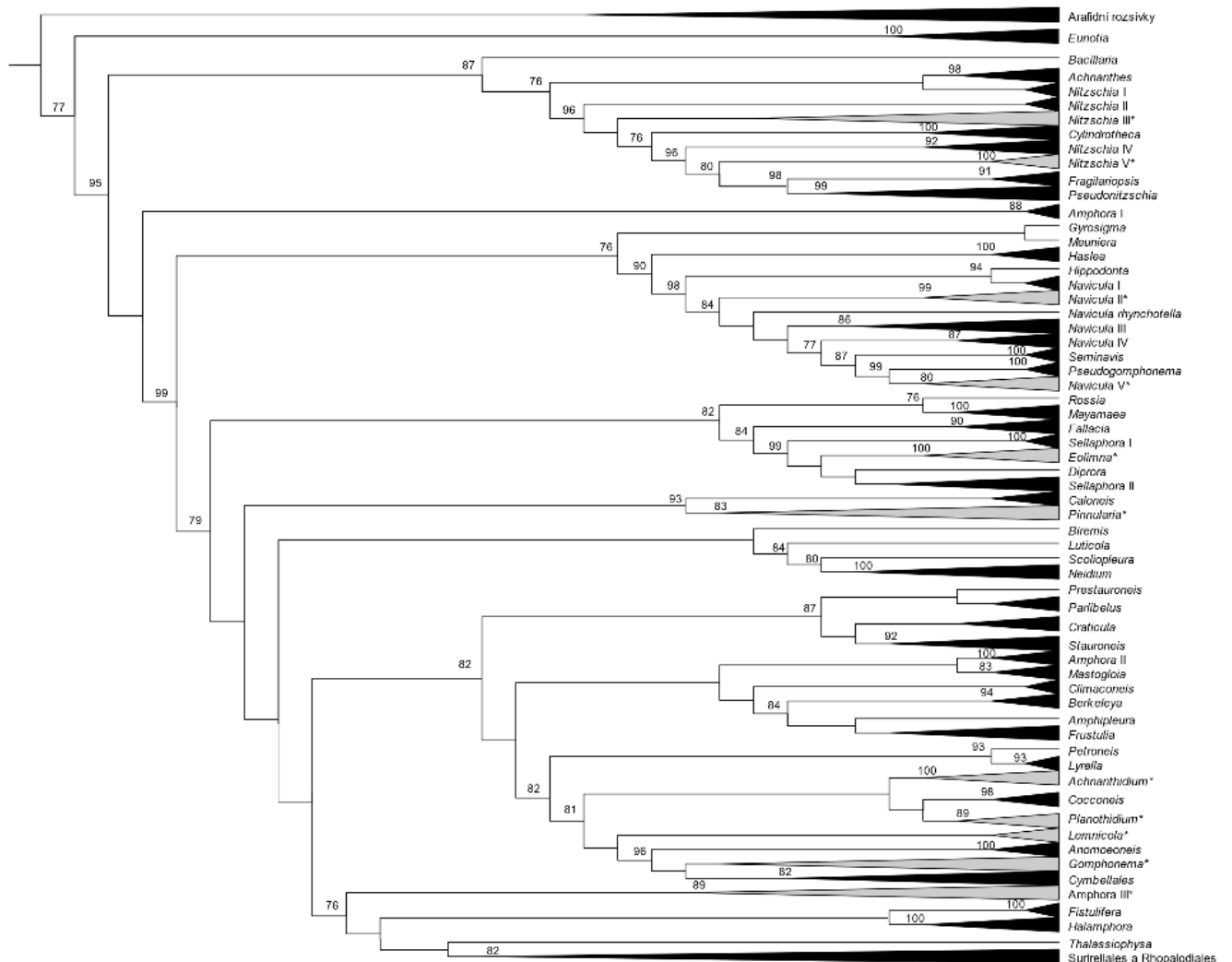
New Comment

Copyright BoLD © 2014-2020

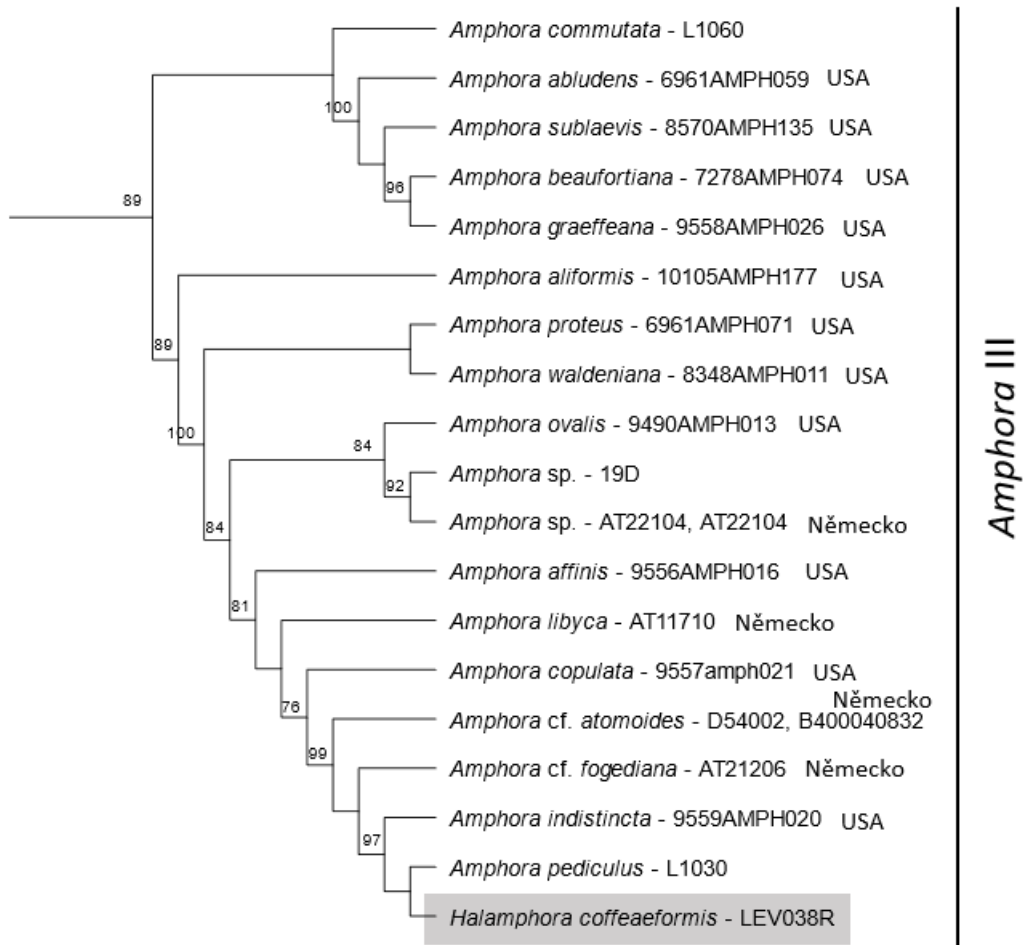
Obrázek 2. Ilustrační karta kmene LEV008 v databázi BoLD – Specimen Page.

4.3 Fylogenetická pozice nových kmenů

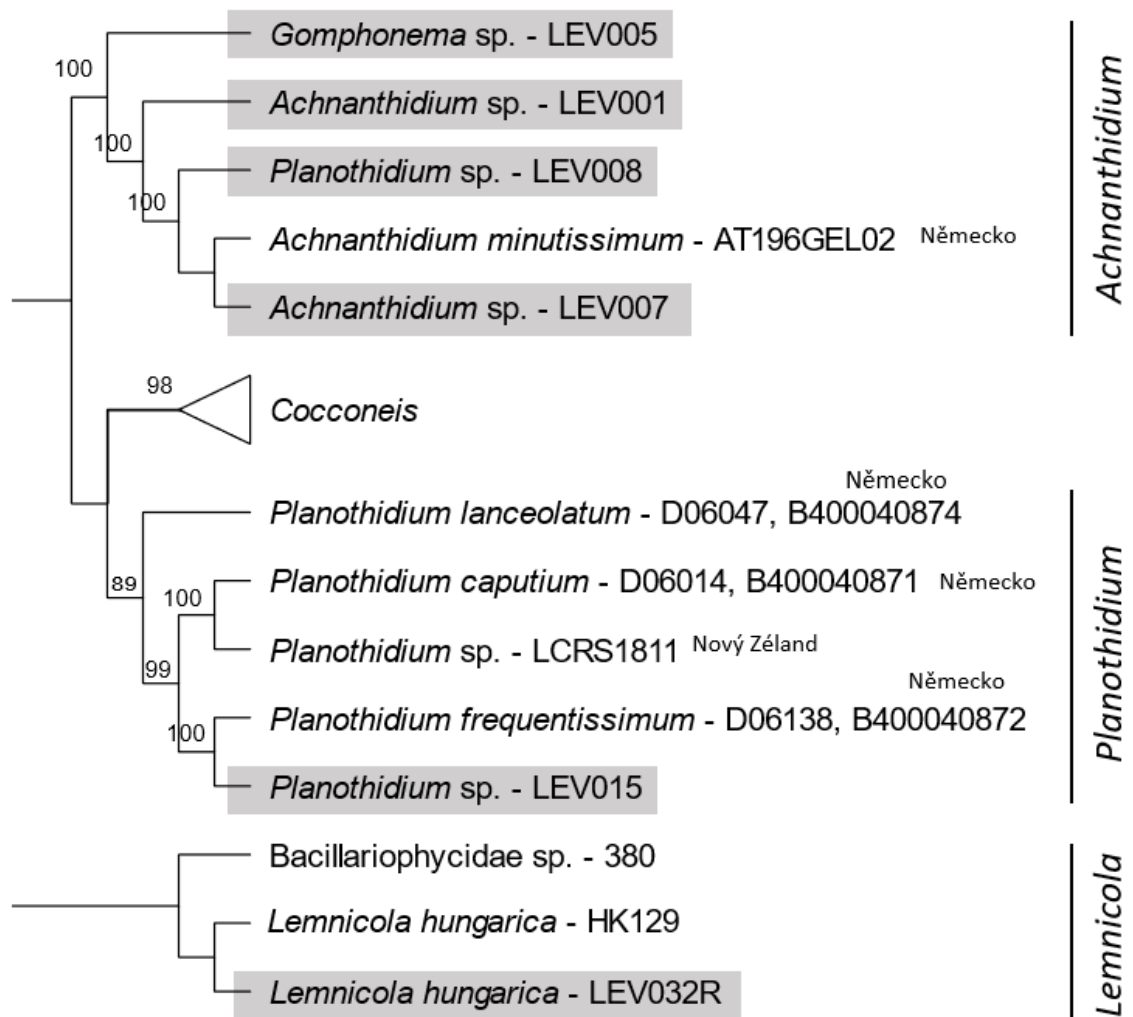
Výsledkem molekulárně-fylogenetických analýz byly fylogramy odhalující fylogenetickou pozici nově získaných kmenů a délku větví. Kvůli zobrazení jsou v Obrázcích 4 až 11 kladogramy, tj. fylogenetické stromy zobrazující pouze topologii. Protože ve finálních alignmentech (které vznikly přidáním nových sekvencí do alignmentů použitých ke konstrukci dosud nejobsáhlejší molekulární fylogeneze rozsivky, tj. Nakov et al. 2018) byly sekvence z celé třídy Bacillariophyceae (tj. celé rozsivky, jde tedy o časově relativně hlubokou fylogenezi sahající do druhohor; Nakov et al. 2018), považují za nejdůvěryhodnější výsledky založené na *rbcL*, který byl nejdelší a nejkonzervativnější ze zde studovaných markerů (analýzu variability genetických markerů lze nalézt i v Kollár et al. 2019). Fylogenetický strom zkonstruovaný na základě alignmentu *rbcL* sekvencí je na Obrázku 4. Detaily kládů, kde jsou umístěné kmeny s nově získanými sekvencemi, jsou na Obrázcích 5 až 11. Fylogenetický strom zkonstruovaný na základě *COXI* lze nalézt v Příloze 6. Fylogenetický strom zkonstruovaný na základě LSU rDNA lze spolu se všemi užitými alignmenty a fylogramy nalézt v online repositoriu (https://www.researchgate.net/profile/Jan_Kollar5).



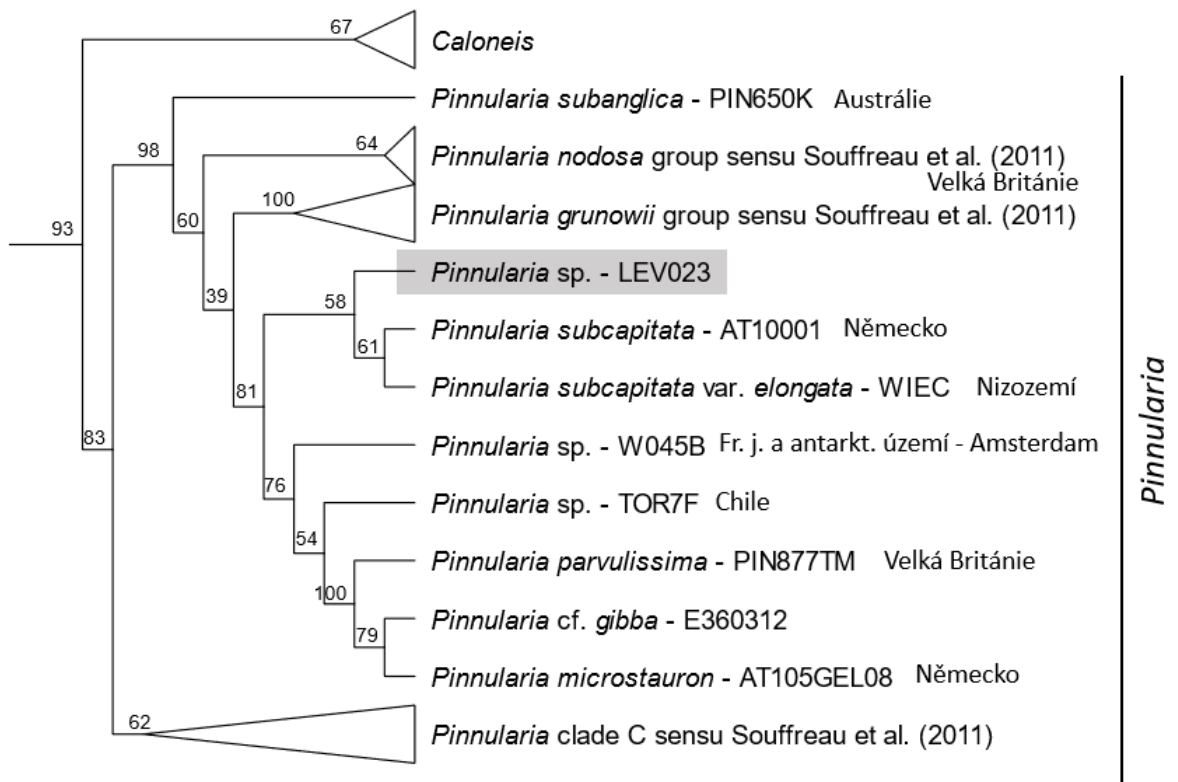
Obrázek 4. Zakořeněný strom zkonstruovaný metodou Maximum Likelihood na základě alignmentu 865 *rbcL* sekvencí. Alignment vznikl spojením datasetu, který byl využit ke konstrukci dosud nejobsáhlejší molekulární fylogeneze rozsivek vůbec (Nakov et al. 2018) a sekvencí kmenů, které byly nově izolovány pro potřeby této diplomové práce. Klády jsou zkolabovány na úroveň rodů a ty, které obsahují nově izolované kmeny jsou označeny šedou barvou a hvězdičkou. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support). Zobrazeny jsou jenom podpory větší, než 75 %. Některé outgroup klády (centrické rozsivky) nejsou zobrazeny.



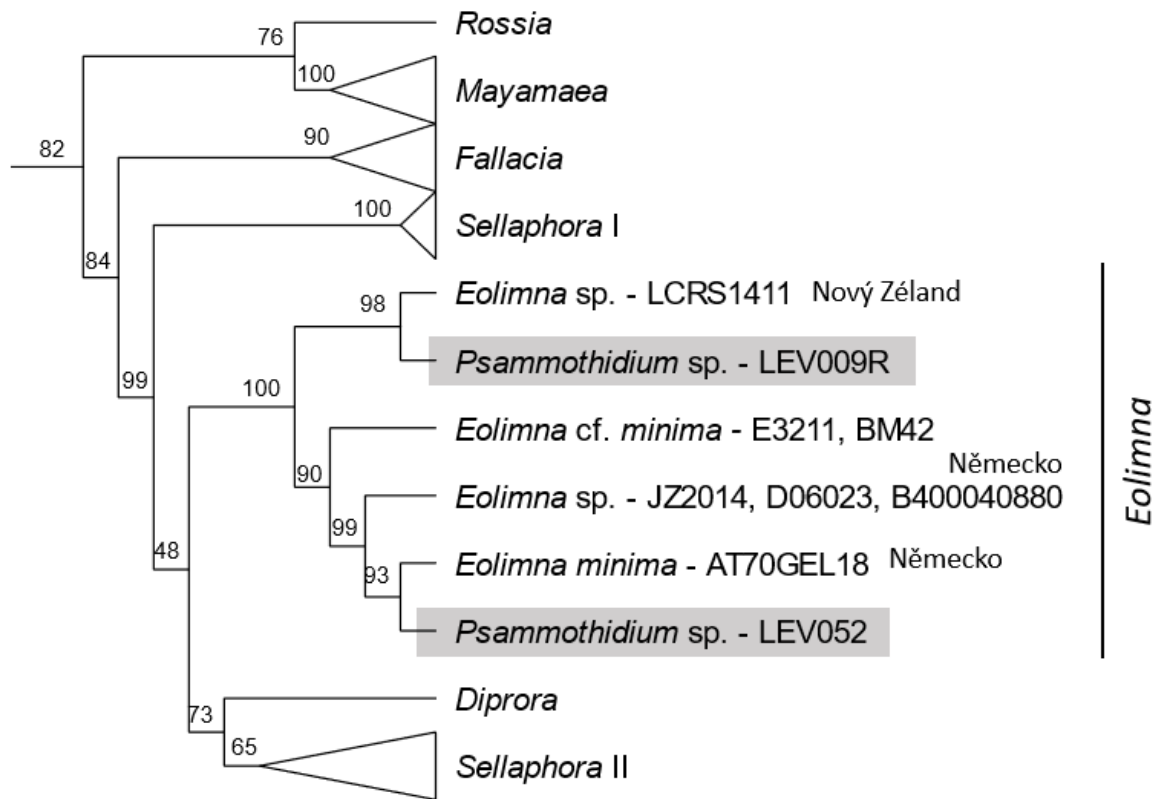
Obrázek 5. Detail kládu *Amphora* III ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmen, který byl nově izolován pro potřeby této práce je označen šedou barvou a u něj uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support). Zobrazeny jsou jenom podpory větší, než 75 %.



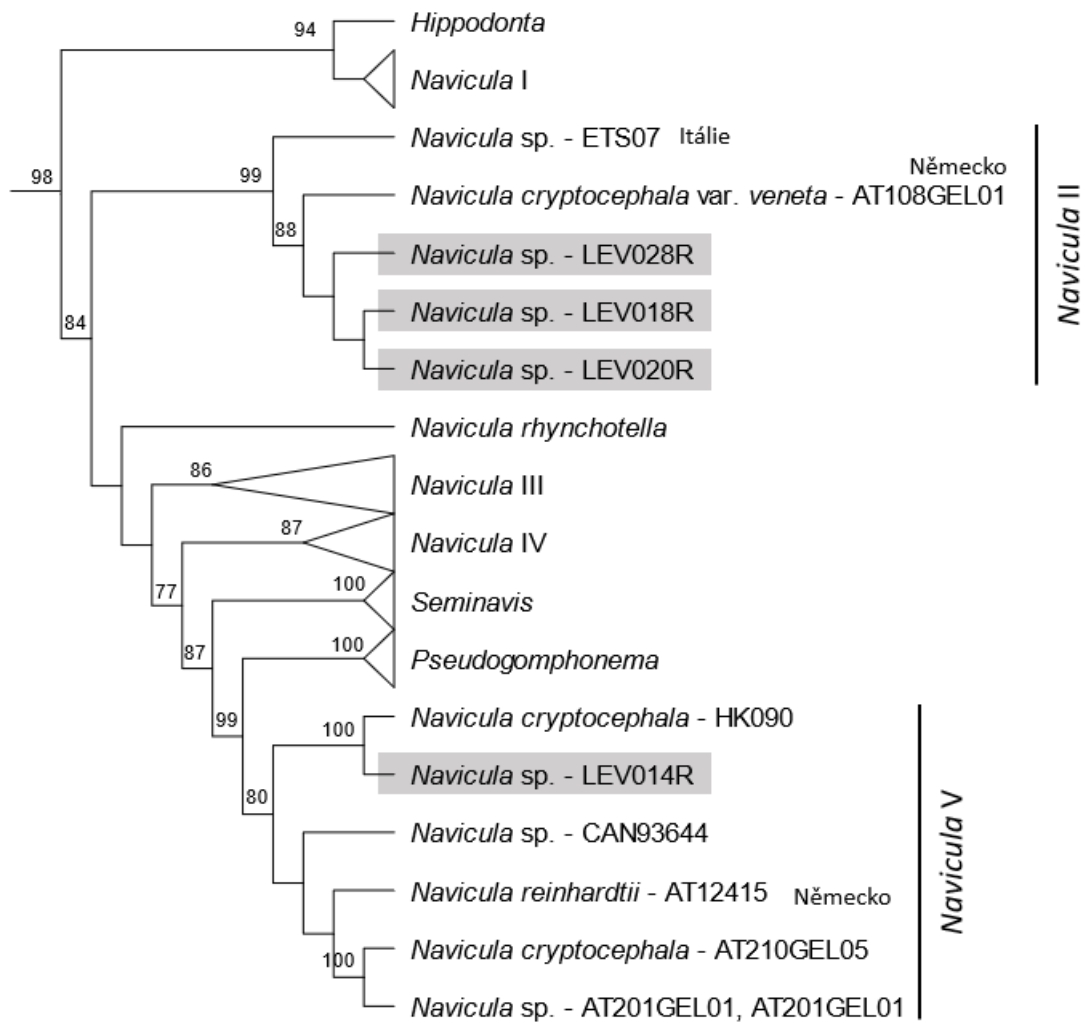
Obrázek 6. Detaily kládů *Achnantheidium*, *Planothidium* a *Lemnicola* ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmeny, které byly nově izolovány pro potřeby této práce jsou označeny šedou barvou a u nich uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support). Zobrazeny jsou jenom podpory větší, než 75 %. Umístění kadogramu rodu *Lemnicola* je zde z prostorově úsporných důvodů, nejedná se o sesterský klád rodů *Achnantheidium* a *Planothidium*.



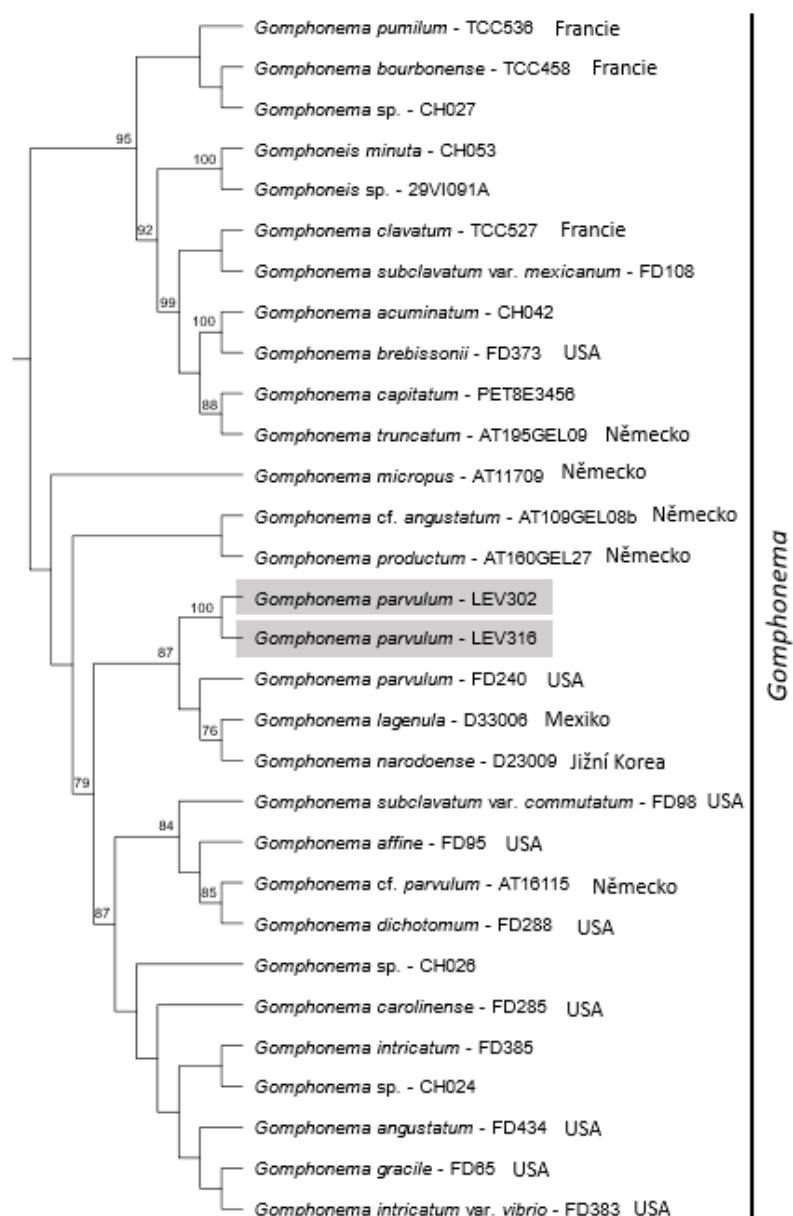
Obrázek 7. Detail kládu *Pinnularia* ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmen, který byl nově izolován pro potřeby této práce je označen šedou barvou a u něj uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support).



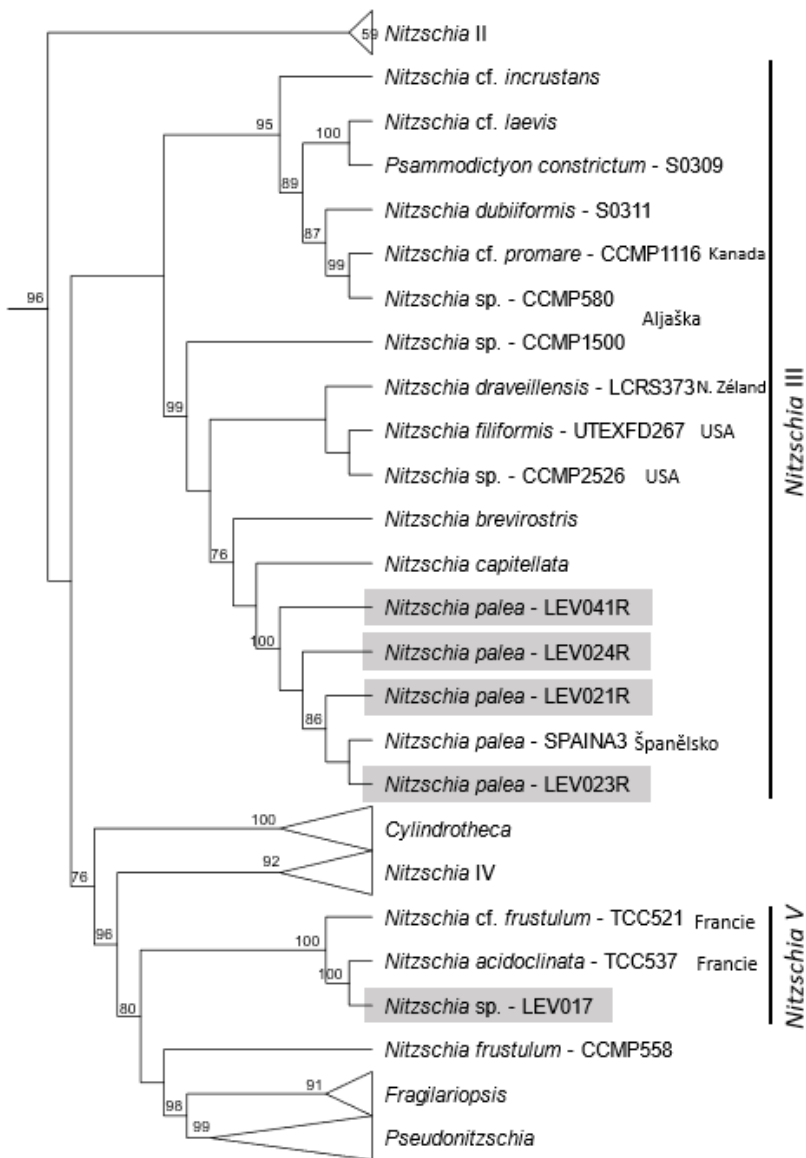
Obrázek 8. Detail kládu Eolimna ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmeny, které byly nově izolovány pro potřeby této práce jsou označeny šedou barvou a u nich uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support).



Obrázek 9. Detail kládů *Navicula* II a *Navicula* V ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmeny, které byly nově izolovány pro potřeby této práce jsou označeny šedou barvou a u nich uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support).



Obrázek 10. Detail kládu *Gomphonema* ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmeny, které byly nově izolovány pro potřeby této práce jsou označeny šedou barvou a u nich uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support). Zobrazeny jsou jenom podpory větší, než 75 %.



Obrázek 11. Detail kládů *Nitzschia* III a *Nitzschia* V ze stromu zobrazeného v Obrázku 4. Názvy linií jsou ve formátu „taxon - kmen“, příp. i „země původu“. Kmeny, které byly nově izolovány pro potřeby této práce jsou označeny šedou barvou a u nich uvedené taxonomické určení je založeno na morfologii frustul. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support).

4.3 Taxonomické rozlišení barkód markerů

Zjištění fylogenetické pozice nových kmenů umožnilo testování vnitrodruhové a mezidruhové variability genetických markerů a tím i jejich taxonomického rozlišení.

***Halamphora* (Obrázek 5)**

Kmen LEV038R, původně dle morfologie určený jako *Halamphora coffeaeformis*, jsem na základě molekulární determinace (srovnání sekvence s databází BoLD) a topologie ve fylogramu určila jako rod *Amphora*. Genetická vzdálenost *rbcL* sekvence LEV038R se od sekvencí různých druhů z rodu *Halamphora* lišila v 98 až 108 bp, zatímco od druhu *Amphora indistincta* se lišila 2 bp a od druhu *A. pediculus* se lišila 3 bp. Mezidruhová variabilita s dalšími druhy rodu *Amphora* se pohybovala od 4 do 97 bp.

***Achnantheidium, Planothidium, Lemnicola* (Obrázek 6)**

Sekvence (*rbcL*) kmene LEV007, dle morfologie určeného jako *Achnantheidium* sp., je identická s *rbcL* sekvencí kmene AT-196Gel02 určeného jako *Achnantheidium minutissimum*. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV015, dle morfologie určeného jako *Planothidium* sp., je odlišná v 1 bp s *rbcL* sekvencí kmene d06138_b400040872 určeného jako *Planothidium frequentissimum*. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV008, dle morfologie určeného jako *Planothidium* sp., je odlišná v 4 bp od *rbcL* sekvence kmene AT-196Gel02 určeného jako *Achnantheidium minutissimum* a v 5 bp od *rbcL* sekvence kmene LEV007. Kmeny LEV001, LEV005, LEV007 a LEV008 tvoří monofyletický klád s *Achnantheidium minutissimum* (AT-196Gel02). Kmen LEV015 spadá do kládu *Planothidium*.

V *rbcL* alignmentu se nachází pouze jedna *rbcL* sekvence s druhem *Lemnicola hungarica* (kód kmene je UTEX FD456-HK129) a mnou získaná *rbcL* sekvence kmene LEV032R, kterou jsem dle morfologie určila jako druh *Lemnicola hungarica*. Tyto dvě sekvence jsou rozdílné v 92 bp, čemuž odpovídá i délka větví ve fylogramu. Sekvence kmene UTEX FD456-HK129 pochází z přírodního vzorku z USA.

***Pinnularia* (Obrázek 7)**

Sekvence (*rbcL*) kmenu LEV023 je nejpodobnější *rbcL* sekvenci kmene AT-100.01 určeného jako *Pinnularia subcapitata*, se kterým se liší v 6 bp. S *Pinnularia subcapitata* var. *elongata* (kód kmene je Wie(c)) se liší ve 13 bp. Sekvence (*rbcL*) kmenů AT-100.01 a Wie(c) se mezi sebou liší ve 4 bp. Mezidruhová variabilita s dalšími druhy rodu *Pinnularia* se pohybovala od 11 do 49 bp.

***Psammothidium* (Obrázek 8)**

Sekvence (*rbcL*) kmene LEV052, dle morfologie určeného jako *Psammothidium* sp., se liší v 11 bp od *rbcL* sekvence kmene AT70Gel18 určeného jako *Eolimna minima*. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV009R, dle morfologie taktéž určeného jako *Psammothidium* sp., se liší v 11 bp od *rbcL* sekvence kmene Styx 1 LCR-S-14-1-1 určeného jako *Eolimna* sp. Mezi sebou se *rbcL* sekvence kmenů LEV052 a LEV009R liší v 31 bp.

***Navicula* (Obrázek 9)**

Sekvence (*rbcL*) kmene LEV014R, který byl na základě morfologie určen jako *Navicula* sp., se liší v 1 bp od *rbcL* sekvence kmene HK090 určeného jako *Navicula cryptocephala*. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV018R, který byl na základě morfologie rovněž určen jako *Navicula* sp., se liší v 1 bp od sekvence kmene AT108gel01 určeného jako *Navicula cryptocephala* var. *veneta*. Sekvence (*rbcL*) *Navicula cryptocephala* (HK090) se liší od *rbcL* sekvence *Navicula cryptocephala* var. *veneta* (AT108gel01) v 33 bp. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV020R je identická s *rbcL* sekvencí kmene AT108gel01 určeného jako *Navicula cryptocephala* var. *veneta*. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV020R se liší v 1 bp od *rbcL* sekvence kmene LEV018R. Sekvence (*rbcL*) kmene LEV028R se liší v 1 bp od *rbcL* sekvence kmene AT108gel01 určeného jako *Navicula cryptocephala* var. *veneta*, ve 2 bp od *rbcL* sekvence kmene LEV084R a v 1 bp s *rbcL* sekvencí kmene LEV020R.

***Gomphonema parvulum* (Obrázek 10)**

Sekvence (*rbcL*) kmenů LEV302 a LEV316, které byly dle morfologie určeny jako *Gomphonema parvulum*, jsou identické. Sekvence (*rbcL*) kmene d33006 určeného

jako *Gomphonema lagenula* neodpovídá s LEV302 a LEV316 dle morfologie, ale ani geografickým původem (Mexiko), ovšem mají nejméně odlišných pozic v *rbcL* sekvencích, a to 14 bp. V *rbcL* alignmentu se vyskytují dvě sekvence s názvem *G. parvulum* a dvě mnou získané sekvence kmenů určených dle morfologie jako *G. parvulum*. S *rbcL* sekvencí kmene at16115 určeného jako *Gomphonema cf. parvulum*, která pochází z Německa, je v porovnání s *rbcL* sekvencemi kmenů LEV302 a LEV316 odlišných 22 bp. Sekvence (*rbcL*) kmene fd240 určeného jako *Gomphonema parvulum*, která pochází z USA, je v porovnání s *rbcL* sekvencemi kmenů LEV302 a LEV316 odlišná v 18 bp. Sekvence (*rbcL*) kmene d23009 určeného jako *Gomphonema narodoense*, která pochází z Jižní Korey, je v porovnání s *rbcL* sekvencemi kmenů LEV302 a LEV316 odlišná v 16 bp. Mezidruhová variabilita v kládu *Gomphonema* se pohybuje od 3 do 77 bp.

***Nitzschia palea* (Obrázek 11)**

Sekvence (*rbcL*) kmene LEV017 je identická s *rbcL* sekvencí kmene TCC537 určeného jako *Nitzschia acidoclinatum*, čemuž odpovídá i fylogenetická pozice. Sekvence (*rbcL*) kmene SPAIN A3 určeného jako *Nitzschia palea*, která je zároveň jedinou *rbcL* sekvencí tohoto druhu v původním *rbcL* alignmentu Nakova et al. (2018), se liší v 2 bp od *rbcL* sekvencí kmenů LEV023R a LEV024R a v 4 bp od *rbcL* sekvence kmene LEV041R (na základě morfologie byly všechny tři určeny rovněž jako *N. palea*). Sekvence (*rbcL*) kmene LEV041R se pak liší v 4 bp od *rbcL* sekvence kmene LEV023R a v 1 bp od *rbcL* sekvence kmene LEV024R. Vnitrodruhová variabilita u *Nitzschia palea* byla tedy naměřená 1 až 4 bp.

5 DISKUZE

5.1 Získávání kmenů a DNA

5.1.1 Sběr přírodních vzorků

Sběr přírodních vzorků jsem prováděla dvěma metodami – seškrabem z ponořeného kamene u břehu a získáním nárostu z umělého substrátu, tj. z exponovaných krycích skel. Osvědčila se mi více metoda seškrabu.

Důvody jsou (1) minimální příprava (postačí vyřazené zubní kartáčky s tvrdšími štětinami), (2) snadná údržba nástrojů (pro každou lokalitu samostatný kartáček, po každém odběru vzorků je nutné kartáček důkladně promýt ve vodě bez řas, tj. destilovaná nebo z kohoutku) a (3) nižší počet kroků manipulace se vzorkem (kartáček se seškrabem jsem vymáchala v epruvetě s vodou z dané lokality, v laboratoři jsem pak přírodní vzorek pipetou kapla na agarovou plotnu a poté rozetřela bakteriologickým ředícím roztěrem).

Naproti tomu metodě odběru vzorků z umělého substrátu, tj. exponovaných krycích skel, předcházela (1) časově náročná příprava (bylo nutné nařezat plexisklo, připevnit nařezaná plexiskla k PET lahvím, které pak představovaly bojku, nalepit na plexiskla krycí skla lepicí páskou po jejich obvodě, ukotvit takto připravený aparát v optimální vzdálenosti od břehu, sklíčka exponovat na lokalitě a za několik dnů lokalitu znovu navštívit), (2) časově náročná údržba (po odběru narostlých krycích sklíček bylo nutné řádně očistit všechny části připraveného aparátu před dalším použitím; v několika případech byly exponované substráty odcizeny), (3) vyšší počet kroků instrumentální manipulace se vzorkem, což sebou nese i vyšší riziko kontaminace (krycí sklíčko jsem na lokalitě musela pinzetou přenést do připravené epruvety s trochou vody z dané lokality, v laboratoři jsem pak sklíčko pomocí pinzety přenesla na agarovou plotnu, obtiskla jej a poté rozetřela bakteriologickým ředícím roztěrem).

5.1.2 Úspěšnost procesu od kultivace až po sekvencování

Celkem jsem z lokalit odebrala a kultivovala 40 přírodních vzorků, přičemž jsem ve výsledku pracovala se 47 přírodními vzorky, se započítáním vzorků od Terezy Reimerové. Z těchto přírodních vzorků jsem celkem izolovala 343 jednotlivých kolonií rozsivek, zaplnila jsem jimi celkem 15 pět a dvaceti jamkových serologických destiček,

přičemž jsem ve výsledku pracovala se 17 serologickými destičkami se započítáním izolátů od Terezy Reimerové. Z celkového počtu 393 izolátů kolonií se mi tedy podařilo úspěšně kultivovat asi 80 klonových kultur. DNA izoláty jsem získala ze 43 klonových kultur, přičemž 32 z nich bylo úspěšně osekvcováno. Procentuální úspěšnost procesu od kultivace až po sekvencování je tedy 8 %. Příčinou takové nízké procentuální úspěšnosti může být: (1) vysoká mortalita (rozsivka může při přenesení do nového prostředí zahynout, může být poškozena při manipulaci), (2) substrátová specifita druhů (rozsivky nemusí růst na každém substrátu, jak v přírodě, tak laboratoři – rostlina vs sklíčko, agar vs tekuté médium), (3) časová náročnost při izolaci klonových kultur, (4) kontaminace v kterémkoli stupni procesu, a to zejména bakteriemi, zelenými kokálnými řasami a drobnými druhy prostorově aktivních rozsivek. Zatímco rozsivky rodů jako například *Achnantheidium* a *Gomphonema* se na agaru drží v těsné kompaktní kolonii, druhy jako *Navicula*, *Pinnularia* a *Nitzschia* cestují po celém agaru. Při izolaci tak lze tyto drobné motilní buňky snadno přehlédnout a nasát je spolu s cílovou buňkou. Při amplifikaci DNA rozsivek je také možné narazit na problém (5) druhové specifity míst, na která nasedají primery (Evans et al. 2007, dále zmiňuje například i Kollár et al. 2019 v rámci rodu *Pinnularia*). V takovém případě je nabouráno kritérium DNA barkódingu o univerzálnosti (Mann et al. 2010; Zimmermann et al. 2011).

Všechny zmíněné obtíže jsou jednou z příčin toho, proč aplikace molekulárních metod u rozsivek výrazně zaostává za jejich uplatněním u ostatních řas a sinic. Lze se domnívat, že další a možná významnější příčinou je pak samotný fakt, že rozsivky mají pevné křemičité frustuly, které diatomologům poskytují množství ontogeneticky i fylogeneticky relativně stabilních (tj. v průběhu buněčného cyklu i v rámci jednotlivých kládů) a ve světelném mikroskopu relativně dobře detekovatelných determinačních znaků. To lze považovat za luxus (a zejména pak v minulosti, kdy jiné, než LM metody v taxonomii mikroorganismů prakticky neexistovaly), který taxonomové zaměřeni na většinu ostatních skupin mikroorganismů nemají. V současné éře molekul a superpočítačů se však odhaluje druhá strana této mince. Na morfologii frustul založená taxonomie rozsivek je v diatomologické komunitě zakořeněna tak hluboce, že dokonce i bezmála čtyři dekády od počátku molekulární revoluce (tj. od vyvinutí PCR v roce 1983 Dr. Kary Mullisem) pracuje většina taxonomů specializujících se na rozsivky bez genetických dat. Zdá se, že až četnost objevů (pseudo)kryptické diverzity u rozsivek (Mann et al. 2004, Sarno et al. 2005, Evans et al. 2007, Vanormelingen et al. 2008, Trobajo et al. 2009, Vanelslander et al. 2009, Pouličková et al. 2010, Souffreau et al. 2013, Pinseel et al. 2017, Pinseel et al. 2018,

Amato et al. 2019, Pouličková et al. 2018, Kollár et al. 2019, Pinseel et al. 2019 a dosud nejextrémnější případ Pinseel et al. 2020, kde bylo 867 kmenů druhového komplexu *Pinnularia borealis* z celého světa molekulární delimitací roztříděno do 126 samostatných druhů a extrapolací byl celkový počet druhů tohoto komplexu odhadnut na ca 200-600) pomalu ale jistě stav věci obrací (založeno na Kollár 2020).

5.2 Determinace kmenů

5.2.1 Morfologická determinace

K determinaci rozsivek jsem využívala determinační klíče Krammer & Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, 1991b, 2004) a Hoffmann, Lange-Bertalot & Werum (2011), ve kterých se k determinaci využívají znaky frustuly a ekologické aspekty výskytu rozsivky. Rozsivky jsem nejčastěji určovala do rodu, méně často i do druhu (10 případů z 32 osekvenovaných kmenů). Určování na rodovou úroveň je obecně považováno za spolehlivější a je běžně užíváno v případech, kdy je nutná vyšší taxonomická jistota (např. Vyverman et al. 2007).

Tento způsob determinace hodnotím jako velmi náročný, a to z hlediska času i potřebných zkušeností. Také je nezbytný mikroskop s kvalitní optikou, díky kterému lze zaznamenat jemné struktury frustuly. Mnohé nově popsané druhy rozsivek navíc mají druhově specifické determinační znaky viditelné až při pohledu v SEM (skenovací elektronový mikroskop, např. druhový komplex *Achnantheidium minutissimum* – Hlúbiková et al. 2011; Potapova & Hamilton 2007; Novais et al. 2015). Určování je významně ovlivněno dostupností determinační literatury. Nejvíce literatury je pro střední Evropu díky sérii „Susswasserflora von Mitteleuropa“ (Krammer 1991, Krammer 1991b, Krammer & Lange-Bertalot 1986, Krammer & Lange-Bertalot 1988). Používání těchto klíčů v jiných klimatických pásech vedlo v minulosti k omylům a mylným představám o kosmopolitismu rozsivek (Kociolek & Spaulding 2000). Takový případ ovlivnění morfologické determinace je v angl. literatuře označován jako *force-fitting* (Tyler 1996). Velkou roli hrají i osobní odborné zkušenosti toho, kdo determinuje. O rozdílech ve výsledcích morfologické determinace od 30 různých diatomologů hovoří Prygiel et al. (2020), kde největším zdrojem druhové variability určovaného vzorku po porovnání jsou chyby v determinaci od diatomologů. Poukazuje to na subjektivitu morfologické determinace. Morfologická

determinace je také obtížnější u menších druhů (např. rod *Achnanthydium*), zejména jednali se o malé buňky na konci životního cyklu (Geitler 1937).

5.2.2 Molekulární determinace

Molekulární determinaci hodnotím jako časově úspornější v případě, že by se tento přístup stal rutinní pro početnější tým, kdy se každý člen týmu soustředí na část procesu (např. jeden na izolaci a kultivaci kmenů, další na molekulární techniky apod.). Molekulární determinace na základě DNA barkódingu je limitována obsahem barkódové databáze (Weigand et al. 2019). V případě neúplné databáze nelze očekávat přesné výsledky determinace, pouze přiřazení sekvence k sekvenci nejpodobnější. Ke dni 6. 7. 2020 se v databázi BoLD nachází 2633 DNA sekvencí rozsivek, z toho 2451 záznamů je pojmenovaných, reprezentujících 464 druhů. Formálně popsanych je dnes však minimálně 12 000 druhů (Guiry & Guiry 2012), některé zdroje uvádějí i 25 000 druhů (Kociolek et al. 2018) a sofistikované propočty odhadují, že celkově existuje 30 000 až 200 000 druhů rozsivek (Mann & Vanormelingen 2013). Využití DNA barcodingu jako determinační metody dále limituje i druhová specifita pro využití barcode markerů, resp. specifita místa DNA, kde nasedají primery (ang. *primer binding site*, např. u druhu H z komplexu *Pinnularia gibba* v Kollár et al. 2019). Tento problém může být také jednou z příčin poměrně nízkého procenta úspěšnosti procesu od kultivace klonových kultur až po sekvencování kmenů, které v mém případě činí 8 %. Z těchto důvodů je za současného stavu žádoucí potenciálně nepřesné (zejména kvůli neúplnosti databází) výsledky molekulární determinace podrobovat dalším analýzám, např. studiu fylogenetické pozice studovaných kmenů, srovnání s morfologickou determinací apod. Spolehlivá rutinní molekulární determinace rozsivek (např. DNA barkóding) bude možná až (1) budou druhy rozsivek řádně delimitovány, čehož zjevně mnohdy nebude možné dosáhnout bez molekulárních metod (např. Pinseel et al. 2020) nebo reprodukčních experimentů (např. Mann et al. 2004), (2) bude ověřeno, že determinační genetické markery (např. DNA barkódové markery) mají dostatečné taxonomické rozlišení k jednoznačné determinaci těchto druhů a (3) tato data budou zanesena do veřejně přístupných databází (např. Barcode of Life Database).

5.2.3 Srovnání morfologické a molekulární determinace

Z celkového počtu 32 kmenů se morfologická a molekulární determinace (alespoň jeden z markerů) na rodové úrovni shodovala ve 22 případech, tj. v 69 % (viz Tabulka 4). V případě výrazně odlišné morfologické determinace od determinace molekulární je u těchto kmenů možné, že morfologická a molekulární determinace proběhla u dvou různých druhů z důvodu kontaminace (kmeny, kde mohou být v důsledku kontaminace více než jeden rozsivkový druh jsou označeny v Tabulce 3). Shoda se vyskytuje zejména na rodové úrovni. Na úrovni druhové pak převážně u druhových komplexů (*Nitzschia palea* či *Gomphonema parvulum*). To je zřejmě způsobeno tím, že jsou v této práci na základě morfologie určeny na druhovou úroveň právě druhové komplexy, a z části také tím, že tyto notoricky známé domnělé druhové komplexy (*N. palea*, *G. parvulum*) mají v databázích sekvence, takže jsou lépe geneticky prozkoumány. Příčinou této shody tedy nejspíš není biologie druhů, ale spíše morfologická determinace v této práci a neúplnost databází.

Vzhledem ke stále narůstajícímu počtu objevených kryptických druhů rozsivek (Amato et al. 2019) a subjektivitě morfologické determinace (Prygiel et al. 2020) považují používání pouze morfologické determinace za přístup s nejednoznačnými/nespolehlivými výsledky. Ovšem dokud nebude kvalitně vybudovaná DNA barkód databáze, nebudou ani výsledky DNA barkódingu jednoznačné. Pro přesnou determinaci je tedy v první řadě potřeba rozsivkové druhy řádně delimitovat a formálně popsat, a to ideálně ve smyslu polyfazického přístupu (Komárek et al. 2016), tj. za využití nějaké kombinace morfologických, reprodukčních, molekulárních, fylogenetických, environmentálních, fyziologických a/nebo biochemických dat. Z důvodů dostupnosti (časové a finanční ve srovnání s nutnými náklady na generaci mnoha jiných typů dat) a informativnosti (vzhledem k rozsáhlé kryptické diverzitě) se zdá téměř jisté, že molekulární data budou hrát v tomto ohledu primární úlohu i u rozsivek.

5.3 Fylogenetická pozice a taxonomické hypotézy

Halamphora (Obrázek 5)

Rod *Amphora* byl popsán v roce 1844 (Kützing 1844). V roce 1895 bylo z rodu *Amphora* vyčleněno 9 podrodů, mj. i *Halamphora* (Cleve 1895), a to především na základě morfologie frustuly. V roce 1903 provedl na základě morfologie frustuly a počtu plastidů

změnu v klasifikaci Merechowsky (1903). Nyní rod *Halamphora* zaujímá fylogenetickou pozici jako sesterský taxon řádů Rhopalodiales a Surirellales (Stepanek et al. 2014). Rod *Halamphora* je považován za monofyletický rod a jeho sesterským kládem je skupina, do které se řadí *Amphora semperpalorum* a *Amphora hyalina*, což jsou dva druhy, které jsou fylogeneticky i morfologicky odlišné od *Amphora* s. s. (Stepanek et al. 2014).

Sekvence (*rbcL*) kmene LEV038R byla dle molekulární determinace (BLAST) určena jako *Amphora pediculus* (100% shoda s nejpodobnější sekvencí a překryv jejich délek byl 98 %). Tomu odpovídá i její pozice ve fylogramu a ekologie tohoto druhu. Jak v mém kladogramu (Obrázek 5), tak v kladogramu založeném na konkatenovaném alignmentu SSU rDNA, *rbcL* a *psbC* (Figure 2 v Stepanek a Kociolek 2014) jsou *Amphora pediculus* a *Amphora indistincta* sesterské druhy s vysokou statistickou podporou. Zajímavé je, že rozdíl mezi *rbcL* sekvencemi mého kmene (LEV038R), který je s největší pravděpodobností *A. pediculus*, a sekvencí sesterského kmene určeného rovněž jako *A. pediculus* činí 3 bp, kdežto rozdíl s druhým fylogeneticky nejbližším kmenem určeným jako *A. indistincta* je jen 2 bp. Zdá se tedy, že mezidruhová variabilita *rbcL* může být nižší než ta vnitrodruhová, ač rozdíl 1 bp zřejmě nelze přikládat velký význam. Navíc to lze pravděpodobně přičítat tomu, že překryv délek porovnávaných sekvencí byl v druhém případě, kdy byla srovnávána moje *A. pediculus* s *A. indistincta* jen 90 %. Je možné, byť jde v současnosti o spekulaci, že v chybějících 10 % sekvence by byly další rozdíly. Přesto nižší mezidruhová než vnitrodruhová variabilita v jednotlivých genetických markerech je teoreticky možná, protože různé části genomu se vyvíjejí různě rychle (Wu 2001) a je tak možné, že zrovna *rbcL* v případě těchto blízce příbuzných linií neodráží druhovou úroveň nejlépe. Podporovalo by to tak použití dvoulokusového systému, který byl pro barkóding rozsivek navržen (Mann et al. 2010), protože druhý genetický marker by mohl rozdíl mezi druhy zachytit. Dalším možným vysvětlením by bylo, že *A. pediculus* a *A. indistincta* jsou ve skutečnosti jediným druhem. Tuto možnost rovněž nelze vzhledem k morfologické podobnosti (např. Stepanek & Kociolek 2014) zcela pominout.

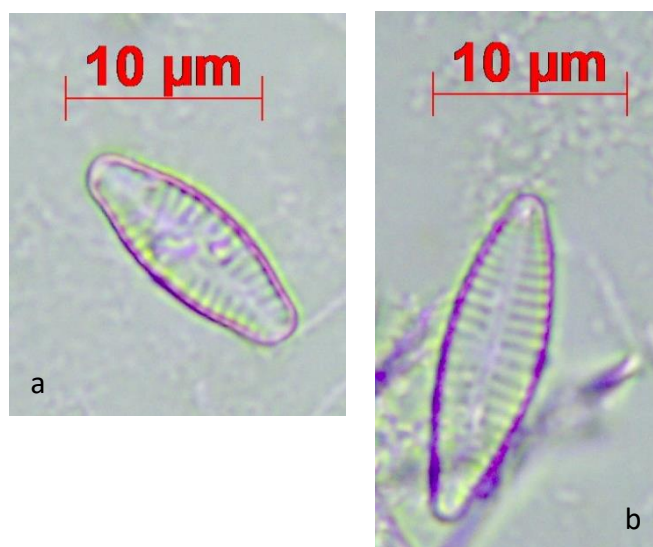
***Achnanthidium, Planothidium; Lemnicola hungarica* (Obrázek 6)**

Pro všechny taxony zobrazené na kladogramu na Obrázku 6 je společná malá velikost frustul (kolem 10 μm). Vzhledem k této velikosti se jedná o morfologicky obtížně determinovatelné taxony prostřednictvím LM. Pro zachycení detailů frustuly významných

z hlediska determinace je zapotřebí SEM (Karthick et al. 2017). Jedná se o rozsivky, které jsou v přírodě velmi početné, některé práce uvádějí že v nárostech tvoří např. *Achnanthydium minutissimum* agg. až 90 % přítomných jedinců (Pouličková et al. 2017), což pro rutinní využití v bioindikaci představuje problém. Proto se diskutuje o tom, zda je pro biomonitoring opravdu nutné určovat do druhů, nebo zda stačí rodová či nižší úroveň. Část vědců navrhuje komplexy rozklíčovat s pomocí molekulárních metod (Potapova & Hamilton 2007), čemuž nahrává i fakt, že se drobné rozsivky rodů *Achnanthydium* a *Planothydium* snadno izolují a velmi dobře rostou v kulturách. To mohou potvrdit i z vlastní zkušenosti. Může to však být způsobeno i tím, že jde často o druhové komplexy (jako např. *A. minutissimum*) a v kultuře tak mohou dobře růst jen některé z obsažených kryptických druhů. Příznivci ekologického přístupu naopak nahrazují určování do taxonů zařazením rozsivek do ekologických funkčních skupin, tzv. *guild*, které byly pro bentos definovány tři: „low profile“, „high profile“ a „motile“ (Passy 2007). Vzhledem k vysokému zastoupení sedimentovaných planktonních rozsivek v nárostech byla později navržena ještě čtvrtá funkční skupina „planktonic“ (Rimet et Bouchez 2012a). Ve spodní části biofilmu („low profile“) se nachází drobné druhy adaptované na horizontální růst. Možnost pohybu (motile guild) a vytváření dlouhých stopek (high profile) pak rozsivky dalších dvou skupin zvýhodňuje v kompetici o zdroje (světlo, živiny). Dosavadní výsledky ukazují, že ekologický přístup je spíše vhodný pro hodnocení globálních změn (eutrofizace, globální oteplování), zatímco detailní taxonomické členění může výrazně zlepšit systémy porovnávající čistotu povrchových vod v rámci nějakého ekoregionu (Pouličková & Manoylov 2019, Pouličková et al. 2017).

Kmeny LEV001, LEV005, LEV007 a LEV008 v kladogramu zauímají pozici v kládu *Achnanthydium*, čemuž odpovídá i molekulární determinace na základě srovnání sekvencí pomocí funkce BLAST. Morfologická determinace se však u kmene LEV005 a LEV008 s výsledkem determinace molekulární neshoduje, ač je dle pořízených fotografií (Obrázek 12) těchto kmenů zjevné, že se nejedná o rozsivky rodu *Achnanthydium*. U těchto dvou kmenů zjevně došlo ke kontaminaci (ať už přímo v kulturách, anebo až při izolaci DNA) rozsivkami rodu *Achnanthydium* a dále k izolaci jejich DNA a k následujícím molekulárním a fylogenetickým analýzám.

Obrázek 12. Fotografie kmene LEV008 (a) dle morfologie určeného jako *Planothidium* sp. a LEV005 (b) dle morfologie určeného jako *Gomphonema* sp.



V původním datasetu (Nakov et al. 2018) se nacházela pouze jedna *rbcL* sekvence rodu *Achnantheidium*, a to druhu *A. minutissimum*. Společně s touto sekvencí tvoří 4 mnou získané sekvence monofyletický klád. Genetická *rbcL* variabilita kládu tvořeného kmeny LEV007, AT196Gel02 a LEV008 je 4–5 bp. Kmeny LEV001 a LEV005 se pak liší v 19 bp, čemuž odpovídá i jejich rozdílná délka větví ve fylogramu. Z toho lze usuzovat, že se může jednat o jiný druh než *Achnantheidium minutissimum*.

Kmenu LEV015 odpovídá dle morfologické i molekulární determinace jeho pozice v kládu *Planothidium*. Pro tento rod je charakteristická výrazná struktura na frustule, tzv. *cavum*. Sesterským kmenem je kmen určený jako *P. frequentissimum* pocházející z Německa. Mezi mým a německým kmenem je v *rbcL* sekvenci rozdíl 1 bp a je tak pravděpodobné, že jde o tentýž druh.

Lemnicola hungarica

Rod *Lemnicola* v současnosti zahrnuje 4 taxonomicky akceptované druhy (Guiry & Guiry 2020). Kromě nominotypického druhu *Lemnicola hungarica* však k žádnému není v Genbanku ani BoLDu žádná sekvence. Sekvence *rbcL* druhu *Lemnicola hungarica* je v původním datasetu (Nakov et al. 2018) pouze jedenkrát. Pochází z přírodního vzorku z Minesoty, USA. Ve fylogramu je sesterská s mojí sekvencí kmene LEV032R, dle molekulárních dat determinovaného jako *Lemnicola hungarica*. Genetická vzdálenost mezi těmito sekvencemi však činí 92 bp, čemuž odpovídá i délka větví ve fylogramu. Přestože se mi podařilo osekvenovat i LSU rDNA kmene LEV032R, žádná jiná LSU rDNA

sekvence *L. hungarica* pro srovnání není k dispozici ani v alignmentu Nakova et al. (2018) a v současnosti (ke dni 15.07.2020) ani v Genbanku a v BoLDu. Moji LSU rDNA sekvenci tak v současnosti nelze s jinou sekvencí *L. hungarica* porovnat. Podle BLASTu je mé LSU rDNA sekvenci nejpodobnější sekvence kmene SPITS_M2AplusB_38, který je určen jako *Achnantheidium digitatum*. Podobnost (tj. Percent Identity) je ovšem jen 88 % a překryv sekvencí (tj. Query Cover) je 94 %.

V každém případě (soudě podle *rbcL*) budí takto veliká genetická vzdálenost podezření, že by *Lemnicola hungarica* mohl být druhovým komplexem. Je však silně vázán na okřehek (*Lemna*; např. Kollár et al. 2015), takže jeho ekologie je spíše uniformní. Na druhou stranu jde o kosmopolitní taxon (Guiry & Guiry 2020). Tato hypotéza, tedy že *L. hungarica* může být ve skutečnosti komplexem několika (pseudo)kryptických druhů, se zdá být nová. V literatuře jsem ji nenašla a zdá se (snad i kvůli malému zastoupení sekvencí *L. hungarica* v databázích), že *L. hungarica* byla dosud diatomology bez výjimky považována za jediný druh. Dala by se testovat pomocí molekulárně-delimitačních metod, k čemuž by ovšem byl zapotřebí poměrně rozsáhlý sampling tak, aby vzniklý dataset pokryl vnitrodruhovou variabilitu potenciálních druhů. Rovněž by v tomto ohledu bylo zajímavé srovnat, zda genetická a geografická struktura populací současného taxonu *Lemnicola hungarica* nějakým způsobem koreluje s genetickou a geografickou strukturou 14 v současnosti akceptovaných druhů okřehku (PlantList 2020).

***Pinnularia* (Obrázek 7)**

Pinnularia se řadí mezi nejpočetnější rody rafidních rozsivek. Na AlgaeBase se nachází 1392 záznamů *Pinnularia* (z toho 753 je taxonomicky akceptováno jako druh; Guiry & Guiry 2018). Rod *Pinnularia* je parafyletický s rodem *Caloneis* (Bruder et al. 2008, Souffreau et al. 2011). Budeme-li tedy počítat celý komplex *Pinnularia*–*Caloneis* jde o druhý nejpočetnější rod, dle počtu záznamů v AlgaeBase (Guiry & Guiry 2018).

Kmen LEV023 už na základě morfologie spadá do skupiny *Pinnularia gibba*. Polyfazický výzkum této skupiny ukázal, že se jedná o komplex více než desítky často (pseudo)kryptických druhů (Kollár et al. 2019). Můj kmen pak morfologicky i geneticky v rámci tohoto komplexu spadá do tzv. terminálního kládu u nějž byla statisticky prokázána menší buněčná velikost, která byla s největší pravděpodobností zděděna od společného předka tohoto kládu (Kollár et al. *accepted*). Srovnáním *rbcL* sekvence mého kmene

LEV023 s polyfázicky delimitovanými druhy skupiny *P. gibba* vyšlo najevo, že nejpodobnější (rozdíl 8-11 bp) jsou druhy označované jako G, H, I (z komplexu *P. acidicola* obývajících vulkanické ostrovy Jižního a Indického oceánu) a Tor4r, která je mému kmeni morfologicky nejpodobnější a jde o drobný druh z Chile, který je zatím určen jen jako *P. sp.* (Kollár et al. *accepted*). Srovnání LSU rDNA sekvencí ukázalo podobnost se stejnými čtyřmi druhy. Musí být důkladněji prozkoumána morfologie (ideálně s nasazením SEM), ale na základě genetiky a velké geografické vzdálenosti ve spojitosti s faktem, že se čím dál více rozsivkových druhů jeví jako geograficky velmi limitované či dokonce endemické (např. Van de Vijver et al. 2005, Vyverman et al. 2010, Kollár et al. 2019, Pinseel et al. 2019) lze vyslovit hypotézu, že můj kmen LEV023 může představovat druh rodu *Pinnularia* vědě dosud neznámý.

***Psammothidium* (Obrázek 8)**

Rod *Psammothidium* byl vyčleněn z rodu *Achnanthes* v roce 1996 na základě morfologie frustuly (Bukhtiyarova & Round 1996). Ke dni 7. 7. 2020 je v databázi AlgaeBase uvedeno celkem 77 druhů (z toho 61 je taxonomicky akceptováno) a 7 variet (Guiry & Guiry 2018). Ke stejnému dni se v databázi BoLD (Ratnasingham & Hebert 2007) nachází 7 sekvencí, z toho 5 pochází z Algologické laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, tedy sekvence, které se mi podařilo získat v rámci této práce. V databázi GenBank se ke stejnému dni nachází celkem 19 sekvencí, sekvence jsou určeny do pěti druhů, a to jako *P. papilio*, *P. abundans*, *P. subatomoides*, *P. chlidanos* či *P. daonense*. Vzhledem k uvedeným počtům je tedy zřejmé, že rod *Psammothidium* je v databázích obsažen relativně málo. Je nutné získat sekvence od většího počtu druhů a srovnat je s morfologickou determinací, která je vzhledem k velmi malé velikosti buněk značně obtížná.

Mnou získané sekvence kmenů LEV052 a LEV009R, dle morfologie obě určené jako *Psammothidium sp.*, zauímají ve fylogramu pozici v kládu *Eolimna*. Mezi sebou se tyto dvě sekvence však liší v 31 bp. Sesterskými skupinami kládu *Eolimna–Psammothidium* ve fylogramu jsou klády se sekvencemi rodu *Sellaphora*, který je již klasickým příkladem kryptické diverzity (Mann et al. 2008). Sekvence *rbcL* rodu *Psammothidium* se v původním

datasetu (Nakov et al. 2018) nevyskytovala žádná. Rod *Psammothidium* byl vyčleněn v roce 1996 na základě revize rodu *Achnanthes* s. l., která spočívala v detailním studiu frustul s použitím SEM (Bukhtiyarova & Round 1996). Název *Psammothidium* byl odvozen od jeho ekologie výskytu, tj. epipsamon (Bukhtiyarova & Round 1996). Rod *Eolimna* byl vyčleněn v roce 1997 na základě studia morfologie frustul ze vzorku pocházejícího z 28 m hlubokého vrtu (Schiller & Lange-Bertalot 1997).

Kmen LEV052 byl získán ze vzorku epilithonu v zatopeném žulovém lomu v obci Kamenná. Kmen LEV009R byl získán z epifytonu chrastice rákosovité (*Phalaris arundinacea*) v zatopené písčité Šlajza. Sekvence kmene LEV009R se liší v 11 bp se sekvencí kmene *Eolimna* sp. (jejíž kód v Genbanku je Styx 1 LCR-S-14-1-1) a ve fylogramu zauímají sesterskou pozici. Tento kmen pochází ze vzorku odebraného na Novém Zélandě.

Na základě nízkého počtu sekvencí rodu *Psammothidium* v databázích, obtížné morfologické determinaci vzhledem k velikosti buněk, rozdílných ekologických a geografických údajů lze vyslovit hypotézu, že rody *Psammothidium* a *Eolimna* vyžadují vyšší pozornost taxonomů, protože může jít o taxony afyletické. K ověření této hypotézy by bylo zapotřebí geograficky, ekologicky a taxonomicky rozšířit sampling (tj. prozkoumat diverzitu polyfázicky), a to ideálně tak, aby byla pokryta i vnitrodruhová genetická variabilita a mohly tak být uplatněny automatizované molekulárně-delimitační metody, jako v případě druhových komplexů rodu *Pinnularia* (Kollár et al. 2019, Pinseel et al. 2020). Tyto metody (např. na koalescenční teorii založené GMYC a PTP; např. Leliaert et al. 2014) však zatím ke studiu rozsivek aplikovali právě jen Kollár et al. 2019 a Pinseel et al. 2020 a jsou proto v diatomologické komunitě relativní novinkou, která ovšem do budoucna může hrát klíčovou roli v rozplétání mnoha taxonomicky komplikovaných skupin včetně komplexů kryptických druhů.

***Navicula* (Obrázek 9)**

Dle počtu záznamů v databázi AlgaeBase je rod *Navicula* s 4572 záznamy (z toho 1453 je taxonomicky akceptováno jako druh) nejpočetnějším rozsivkovým rodem (Guiry & Guiry 2018). V kladogramu na Obrázku 9 se třikrát vyskytuje *Navicula cryptocephala*, a to polyfyleticky. To jen potvrzuje hypotézu, že se jedná o komplex

kryptických/semikryptických druhů (Pouličková et al. 2010). Při zkoumání morfologie frustul pod světelným mikroskopem totiž nelze zaznamenat výraznější morfologické znaky, které by se mohly využít k determinaci. Prokazatelné rozdíly ve stavbě frustuly však lze zaznamenat při použití geometrické morfometrie a SEM (Pouličková et al. 2016). K tvrzení, že se jedná o afyletický taxon (tzn. není monofyletický a vyžaduje taxonomickou revizi; Ebach & Williams 2010) přispívá i odlišná distribuce heterochromatinu v interfázních jádrech buněk u různých populací (Geitler 1958). Díky studii jader (která u rozsivek rozhodně není běžnou metodou pro identifikaci) Geitler rozdělil druh *Navicula cryptocephala* na „rasy“ (z německého rassen) a de facto odhalil dnes diskutovanou kryptickou diverzitu (Pouličková et al. 2016). V tomto případě hovoříme o tzv. pseudokryptických druzích, protože byla nalezena metoda (i když není běžně užívaná), kterou lze druhy rozlišit. Krammer & Lange-Bertalot (1986) uvádí, že je *Navicula cryptocephala* běžný, kosmopolitní, epipelický a euryvalentní druh.

Mnou získané sekvence kmenů LEV028R, LEV018R, LEV020R jsou ve fylogramu na sesterské pozici se sekvencí kmene *Navicula cryptocephala* var. *veneta* (jejíž kód v Genbanku je AT108Gel01) nacházející se v kládu *Navicula* II. Kmen LEV014R je ve fylogramu na sesterské pozici se sekvencí kmene *Navicula cryptocephala* (jejíž kód v Genbanku je HK090) nacházející se v kládu *Navicula* V. Sekvence kmene *Navicula cryptocephala* (HK090) se liší od sekvence kmene *Navicula cryptocephala* var. *veneta* (AT108gel01) v 33 bp. Výskyt druhu *Navicula cryptocephala* je popisován především v epipelonu (Krammer & Lange-Bertalot 1986), ovšem všechny tyto kmeny pochází ze vzorků odebíraných z epifytických nárostů. Nejedná se tedy o epipelické, nýbrž epifytické druhy.

Vzhledem k různé pozici sekvencí *Navicula cryptocephala* ve fylogramu, genetickým vzdálenostem a různé ekologii lze potvrdit, že se jedná o komplex kryptických, pseudokryptických, či semikryptických druhů.

***Gomphonema parvulum* (Obrázek 10)**

Gomphonema parvulum je kosmopolitní a morfologicky vysoce variabilní taxon. Jedná se o druhový komplex, zahrnující bentické druhy, které se nachází ve sladkých, brakických až slaných vodách (Abarca et al. 2014). Abarca et al. (2014) na základě morfologických a molekulárních dat rozdělili taxon *Gomphonema parvulum* na 4 klády,

kteře odpovídalj i geografickému rozšířeni. Tento výsledek odpovídá i závěřům práce Kermarec et al. (2013). K datu 7. 7. 2020 se v databázi AlgaeBase nacházelo 35 záznamů s názvem *Gomphonema parvulum*, včetně variet (Guiry & Guiry 2018). Ke stejnému dni se v databázi BoLD (Ratnasingham & Hebert 2007) nachází 40 sekvencí, z toho 3 pochází z Algologické laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, tedy sekvence, které se mi podařilo získat v rámci této práce. V databázi GenBank se ke stejnému dni nachází celkem 319 sekvencí.

Získané sekvence kmenů LEV302 a LEV316 tvořl klád se sekvencemi kmenů *Gomphonema parvulum* (kód kmene v Genbanku je FD240 a pochází ze vzorku z USA), *Gomphonema lagenula* (kód kmene je D33006 a pochází ze vzorku z Mexika) a *Gomphonema narodoense* (kód kmene je D23009 a pochází ze vzorku z Jižní Korey). Genetická variabilita v tomto kládu je 14–18 bp, resp. 0–18 bp, protože sekvence LEV302 a LEV316 se neliší v žádné pozici.

V původním datasetu (Nakov et al. 2018) se vyskytují dvě *rbcL* sekvence *Gomphonema parvulum* (jejichž kódy v GenBanku jsou FD240 a AT16115), avšak ve fylogramu se vyskytují polyfyleticky. Jejich genetická vzdálenost je 37 bp.

Vzhledem k různé pozici sekvencí ve fylogramu, genetickým vzdálenostem a odlišné geografii lze potvrdit, že se v případě druhu *Gomphonema parvulum* jedná o komplex kryptických druhů a je nutná revize s využitím genetických dat.

***Nitzschia palea* (Obrázek 11)**

Nitzschia palea je běžný, kosmopolitní taxon, vyskytující se ve stojatých i tekoucích vodách (Krammer & Lange-Bertalot 1988; Raschke 1993; Silva-Benavides 1996; Ohtsuka & Fujita 2001; Simkhada & Jüttner 2006). Jedná se o rozšířený druhový komplex (Trobajo et al. 2009). Zatímco některé variety jsou tolerantní k těžkým kovům (Lai et al. 2003) a některé indikují organické znečištění vod (Jüttner et al. 2003; Salomi et al. 2006), jiné variety preferují čisté vody (Potapova & Charles 2007).

V původním datasetu (Nakov et al. 2018) se nachází pouze jedna *rbcL* sekvence *Nitzschia palea* pocházející ze vzorku ze Španělska. S touto sekvencí tvořl mnou získané sekvence LEV041R, LEV024R, LEV021R a LEV023R klád. Genetická variabilita tohoto kládu je 2–15 bp. K odhalení toho, zda jsou linie tohoto kládu druhové, či vnitrodruhové

úrovně by bylo rovněž zapotřebí užít automatizované molekulárně-delimitační metody podobně, jako v případě druhových komplexů rodu *Pinnularia* (Kollár et al. 2019, Pinseel et al. 2020).

6 ZÁVĚR

S ohledem na cíle práce vyvozují z výsledků následující závěry:

1. Izolace a tvorba unialgálních kultur.

Celkem jsem pracovala se 47 přírodními vzorky, z nichž bylo vyizolováno 393 jednotlivých kolonií rozsivek. Z celkového počtu 393 izolátů kolonií se mi podařilo úspěšně kultivovat asi 80 klonových kultur.

2. Izolace, amplifikace a sekvencování DNA.

DNA izoláty jsem získala ze 43 klonových kultur, přičemž 32 z nich bylo úspěšně osekvencováno.

3. Taxonomická determinace kmenů na základě morfologie a DNA.

Nejvyšší procentuální shody výsledků morfologické a molekulární determinace se zpravidla vyskytovaly u sekvencí rozsivek řadících se mezi druhové komplexy. V současnosti se však jeví pravděpodobné, že příčiny nejsou biologické, ale jde spíše o artefakt neúplnosti databází a náročnosti morfologické determinace. V případě determinace na rodovou úroveň byla procentuální shoda u všech barkód markerů vyšší než u determinace na úroveň druhovou. Opět lze za nejčastější příčinu považovat neúplnost současných databází.

4. Obohacení DNA barkódové databáze o všechna nově získaná data.

Všechny získané sekvence byly nahrány do databáze BoLD. Sekvence LSU rDNA byly nahrány ke 32 kmenům. Sekvence *rbcL* byly nahrány ke 22 kmenům. Sekvence *COX1* byly nahrány ke 3 kmenům. Fotografie byly nahrány k 27 kmenům. Taxonomická, geografická a environmentální data byla nahrána ke všem 32 kmenům. Kultury, vouchery a DNA izoláty jsou v současnosti přechovávány na Katedře botaniky PřF UP.

5. Konstrukce molekulárně-fylogenetických stromů.

Za nejdůvěryhodnější z konstruovaných kladogramů považují kladogram založený na *rbcL*, který byl nejdelší a nejkonzervativnější ze zde studovaných markerů. Zjištění fylogenetické pozice nových kmenů umožnilo testování vnitrodruhové a mezidruhové variability genetických markerů a tím i jejich taxonomického rozlišení.

6. Formulace taxonomických hypotéz.

Na základě studia morfologie, molekulárních, ekologických, geografických a fylogenetických dat byly vysloveny hypotézy, které si v budoucnu zaslouží podrobnější studium. Jde zejména o odhalení (např. u *Lemnicola hungarica*) či potvrzení (např. u *Navicula cryptocephala*) potenciální přítomnosti kryptické diverzity, odhalení potenciálně nových druhů (např. v rodě *Pinnularia*) či odhalení možné afylie taxonů (např. u rodů *Psammothidium* a *Eolimna*).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abarca, N., Jahn, R., Zimmermann, J., & Enke, N. (2014). Does the cosmopolitan diatom *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing have a biogeography? *PLoS One*, 9(1), e86885.

Amato, A., Kooistra, W. H. C. F., & Montresor, M. (2019). Cryptic diversity: a long-lasting issue for diatomologists. *Protist*, 170(1), 1-7.

Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., ... & Hering, D. (2012). Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Birk, S., Bonne, W., Borja, A., Brucet, S., Courrat, A., Poikane, S., ... & Hering, D. (2012). Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 18, 31-41.

Bruder, K., Sato, S., & Medlin, L. K. (2008). Morphological and molecular investigations of naviculoid diatoms IV. *Pinnularia* vs. *Caloneis*. *Diatom*, 24, 8-24.

Buczkó, K. (2007). The occurrence of the epiphytic diatom *Lemnicola hungarica* on different European Lemnaceae species. *Fottea Olomouc*, 7(1), 77-84.

Bukhtiyarova, L., & Round, F. E. (1996). Revision of the genus *Achnanthes* sensu lato. *Psammothidium*, a new genus based on *A. marginulatum*: In memory of John Carter who contributed greatly to the discovery of many *Achnanthes* species. *Diatom research*, 11(1), 1-30.

Castresana, J. (2002). GBLOCKS: selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Version 0.91 b. Copyrighted by J. Castresana, EMBL.

Cronquist, A. (1978). Once again, what is a species? *Biosystematics in agriculture*. In *Beltsville Symposia in Agr. Res.* (Vol. 2, pp. 3-20).

Daugbjerg, N., & Andersen, R. A. (1997). A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analyses of chloroplast-encoded *rbcl* sequence data 1. *Journal of Phycology*, 33(6), 1031-1041.

Duff, R. J., Ball, H., & Lavrentyev, P. J. (2008). Application of combined morphological–molecular approaches to the identification of planktonic protists from environmental samples. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(4), 306-312.

Ebach, M. C., & Williams, D. M. (2010). Aphyly: a systematic designation for a taxonomic problem. *Evolutionary biology*, 37(2-3), 123-127.

Eichlerová, Leona. (2018). DNA barcode databáze pro identifikaci rozsivek ze zatopených lomů [online]. Olomouc, 2018 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <<https://theses.cz/id/rp1fs2/>>. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Prof. RNDr. Aloisie Poulíčková, CSc.

Evans, K. M., Wortley, A. H., & Mann, D. G. (2007). An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist*, 158(3), 349-364.

Geitler, L. (1935). Reproduction and life history in diatoms. *The Botanical Review*, 1(5), 149-161.

Geitler, L. (1958). Fortpflanzungsbiologische Eigentümlichkeiten von *Cocconeis* und Vorarbeiten zu einer systematischen Gliederung von *Cocconeis placentula* nebst Beobachtungen an Bastarden. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 105(4), 350-379.

Geitler, L. (1958). Notizen über Rassenbildung, Fortpflanzung, Formwechsel und morphologische Eigentümlichkeiten bei pennaten Diatomeen. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 105(5), 408-442.

Guillard, R. R., & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide c 1, 2. *Journal of Phycology*, 8(1), 10-14.

Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2018). *AlgaeBase*. National University of Ireland, Galway. Dostupné na: <http://www.algaebase.org> (last accessed November 13, 2018).

Hamsher, S. E., Evans, K. M., Mann, D. G., Poulíčková, A., & Saunders, G. W. (2011). Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P. *Protist*, 162(3), 405-422.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.

Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.

Hlúbiková, D., Ector, L., & Hoffmann, L. (2011). Examination of the type material of some diatom species related to *Achnantheidium minutissimum* (Kütz.) Czarn. (Bacillariophyceae). *Algological Studies*, 136(1), 19-43.

Hofmann, G., Werum, M., & Lange-Bertalot, H. (2011). *Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa: Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis; über 700 der häufigsten Arten und ihrer Ökologie*. Gantner.

Jüttner, I., Sharma, S., Dahal, B. M., Ormerod, S. J., Chimonides, P. J., & Cox, E. J. (2003). Diatoms as indicators of stream quality in the Kathmandu Valley and Middle Hills of Nepal and India. *Freshwater Biology*, 48(11), 2065-2084.

Karthick, B., Taylor, J. C., & Hamilton, P. B. (2017). Two new species of *Achnantheidium* Kützing (Bacillariophyceae) from Kolli Hills, Eastern Ghats, India. *Fottea*, 17(1), 65-77.

Kelly, M. G., Cazaubon, A., Coring, E., Dell'Uomo, A., Ector, L., Goldsmith, B., & Kwandrans, J. (1998). Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of applied Phycology*, 10(2), 215.

Kermarrec, L., Bouchez, A., Rimet, F., & Humbert, J. F. (2013). First evidence of the existence of semi-cryptic species and of a phylogeographic structure in the *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing complex (Bacillariophyta). *Protist*, 164(5), 686-705.

Kociolek, J. P. & Spaulding, S., A. (2000). Freshwater diatom biogeography. *Nova Hedwigia* 71:223–241.

Kociolek, J.P., Balasubramanian, K., Blanco, S., Coste, M., Ector, L., Liu, Y., Kulikovskiy, M., Lundholm, N., Ludwig, T., Potapova, M., Rimet, F., Sabbe, K., Sala, S., Sar, E., Taylor, J., Van de Vijver, B., Wetzel, C.E., Williams, D.M., Witkowski, A. & Witkowski, J. 2018. DiatomBase. *Pinnularia* C.G. Ehrenberg, 1843. Dostupné na: <http://www.diatombase.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149208> (last accessed May 25, 2018).

Kollár, J., Fránková, M., Hašler, P., Letáková, M., & Pouličková, A. (2015). Epiphytic diatoms in lotic and lentic waters-diversity and representation of species complexes. *Fottea*, 15(2), 259-271.

Kollár, J., Pinseel, E., Vanormelingen, P., Pouličková, A., Souffreau, C., Dvořák, P., & Vyverman, W. (2019). A polyphasic approach to the delimitation of diatom species: a case study for the genus *Pinnularia* (Bacillariophyta). *Journal of phycology*, 55(2), 365-379.

Kollár, Jan. Osobní rozhovor na téma DNA barcoding a taxonomie. Olomouc 22. 6. 2018 a 18. 5. 2020.

Kollár J., Pinseel E., Vyverman W. a Pouličková A. (*accepted*). A time-calibrated multi-gene phylogeny provides insights into the evolution, taxonomy and DNA barcoding of the *Pinnularia gibba* group (Bacillariophyta). *Fottea*.

Kollár J. (2020). Polyphasic approach to the study of diatom diversity. *Disertační práce*. Univerzita Palackého v Olomouci. 113 pp.

Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346-353.

Krammer, K. (1991). Bacillariophyceae 3 Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. *Susswasser flora von Mitteleuropa*, 2, 1-576.

Krammer, K. (1991). Bacillariophyceae 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. *Sußwasserflora von Mitteleuropa*, 2.

- Krammer, K. Lange-Bertalot, H. (1986). Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenha Uer d. (Eds.) Süßwasser flora von Mitteleuropa, 2, 1.
- Krammer, K., & Lange-Bertalot, H. (1988). Bacillariophyceae 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Fischer, Stuttgart.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lai, S. D., Chen, P. C., & Hsu, H. K. (2003). Benthic algae as monitors of heavy metals in various polluted rivers by energy dispersive X-ray spectrometer. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38(5), 855-866.
- Laurin-Lemay, S., Philippe, H., & Rodrigue, N. (2018). Multiple factors confounding phylogenetic detection of selection on codon usage. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1463-1472.
- Mann, D. G., & Droop, S. J. M. (1996). Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. In *Biogeography of freshwater algae* (pp. 19-32). Springer, Dordrecht.
- Mann, D. G., Thomas, S. J., & Evans, K. M. (2008). Revision of the diatom genus *Sellaphora*: a first account of the larger species in the British Isles. *Fottea*, 8(1), 15-78.
- Mann, D. G. (2010). Discovering diatom species: is a long history of disagreements about species-level taxonomy now at an end?. *Plant ecology and evolution*, 143(3), 251-264.
- Mann, D. G., & Vanormelingen, P. (2013). An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *Journal of eukaryotic microbiology*, 60(4), 414-420.
- Mayr, E. (1947). Ecological factors in speciation. *Evolution*, 263-288.
- Monnier, O., Lange-Bertalot, H., Hoffmann, L., & Ector, L. (2007). The genera *Achnantheidium* Kutzing and *Psammothidium* Bukhtiyarova et Round in the family Achnanthidiaceae (Bacillariophyceae): a reappraisal of the differential criteria. *Cryptogamie-Algologie*, 28(2), 141-158.

Nakov, T., Beaulieu, J. M., & Alverson, A. J. (2018). Insights into global planktonic diatom diversity: The importance of comparisons between phylogenetically equivalent units that account for time. *The ISME journal*, 12(11), 2807-2810.

Novais, M. H., Juetner, I., Van de Vijver, B., Morais, M. M., Hoffmann, L., & Ector, L. (2015). Morphological variability within the *Achnantheidium minutissimum* species complex (Bacillariophyta): comparison between the type material of *Achnanthes minutissima* and related taxa, and new freshwater *Achnantheidium* species from Portugal. *Phytotaxa*, 224(2), 101-139.

Ohtsuka, T., & Fujita, Y. (2001). The diatom flora and its seasonal changes in a paddy field in Central Japan. *Nova Hedwigia*, 97-128.

Pinseel, E., Kulichová, J., Scharfen, V., Urbánková, P., Van de Vijver, B., & Vyverman, W. (2019). Extensive cryptic diversity in the terrestrial diatom *Pinnularia borealis* (Bacillariophyceae). *Protist*, 170(2), 121-140.

PlantList. 2010. Version 1. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Lemna> [cit. 15. 7. 2020].

Potapova, M., & Hamilton, P. B. (2007). Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex 1. *Journal of phycology*, 43(3), 561-575.

Potapova, M., & Charles, D. F. (2007). Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological indicators*, 7(1), 48-70.

Pouličková, A., Hašler, P., Lysáková, M., & Spears, B. (2008). The ecology of freshwater epipellic algae: an update. *Phycologia*, 47(5), 437-450.

Pouličková, A., Špačková, J., Kelly, M. G., Duchoslav, M., & Mann, D. G. (2008). Ecological variation within *Sellaphora* species complexes (Bacillariophyceae): specialists or generalists?. *Hydrobiologia*, 614(1), 373-386.

Pouličková, A., Veselá, J., Neustupa, J., & Škaloud, P. (2010). Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. *Protist*, 161(3), 353-369.

- Pouličková, A., Neustupa, J., Hašler, P., Tomanec, O., & Cox, E. J. (2016). A new species, *Navicula lothargeitleri* sp. nov., within the *Navicula cryptocephala* complex (Bacillariophyceae). *Phytotaxa*, 273(1), 23-33.
- Pouličková, A., Letáková, M., Hašler, P., Cox, E., & Duchoslav, M. (2017). Species complexes within epiphytic diatoms and their relevance for the bioindication of trophic status. *Science of The Total Environment*, 599, 820-833.
- Pouličková, A., Kollár, J., Hašler, P., Dvořák, P., & Mann, D. G. (2018). A new species *Pinnularia lacustrigibba* sp. nov. within the *Pinnularia subgibba* group (Bacillariophyceae). *Diatom Research*, 33(3), 273-282.
- Pouličková, A., & Manoylov, K. (2019). Ecology of Freshwater Diatoms—Current Trends and Applications. *Diatoms: Fundamentals and Applications*, 289-309.
- Prygiel, J., Carpentier, P., Almeida, S., Coste, M., Druart, J. C., Ector, L., ... & Lalanne-Cassou, C. (2002). Determination of the biological diatom index (IBD NF T 90–354): results of an intercomparison exercise. *Journal of Applied Phycology*, 14(1), 27-39.
- Raschke, R. L. (1993). Diatom (Bacillariophyta) community response to phosphorus in the Everglades National Park, USA. *Phycologia*, 32(1), 48-58.
- Reimerová, Tereza. (2019). DNA barcode databáze pro identifikaci rozsivek z pískoven [online]. Olomouc, 2019 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: <<https://theses.cz/id/uc0n0c/>>. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta tělesné kultury. Vedoucí práce prof. RNDr. Aloisie Pouličková, CSc.
- Rimet, F., & Bouchez, A. (2012). Biomonitoring river diatoms: implications of taxonomic resolution. *Ecological indicators*, 15(1), 92-99.
- Salomoni, S. E., Rocha, O., Callegaro, V. L., & Lobo, E. A. (2006). Epilithic diatoms as indicators of water quality in the Gravataí river, Rio Grande do Sul, Brazil. *Hydrobiologia*, 559(1), 233-246.
- Schiller, W. & Lange-Bertalot, H. (1997). *Eolimna martinii* n. gen., n. sp. (Bacillariophyceae) aus dem Unter-Oligozan von Sieblos/Rhon im Vergleich mit ähnlichen rezenten Taxa. *Paläontologische Zeitschrift* 71(3): 163-172.

- Schlick-Steiner, B. C., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H., & Steiner, F. M. (2007). Without morphology, cryptic species stay in taxonomic crypsis following discovery. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(22), 391-392.
- Scholin, C. A., Herzog, M., Sogin, M., & Anderson, D. M. (1994). Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). ii. sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene 1. *Journal of phycology*, 30(6), 999-1011.
- Silva-Benavides, A. M. (1996). The use of water chemistry and benthic diatom communities for qualification of a polluted tropical river in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 395-416.
- Simkhada, B., Jüttner, I., & Chimonides, P. J. (2006). Diatoms in lowland ponds of Koshi Tappu, Eastern Nepal—relationships with chemical and habitat characteristics. *International review of hydrobiology*, 91(6), 574-593.
- Souffreau, C., Verbruggen, H., Wolfe, A. P., Vanormelingen, P., Siver, P. A., Cox, E. J., ... & Vyverman, W. (2011). A time-calibrated multi-gene phylogeny of the diatom genus *Pinnularia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 866-879.
- Stepanek, J. G., & Kociolek, J. P. (2014). Molecular phylogeny of *Amphora* sensu lato (Bacillariophyta): an investigation into the monophyly and classification of the amphoroid diatoms. *Protist*, 165(2), 177-195.
- Trobajo, R., Clavero, E., Chepurinov, V. A., Sabbe, K., Mann, D. G., Ishihara, S., & Cox, E. J. (2009). Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, 48(6), 443-459.
- Trobajo, R., Mann, D. G., Clavero, E., Evans, K. M., Vanormelingen, P., & McGregor, R. C. (2010). The use of partial *cox 1*, *rbc L* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology*, 45(4), 413-425.
- Tyler, P. A. (1996). Endemism in freshwater algae. In *Biogeography of freshwater algae* (pp. 127-135). Springer, Dordrecht.

- Vanormelingen, P., De Clerck, O., Pinseel, E., Urbanková, P., D'hondt, S., & Vyverman, W. (2015). Phylogenetic species delimitation in the *Eunotia bilunaris/flexuosa* species complex (Bacillariophyta). In 7th European congress of Protistology (ECOP).
- Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., ... & Strand, M. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of the Total Environment*, 678, 499-524.
- Wheeler, Q. D., & Meier, R. (Eds.). (2000). *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Columbia University Press.
- Will, K. W., & Rubinoff, D. (2004). Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20(1), 47-55.
- Wu, C. I. (2001). The genic view of the process of speciation. *Journal of evolutionary biology*, 14(6), 851-865.
- Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity & Evolution*, 11(3), 173.
- Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol*, 2(10), e354.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Přehled odběrových lokalit se základní charakteristikou.

Příloha 2: Přehled voucherů z přírodních vzorků.

Příloha 3: Přehled voucherů z klonových kultur.

Příloha 4: Prokol izolace DNA, PCR, ELFO a purifikace DNA dle Jana Kollára.

Příloha 5: Vizualizace DNA fragmentů pod UV světlem.

Příloha 6: Zakoreněný strom zkonstruovaný metodou Maximum Likelihood na základě alignmentu 51 COX1 sekvencí.

Příloha 1. Přehled odběrových lokalit se základní charakteristikou.

Místo (zkratka)	souřadnice	datum sběru	lokalita	substrát	odběr
Kamenná (K)	49.2763950 N, 16.0682833 E	IV – X 2017	lom	kámen, umělý	LV
Častotice (Č)	49.2400328 N, 16.0858833 E	IV – X 2017	lom	kámen, umělý	LV
Rudíkov (R)	49.2905692 N, 15.9416931 E	IV – X 2017	lom	kámen, umělý	LV
Pocoucov (P)	49.2327586 N, 15.8972033 E	IV – X 2017	lom	kámen, umělý	LV
Kojatín (Ko)	49.2463297 N, 16.0199117 E	IV – X 2017	lom	kámen, umělý	LV
Výkleky (V)	49.5567403 N, 17.4826322 E	4. V. 2017	lom	kámen	LV
Šlajza (Š)	49.3111450 N, 17.3809925 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Medkovy rybníky (MR)	49.3049067 N, 17.4106822 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Hrubý rybník (Hráza) (HR)	49.2890436 N, 17.4106431 E	VI – X 2018	štěrkovna	makrofyta	TR
Krčmaň (KR)	49.5141350 N, 17.3223483 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Poděbrady (PO)	49.6268356 N, 17.2252822 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem (M)	49.6240425 N, 17.2506342 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Hlušovice	49.6366086 N, 17.2668097 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Příkazská štěrkovna (PŘ)	49.6598461 N, 17.1652467 E	VI – X 2018	štěrkovna	makrofyta	TR
Náklo (N)	49.6719686 N, 17.1329761 E	VI – X 2018	štěrkovna	makrofyta	TR
Kaluhy (KA)	49.5275331 N, 17.2618150 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Nemilanská pískovna (NE)	49.5462144 N, 17.2711672 E	VI – X 2018	pískovna	makrofyta	TR
Chomoutovské jezero (CH)	49.6536075 N, 17.2383083 E	VI – X 2018	štěrkovna	makrofyta	TR

Pozn. Odběr = odebírala, LV = Leona Vaculíková, TR = Tereza Reimerová; substrát umělý = exponovaná krycí skla.

Příloha 2. Přehled voucherů z přírodních vzorků.

kód voucheru	lokality	substrát
NV-040517-LE	Nová Ves	kámen
V-040517-LE	Výkleky	kámen
Č-041717-LE	Častotice	kámen
Ko-041717-LE	Kojatín	kámen
P-041717-LE	Pocoucov	kámen
R-041717-LE	Rudíkov	kámen
K-051717-LE	Kojatín	kámen
Č-052217.A-LE	Častotice	umělý
Č-052217.B-LE	Častotice	umělý
P-052217.A-LE	Pocoucov	umělý
P-052217.B-LE	Pocoucov	umělý
R-052217-LE	Rudíkov	kámen
K-082217.S-LE	Kojatín	umělý
K-082217-LE	Kojatín	kámen
Č-082217.S-LE	Častotice	umělý
Č-082217-LE	Častotice	kámen
R-082217.S-LE	Rudíkov	umělý
R-082217-LE	Rudíkov	kámen
P-082217.S-LE	Pocoucov	umělý
P-082217-LE	Pocoucov	kámen
Ko-082217-LE	Kojatín	kámen
Ko-092517-LE	Kojatín	kámen
R-092517-LE	Rudíkov	kámen
K-092517-LE	Kamenná	kámen
P-092517-LE	Pocoucov	kámen
Č-100217-LE	Častotice	kámen
Ko-100217-LE	Kojatín	kámen
Ko-100217-LE	Kojatín	kámen
K-100217-LE	Kamenná	kámen
P-100217-LE	Pocoucov	kámen
R-100217-LE	Rudíkov	kámen
Š-062518-TR	Šlajza	chrastice rákosovitá
MR-062518-TR	Medkovy rybníky	pryskyřník lýtý
HR-062518-TR	Hrubý rybník (Hráza)	kamyšník přímořský
KR-062518-TR	Krčmaň	stolístek klasnatý
PO-062518-TR	Poděbrady	růžkatec ponořený
M-062518-TR	Pískovny mezi Ol. a Ch.	rukev obojživelná
H-062518-TR	Hlušovice	žabník
PŘ-062518-TR	Příkazská štěrkovna	vrbina penízková
N-062518-TR	Náklo	stolístek klasnatý
KA-062518-TR	Kaluhy	jmelí
NE-062518-TR	Nemilany	ostřice
PO-062518-TR	Poděbrady	stolístek
PO-071718.2-TR	Poděbrady	zevar vzpřiměný
PO-071718.3-TR	Poděbrady	olše
PO-073128.S-TR	Poděbrady	umělý
PO-073128.S2-TR	Poděbrady	umělý
PŘ-073128.S-TR	Příkazy	umělý
PŘ-073128.S2-TR	Příkazy	umělý

Příloha 3. Přehled voucherů z klonových kultur.

kód voucheru	kód kmene	lokality	substrát	morfologická determinace
V-I.-1-090517	LEV001	Výkleky	kámen	<i>Achnanthydium</i> sp.
V-I.-2-090517	-	Výkleky	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
V-I.-4-090517	-	Výkleky	kámen	-
V-I.-5-090517	LEV005	Výkleky	kámen	<i>Gomphonema parvulum</i>
V-I.-6-090517	-	Výkleky	kámen	<i>Gomphonema parvulum</i>
V-I.-7-090517	LEV007	Výkleky	kámen	<i>Achnanthydium</i> sp.
V-I.-8-090517	LEV008	Výkleky	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
K-II.-9-090517	-	Kamenná	kámen	-
K-II.-10-090517	-	Kamenná	kámen	<i>Achnanthydium</i> sp.
K-II.-13-090517	-	Kamenná	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
K-II.-14-090517	LEV014	Kamenná	kámen	-
K-II.-15-090517	LEV015	Kamenná	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
Č-II.-16-090517	-	Častotice	kámen	-
Č-II.-17-090517	LEV017	Častotice	kámen	<i>Nitzschia</i> sp.
Č-II.-18-090517	LEV018	Častotice	kámen	<i>Eunotia mucophila</i>
Č-II.-22-090517	-	Častotice	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
Č-II.-23-090517	LEV023	Častotice	kámen	<i>Pinnularia sinistra</i>
R-II.-25-090517	LEV025	Rudíkov	kámen	<i>Fragilaria</i> sp.
52	LEV052	Kamenná	kámen	<i>Psammothidium</i> sp.
54	-	Kamenná	kámen	<i>Psammothidium</i> sp.
68	-	Kamenná	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
70	LEV070	Kamenná	kámen	<i>Psammothidium</i> sp.
72	LEV072	Kamenná	kámen	<i>Psammothidium</i> sp.
139	-	Kamenná	umělý substrát	<i>Planothydium</i> sp.
140	LEV140	Kamenná	umělý substrát	<i>Planothydium</i> sp.
148	LEV148	Kamenná	umělý substrát	<i>Planothydium</i> sp.
269	-	Kamenná	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
270	-	Kamenná	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
273	LEV273	Kamenná	kámen	<i>Planothydium</i> sp.
300	LEV300	Častotice	umělý substrát	<i>Gomphonema parvulum</i>
302	LEV302	Častotice	umělý substrát	<i>Gomphonema parvulum</i>
316	LEV316	Častotice	umělý substrát	<i>Gomphonema parvulum</i>
9R-6/11/19	LEV009R	Šlajza	makrofyta	<i>Psammothidium</i> sp.
14R-6/11/19	LEV014R	Medkovy rybníky	makrofyta	<i>Navicula</i> sp.
18R-6/11/19	LEV018R	Hrubý rybník	makrofyta	<i>Navicula</i> sp.
20R-6/11/19	LEV020R	Hrubý rybník	makrofyta	<i>Navicula</i> sp.
21R-6/11/19	LEV021R	Hrubý rybník	makrofyta	<i>Nitzschia palea</i>
23R-6/11/19	LEV023R	Hrubý rybník	makrofyta	<i>Nitzschia palea</i>
24R-6/11/19	LEV024R	Hrubý rybník	makrofyta	<i>Nitzschia palea</i>
28R-6/11/19	LEV028R	Nemilanská p.	makrofyta	<i>Navicula</i> sp.
32R-6/11/19	LEV032R	Příkazská š.	makrofyta	<i>Achnanthydium</i> sp., <i>Platessa ziegleri</i>
38R-6/11/19	LEV038R	Příkazská š.	makrofyta	<i>Halamphora coffeaeformis</i>
41R-6/11/19	LEV041R	Pískovny Ol. a Ch.	makrofyta	<i>Nitzschia palea</i>

Pozn. Pískovny Ol. a Ch. = Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem; Nemilanská p. = Nemilanská pískovna; Příkazská š. = Příkazská štěrkovna. Pomlčka („-“) ve sloupci kód kmene znamená, že nebyla získána DNA.

Příloha 4. Prokol izolace DNA, PCR, ELFO a purifikace DNA dle Jana Kollára.

Molecular technics for diatom research

Author: Jan Kollár

Version: 4th January 2019

Legend:

- Algolab - flowbox
- Molecular lab 1
- Molecular lab 2

Cultures > DNA Extraction > PCR > ELFO > DNA Purification > DNA Sequencing

I. DNA Extraction Protocol (Duff et al. 2008 - modified)

1. Transfer small amount of clonal cultures into sterile labeled 1.5-ml microtubes.
2. Centrifuge the microtubes at RPM = 15,000 for 10 min. Pour off the medium.
3. Stir the InstaGene Matrix using magnetic stirrer. Add 100 µl of InstaGene Matrix into the microtubes with a pellet. (Do not forget to stir the InstaGene prior this step)
4. Heat the samples at 95°C for 5min to lyse the cells (use thermoblock).
5. Let the tubes cool on ice for approximately 1 min (prepare the ice in advance).
6. Centrifuge at RPM = 15,000 at room temperature for 2min.
7. Add 0.5 g of zirconium beads and shake 3.5 minutes in the beadbeater with a frequency of 30Hz.
8. Centrifuge at RPM = 15,000 at room temperature for 2min.
9. Transfer supernatant to a sterile labeled 1.5-ml microcentrifuge tube (prepare the microtubes in advance). Avoid transferring of the pellet with zirconium beads
10. Utilize the samples immediately in PCR or preserve them at -20°C.

II. Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. Print PCR protocol for particular molecular marker.
2. Calculate the volumes of reagents for the Master mix (i.e. Emerald, primers and sterile water) according to the number of DNA isolates. (Do not forget to add control and few extra samples)
3. Get the reagents and DNA isolates out of the freezer in advance.
4. Transfer the Master mix reagents into sterile 1.5-ml microtube and vortex it.
5. Transfer 39 µl of the Master mix into each PCR microtube.
6. Add 1 µl of template DNA from your DNA isolates into each PCR microtube.
7. Centrifuge, vortex, and centrifuge all PCR microtubes and put them into thermocycler.
8. Select the cycling program according to the molecular marker in focus and start the PCR.
9. Store PCR products in refrigerator at ca. 8°C.

III. Gel Electrophoresis (ELFO)

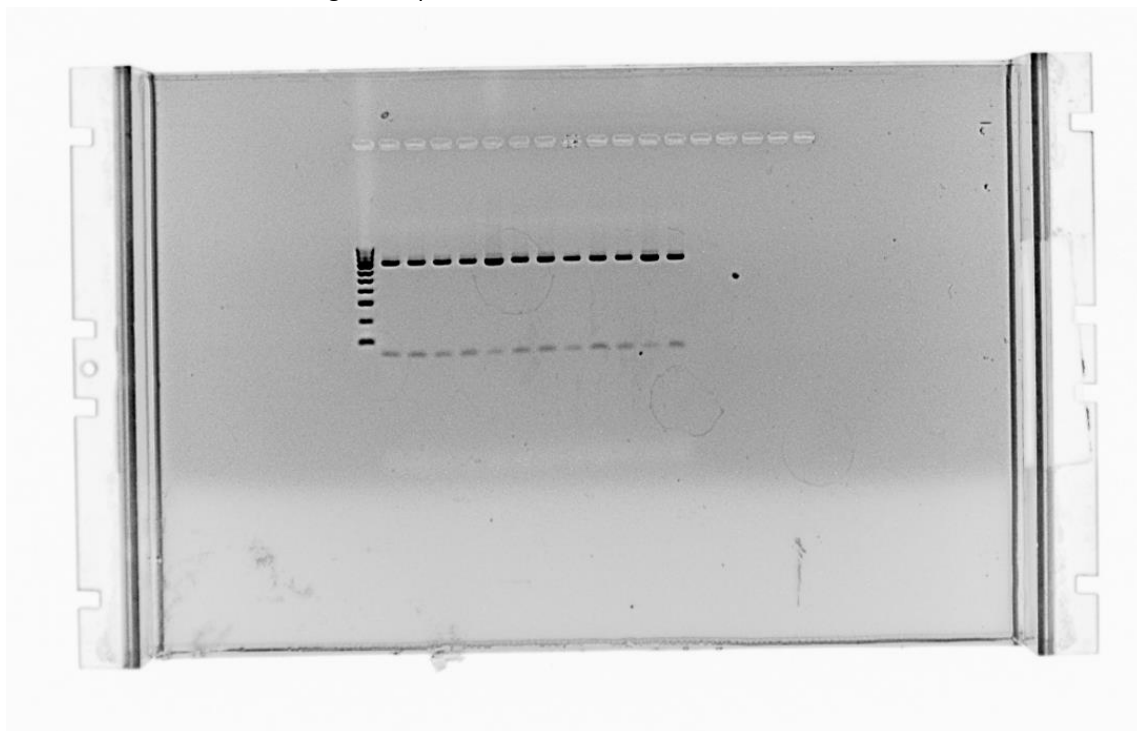
1. For medium-sized tray measure 1.5 g of agarose powder and mix it with 100 ml of 0.5X TAE buffer to prepare 1.5% agarose solution.
2. Microwave the solution for 1-2 minutes and let it cool down for 5 minutes.
3. Add 1.5 µl of SimplySafe dye into hot liquid gel and stir on magnetic stirrer.
4. Pour solution into casting tray and place the comb.
5. Let the gel solution cool down for 15-30 minutes at room temperature.
6. Place stiffed gel into the tray and make sure it is covered with 0.5X TAE buffer.
7. Vortex and centrifuge the PCR products.
8. Load 5 µl of the molecular weight marker into one lane (HyperLadder).
9. Load 5 µl of PCR products into the gel.
10. Run gel at 100V for 40 minutes (or at 200V for 20 minutes).
11. Visualize DNA fragments with UV light.

IV. DNA Purification (GenElute™ PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich, Inc.)

1. Get PCR products out of the freezer.
2. Thoroughly vortex the reagents. If any reagent has formed a precipitate, warm at 55-65°C until the precipitate dissolves and allow to cool to room temperature.
3. Insert a GenElute plasmid mini spin column (with a blue o-ring) into a labelled 2-ml collection tube. Add 0.5 ml of the Column Preparation Solution to each mini spin column.
4. Centrifuge at RPM=15,000 for 1 min and discard the eluate. Retain the collection tube.
5. In a different microtube, mix 100 µl of Binding Solution to 20 µl of the PCR product and vortex.
6. Transfer the solution into the binding column. Centrifuge for 1 minute and discard the eluate. Retain the collection tube.
7. Place the binding column into the collection tube and add 0.5 ml of diluted Wash Solution. Centrifuge for 1 min and discard the eluate. Retain the collection tube.
8. Place the binding column into the collection tube. Centrifuge for 2 min to remove excess ethanol. Discard any residual eluate as well as the collection tube.
9. Transfer the column to a new labelled collection tube.
10. Apply 50 µl of Elution Solution to the center of each column. Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge the column for 1 min.
11. The purified PCR product is now present in the eluate and ready for use or storage at -20 °C.

Ad DNA Sequencing: For LSU rDNA send samples with primers D1R, D2C-R, T16N and T24U. For rbcL send PCR products with DPrbcL1-F, RbcL13-F, RbcL17-R and DPrbcL7-R. For cox1 send primers GazF2 and KEtmR. Concentration of the primers is same as in PCR, i.e. 5 µM when using Emerald Master Mix.

Příloha 5. Vizualizace DNA fragmentů pod UV světlem.



Příloha 6. Zakořeněný strom zkonstruovaný metodou Maximum Likelihood na základě alignmentu 51 *COX1* sekvencí. Alignment vznikl spojením datasetu, který byl využit ke konstrukci dosud nejobsáhlejší molekulární fylogeneze rozsivek vůbec (Nakov et al. 2018) a sekvencí kmenů, které byly nově izolovány pro potřeby této diplomové práce. Klády jsou zkolabovány na úroveň rodů a ty, které obsahují nově izolované kmeny jsou označeny šedou barvou a hvězdičkou. Hodnoty u uzlů jsou statistické podpory v procentech (Ultrafast Bootstrap Support). Zobrazeny jsou jenom podpory větší, než 75 %. Některé outgroup klády nejsou zobrazeny.

