

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



**DNA barcode databáze pro identifikaci rozsivek
ze zatopených lomů**

DNA barcode database for identification of diatom species inhabiting flooded quarries

Bakalářská práce

Leona Eichlerová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Olomouc 2018

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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Aloisie Poulíčkové, CSc. a s použitím citované literatury.

V Kamenné dne 20. 4. 2018

.....

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji paní Prof. RNDr. Aloisii Pouličkové, CSc. za obětavou pomoc, cenné rady a odborné vedení této práce. Také děkuji doktorandům z algologického oddělení za seznámení s metodami práce v laboratoři. Velké díky patří i majitelům vybraných lokalit za umožnění provádět zde výzkum. V neposlední řadě děkuji rodičům za jejich podporu po celou dobu studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Leona Eichlerová

Název práce: DNA barcode databáze pro identifikaci rozsivek ze zatopených lomů

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědná fakulta

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

Rok obhajoby: 2018

ABSTRAKT

DNA barcoding je molekulární metoda využívající krátkého úseku DNA, tzv. barcode markeru, k identifikaci a determinaci organismů. Pro efektivní použití této metody v biomonitoringu je podmiňující dobře vybudovaná databáze zahrnující morfologická, molekulární a ekologická data o jednotlivých druzích. V této práci byla zpracována rešerše k tématu a jako příprava na diplomovou práci byly vyzkoušeny a optimalizovány metody a získány první klonové kultury. Byly získávány vzorky nárostových rozsivek ze zatím málo prozkoumaného typu lokality, a to ze zatopených lomů. Na základě morfologické determinace bylo na lokalitách zaznamenáno 102 taxonů rozsivek. Ze vzorků byly izolovány klonové kultury, které se stanou předmětem detailního studia v navazující diplomové práci, tj. izolace DNA, získání DNA barcode markerů, mikrofotografií, morfometrických a ekologických dat.

Klíčová slova: Rozsivky, DNA barcoding, barcode marker, zatopené lomy, databáze.

Počet stran: 66

Počet příloh: 16

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

First name and surname of the author: Leona Eichlerová

Name of the thesis: DNA barcode database for identification of diatom species inhabiting flooded quarries

Type of thesis: Bachelor

Workplace: Department of Botany, Faculty of Science

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

Year of defence: 2018

ABSTRACT

DNA barcoding is a molecular method using a short fragment of DNA for identification of species. The fragment of DNA is called barcode marker. A database containing morphological, molecular and ecological data is necessary for effective use of this method. This thesis summarises the topic of DNA barcoding in diatom taxa. As a preparation for future research, the methods were optimised and first clonal cultures were isolated. The samples of epilithic diatoms were collected from flooded quarries, which represent overlooked biotopes with unexplored diversity. In total, 102 diatom taxa were identified using morphological approach. Clonal cultures isolated from the samples will be studied in future research, which will focus on development of DNA barcode database, namely obtaining DNA barcodes, photographic documentation of frustules and morphometric and ecologic data summarization.

Keywords: Diatoms, DNA barcoding, barcode marker, flooded quarries, database.

Number of pages: 66

Number of appendices: 16

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD.....	8
CÍLE PRÁCE.....	9
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA STUDOVANÉ SKUPINY.....	10
1.1 EKOLOGIE ROZSIVEK.....	11
1.2 VYUŽITÍ ROZSIVEK.....	11
2 DNA BARCODING U ROZSIVEK.....	13
2.1 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	13
2.2 PRINCIP METODY DNA BARCODING.....	14
2.3 ORGANIZACE A PROCES ZAŘAZENÍ ZÍSKANÉHO BARCODE MARKERU DO KNIHOVNY.....	15
2.4 VÝHODY DNA BARCODINGU.....	16
2.5 VYUŽITÍ DNA BARCODINGU.....	17
3 BARCODE MARKERY.....	18
3.1 COI.....	18
3.2 SSU rDNA.....	19
3.3 LSU rDNA.....	20
3.4 ITS rDNA.....	21
3.5 RBCL.....	23
4 LOKALITY.....	24
4.1 CHARAKTERISTIKA OBLASTI.....	24
4.2 POPIS JEDNOTLIVÝCH LOKALIT.....	25
4.2.1 Častotice.....	25
4.2.2 Kamenná.....	25
4.2.3 Kojatín.....	25
4.2.4 Nová Ves.....	26
4.2.5 Pocoucov.....	26
4.2.6 Rudíkov.....	26
4.2.7 Výkleky.....	27
5 METODIKA.....	28
5.1 TERÉNNÍ ČÁST.....	28
5.2 LABORATORNÍ ČÁST.....	29
5.2.1 Tvorba trvalých preparátů.....	29
5.2.2 Další laboratorní zpracování.....	30
6 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	32
ZÁVĚR.....	36
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	37
SEZNAM PŘÍLOH:.....	50

ÚVOD

Druhové složení společenstev rozsivek hraje důležitou roli při biomonitoringu. Dosavadní praxí je determinace rozsivek na základě morfologie. Morfologický přístup je ovšem poměrně časově náročný a je podmíněn znalostmi kvalifikovaných odborníků. Také vlivem subjektivní determinace se tento morfologický přístup stává ne příliš výhodným. V posledních letech je snahou diatomologů usnadnit proces determinace, a to skrze využívání molekulárních metod. Takovéto využití je ale podmíněno existencí informací o každém druhu ve smyslu polyfázického přístupu, tj. morfologie, molekulární data, rozmnožování a ekologie. Důležitým bodem je tedy vytvoření referenčních knihoven, ve kterých budou zaznamenány tyto údaje. V Evropě se vytvořila skupina diatomologů DIADEM, kteří si dali za cíl vytvořit systém biomonitoringu, který bude založen na barcodingu bentických rozsivek. Iniciativa je nyní ve stadiu vytváření protokolů a norem na vzorkování a stavbu barcodingové databáze. Také Česká republika má v iniciativě své zastoupení (Prof. RNDr. Aloisie Pouličková, CSc.). Naší snahou je také přispět informacemi do databáze.

Bakalářská práce je přípravou pro navazující diplomovou práci. Jejím cílem je především shromáždit informace související s DNA barcodingem u rozsivek, osvojit si práci v terénu i následné zpracování vzorků v laboratoři. Cílem celkové práce (tj. bakalářské i diplomové) je zjištění druhového složení rozsivek ze zatopených lomů, a to pomocí komplexního přístupu, tzn. kombinací morfologického i molekulárního přístupu. Zároveň bude snahou přispět získanými daty do barcodingové databáze.

CÍLE PRÁCE

Bakalářská práce je koncipována jako příprava na práci diplomovou. Cílem bakalářské práce je především shromáždění potřebného materiálu a nabytí praktických zkušeností při práci v terénu i v laboratoři. Celý proces je rozdělen do dvou částí:

I. část (bakalářská práce):

1. Shromáždění dosavadních znalostí ve formě literární rešerše.
2. Sběr vzorků v terénu.
3. Tvorba trvalých preparátů a kultivace získaných vzorků.
4. Determinace rozsivek na základě morfologie.

Diplomová práce bude mít základ v získaných znalostech a dovednostech. Získané klonové kultury rozsivek budou podrobeny molekulárním analýzám. Zjištěná data pak budou srovnána s morfologickým přístupem determinace. Práci by měly tvořit následující kroky:

II. část (diplomová práce):

1. Izolace a tvorba unialgálních kultur.
2. Izolace DNA a následující molekulární analýzy.
3. Sekvenování DNA.
4. Determinace na základě srovnání získaných dat s daty v referenčních knihovnách, popř. obohacení referenčních knihoven o nová data.
5. Vyhodnocení druhového složení zatopených lomů, srovnání morfologického a molekulárního přístupu determinace rozsivek.

1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA STUDOVANÉ SKUPINY

Rozsivky (Bacillariophyceae) jsou fotoautotrofní jednobuněčné hnědé řasy, které se spadají do infraříše Stramenopila, které je součástí superskupiny tzv. SAR (klád zahrnující Stramenopila, Alveolata a Rhizaria). Významným charakteristickým znakem je pro rozsivky křemičitá schránka, tzv. frustula. Rozsivky se nachází ve většině vodních habitatů, a to jak sladkovodních, tak mořských, ale i v půdě (Schulz et al. 2016; Kawecka & Olech 1993) či jako aeroplankton (Sharma et al. 2006). Rozmach rozsivek nastal zřejmě v období křídy zhruba před 100 milionem let (Gross 2012). Původnější jsou rozsivky centrické, zatímco penátní druhy byly datovány na konec křídové éry, tzn. před zhruba 70 miliony lety (Kalina & Váňa 2005). Řadí se mezi jednu z nejvíce diverzifikovaných skupin eukaryot (Kooistra & Medlin, 1996). Odhaduje se, že existuje až 200 000 druhů rozsivek (Mann & Droop 1996; Mann & Vanormelingen 2013). Vzhledem k tomu, že se dnes kromě determinace založené na morfologii frustuly určují druhy pomocí molekulárních metod, spousta druhů ještě čeká na své objevení či popsání, především druhy kryptické. Dle typu frustuly rozsivky dělíme na penátní a centrické. Centrické rozsivky mají paprscitou symetrii, penátní jsou bilaterálně symetrické. Buňky rozsivek se mohou vyskytovat soliterně či v koloniích, které mohou vznikat díky slizu, jenž si buňky rozsivek samy produkují. K fotosyntéze využívají chloroplasty obsahující chlorofyl a + c₁, c₂, c₃, β-karoten a xantofyly, z nichž mezi nejvýznamnější se řadí fukoxantin, diatoxantin a diadinoxantin (Kalina & Váňa 2005). Rozmnožování rozsivek probíhá nepohlavním dělením. Při vegetativním dělení se velikost buněk části populace zmenšuje. Dělení probíhá do okamžiku, kdy rozsivka dosáhne pohlavní zralosti a frustula se zmenší asi na třetinu původní velikosti. V takovém okamžiku se začne rozsivka množit pohlavně, pokud jsou vhodné podmínky prostředí a pokud jsou přítomny další kompatibilní jedinci. U centrických rozsivek probíhá oogamický pohlavní proces, u penátních rozsivek je pohlavní proces isogamický (Kalina & Váňa 2005).

1.1 Ekologie rozsivek

Životní strategie sladkovodních rozsivek zahrnuje planktonní i bentické druhy, (Zimmermann et al. 2015). Bentické druhy se mohou vyskytovat na různých typech substrátu. Podle toho se pak dělí např. na epipsammon (na písku), epilithon (na kamenech), epifyton (na rostlinách), epipelon (na jemných sedimentech dna) a epizoon (na zvířatech; Pouličková et al. 2008). Některé druhy mají širokou ekologickou valenci, zatímco některé jsou úzce vázány ke specifickým environmentálním podmínkám (Zimmermann et al. 2015), např. druhy rodu *Eunotia* preferují vody s kyselým pH, *Pinnularia borealis* a *Hantzschia amphioxys* jsou aerofytické. U blízce příbuzných druhů se mohou velmi lišit jejich environmentální nároky (Vanellander et al. 2009). Konkrétní skladba rozsivkových společenstev a jeho dynamika bývá indikátorem změn prostředí, ve kterém se vyskytují. Impulsem pro změnu mohou být např. globální změny klimatu, změna v přísunu živin či zvyšující se tlak antropogenního původu (Eiler et al. 2013).

1.2 Využití rozsivek

Vzhledem k rozmanitým strukturám frustul se rozsivky dříve používaly k testování kvality mikroskopů (De Tommasi et al. 2017). Dnes je škála jejich využití mnohem širší.

Fyzikální vlastnosti frustul se staly předmětem výzkumů v oborech nanotechnologií, např. frustuly centrických rozsivek jako mikročočky (De Stefano et al. 2007; De Tommasi et al. 2008). Zjištěná fotoluminiscence frustul je využívána při realizaci optických senzorů a biosenzorů (Gale et al. 2009). Frustuly také mají schopnost velmi efektivně sbírat světlo, čehož se bude moci využívat při vyvíjení nových solárních buněk (Toster et al. 2013).

Diatomit, neboli křemelina, je usazená hornina utvořená frustulami odumřelých buněk rozsivek. Má porézní strukturu (Zhou et al. 2015), čehož se využívá např. při filtraci či jako izolačního materiálu. Bylo zjištěno, že přírodní diatomit má velký potenciál k odstranění absorpcí textilních barev v odpadních vodách (Erdem et al. 2005). Diatomit se také přidává do zubních past (De Tommasi et al. 2017). Fosilních nálezů rozpoznatelných frustul rozsivek jako mikrofosilií se využívá při studiu sedimentárních vrstev hornin. Takto získaných poznatků se poté využívají například při sledování závislosti výskytu různých vrstev na výskytu ropy či jiných surovin (Kalina & Váňa 2005).

Nezastupitelnou roli hrají rozsivky při biomonitoringu. Protože patří mezi nejvíce rozšířené a diverzifikované skupiny eukaryot, využívá se jejich rozličných specifických ekologických nároků pro hodnocení čistoty povrchových vod (Kelly et al. 1998). Determinace rozsivek v rutinním biomonitoringu je založena na morfologii, která je časově náročná a vyžaduje hluboké znalosti a zkušenosti. Situaci komplikuje i nárůst počtu nově objevených druhů, které jsou obtížně rozlišitelné ve světelném mikroskopu. Díky rozvoji molekulárních metod se při biomonitoringu nabízí využití sekvenování nové generace (Kermarrec et al. 2014; Zampella et al. 2007). Takovéto využití je ale podmíněno existencí informací o každém druhu ve smyslu polyfázického přístupu, tj. morfologie, molekulární data, rozmnožování, ekologie.

2 DNA BARCODING U ROZSIVEK

2.1 Současný stav problematiky

Správná determinace rozsivek na druhové úrovni je klíčová pro jejich využití v biomonitoringu. Existují sice názory, že na rutinní biomonitoring postačí rodová úroveň, ale jemnější taxonomické rozlišení bezesporu přináší zpřesnění takových studií (Pouličková et al. 2017). Identifikace druhů je založena na morfologii a morfometrii schránek ve světelném mikroskopu, která vyžaduje znalosti a zkušenosti. Evropská rozsivková flóra je relativně dobře známá a k identifikaci slouží klíče na určování rozsivek (Krammer & Lange Bertalot 1986; 1988; 1991a; 1991b; 2004; Hoffmann, Werum & Lange-Bertalot 2011). I přes rozsáhlou literaturu je určení některých druhů problematické, znaky u podobných druhů se mohou překrývat, lišit se mohou populace téhož druhu a ke změnám dochází i v průběhu životního cyklu (Babanazarova et al. 1996; Medlin et al., 1991; Pouličková et al. 2008). Nezkušené badatelé se tak mohou dopouštět chyb (Schoeman et al. 1984; Morales, 2001). Ze základních morfologických a morfometrických charakteristik je životním cyklem nejvíce ovlivnitelná délka buněk a obrys schránek. Během vegetativního dělení se rozsivky zmenšují a jejich obrys se zjednodušuje (Mann et al. 2010). Naopak šířka buněk a počet strií na 10 μm jsou znaky poměrně stálé (Veselá et al. 2009).

Kompletní životní cyklus a tedy i celková morfologická variabilita rozsivek je však známa u méně než 1 % popsáných druhů (Mann et al. 2010). Aktuální poznatky ukazují, že existuje mnoho kryptických druhů, jejichž existence byla prokázána pomocí molekulárních metod (Kermarrec et al. 2013; Mann 2010).

Pod pojmem kryptické druhy rozumíme ty druhy, které nejsou rozlišitelné na základě morfologie. Mohou být geneticky odlišné či odděleny reprodukční bariérou, ačkoli jsou morfologicky shodné. Pseudokryptické druhy označují ty, u nichž se našel způsob jak je rozlišit, většinou vyžadující použití speciálních technik, které se v rutinním monitoringu nepoužívají. Jde např. o geometrickou morfometrii, nebo zkoumání struktury interfázního jádra a podobně (Pouličková et al. 2010; Pouličková et al. 2016).

První známé případy kryptických a pseudokryptických druhů rozsivek byly zveřejněny v roce 1999 (Mann 1999). Terminologii semikryptických a pseudokryptických druhů vysvětluje práce (Evans et al. 2007). Nejznámějším případem kryptické diverzity je

penátní epipelická rozsivka *Sellaphora pupula* agg. (Behnke et al. 2004; Mann 1989; Mann & Droop 1996; Mann 1999). Několikaleté studium jejich populací v příměstském rybníčku Blackford Pond v Edinburghu prokázalo koexistenci 9 morfotypů rozsivky *Sellaphora pupula* agg., žijících sympatricky a 6 z nich bylo popsáno jako nové druhy (Mann et al. 2004). Koexistence několika kryptických druhů je pravděpodobně umožněna jejich sezónní dynamikou v průběhu roku (Špačková et al. 2009). Ačkoli se tyto druhy zdají morfologicky téměř totožné, existuje mezi nimi reprodukční bariéra, vykazují různé stupně genetické příbuznosti či se liší v citlivosti vůči parazitům. Molekulární data v kombinaci s fosilními nálezy odhadují, že jejich diverzifikace probíhala v průběhu nejméně 12 milionů let (Behnke et al. 2004).

Poměrně vysoce spolehlivými metodami, které dokáží odhalit tyto kryptické a pseudokryptické druhy, jsou molekulární metody (Mann et al. 2010). Vzhledem k tomu, že se molekulární metody stávají dostupnější a levnější, lze předpokládat, že by v budoucnu při biomonitoringu mohl jednoduchý laboratorní protokol nahradit zdlouhavou práci u mikroskopu. Předpokladem jsou ovšem kvalitně vybudované barcode knihovny. Koncept DNA barcoding byl poprvé navržen v práci Hebert et al. (2003). U rozsivek byl článek týkající se metody DNA barcoding poprvé publikován v roce 2007 (Evans et al. 2007). Pro DNA barcoding nepředstavuje problém morfologický polymorfismus, morfologicky kryptické druhy ani fenotypově plastické druhy (Mann et al. 2010).

2.2 Princip metody DNA barcoding

DNA barcoding je molekulární metoda využívající k determinaci taxonu jedince krátký fragment DNA, tzv. barcode marker. Ideální barcode marker lze snadno amplifikovat a osekvenovat jedním čtením. Také musí být obklopen neměnnými konzervovanými oblastmi, na které bude moci nasednout primer (Zimmermann et al. 2011). Primer je krátký úsek DNA, který je kompatibilní s konkrétním úsekem DNA a iniciuje replikaci DNA. Například pro amplifikaci oblasti V4 genu SSU rDNA se používají primery M13F a D512R. Pro amplifikaci celého SSU rDNA pak M13F a D978R (Zimmermann et al., 2011).

Další nezbytnou vlastností barcode markeru pro využití při determinaci je pak rozlišovací schopnost na úrovni druhu (Hebert et al. 2003; Moritz & Cicero 2004). Tato

schopnost se označuje jako taxonomické rozlišení (angl. též discriminatory power; Hamsher et al. 2011). Dalšími důležitými faktory jsou univerzálnost, tj. úspěšné použití markeru v celé studované skupině, časová a finanční nenáročnost a pokud možno snadno interpretovatelné výsledky (Mann et al. 2010).

Využití metody DNA barcodingu pro identifikaci druhů ve vzorku však předchází shromáždění informací a charakterizování jednotlivých druhů rozsivek pomocí příslušného barcode markeru. Takové informace by mohly být dostupné ve formě databáze.

Pro DNA barcoding rozsivek a jiných organismů mikroskopických rozměrů je kritickým momentem získání dostatečného množství DNA. Dostatečnou biomasu pro izolaci DNA získáváme pomnožením rozsivek v unialgálních kulturách, tj. kultury s jedním druhem rozsivky. Existuje sice metoda získání DNA z jedné buňky, ale použitím této metody se ztrácí možnost určit jedince klasickým způsobem a přiřadit tak DNA k určitému druhu. Proto samotné izolaci DNA předchází mnoho kroků, které jsou popsány v metodice.

2.3 Organizace a proces zařazení získaného barcode markeru do knihovny

Důležitým milníkem v rozvoji DNA barcodingu bylo založení společnosti Consortium of the Barcode of Life (CBOL; Hajibabaei et al. 2007). CBOL byl založen v květnu roku 2004 a zahrnuje více než 120 organizací ze 45 států (Ratnasingham & Hebert 2007).

Cílem tohoto mezinárodního spolku výzkumných organizací je podpora rozvíjení DNA barcodingu jako prostředku k druhové identifikaci. Neméně důležitým je také online datový systém pro získané DNA barcode markery Life Data Systems (Ratnasingham & Hebert 2007). Snahou zmíněných organizací je v podstatě shromažďování vzorků z různých taxonů doplněných informacemi zahrnujícími především popisy lokality či fotografie, z čehož se pak tvoří tzv. barcode knihovny (Hajibabaei et al. 2005).

Aby mohl být získanému vzorku oficiálně přiřazen barcode status a mohl být zařazen do tzv. barcode knihovny, musí splňovat těchto 7 kritérií (Ratnasingham & Hebert 2007):

- (1) musí být uvedeno jeho druhové jméno,
- (2) katalogové číslo a název instituce,
- (3) data týkající se sběru (datum sběru, souřadnice místa sběru, jméno osoby, která vzorek odebírala),
- (4) jméno osoby, která vzorek determinovala,
- (5) COI sekvence s nejméně 500 bp (toto kritérium je již překonáno, resp. pro různé taxony organismů jsou vhodné různé barcode markery),
- (6) primery použité při PCR reakci,
- (7) zařazení do evidence.

Důležitým krokem bylo také založení internetového informačního portálu The Barcode of Life Data System (BOLD). Jedná se o portál, který umožňuje vkládání, uchování, analýzu a publikaci DNA barcode protokolů. Dochází zde ke shromažďování molekulárních, morfologických, ekologických a geografických dat. Jedná se o volně přístupný portál pro všechny zájemce o DNA barcoding (Ratnasingham & Hebert 2007).

2.4 Výhody DNA barcodingu

Srovnávání sekvencí DNA barcode je oproti srovnávání a popisu morfologických znaků, jejichž hodnocení je často velmi subjektivní, mnohem příznivější pro společný dialog diatomologů, neboť barcode sekvence podává jednoznačnou informaci (Mann et al. 2010).

Značným urychlením může DNA barcoding pomoci při práci taxonomů. Klasické taxonomické přístupy identifikace a determinace vyžadují především sběr morfologických a ekologických dat a jejich porovnávání mezi taxony. Při této práci je nutná hluboká znalost studovaných taxonů. Zatímco barcode analýzy, vyžadující v podstatě stejný postup u všech taxonů, mohou být rutinně prováděny zaškolenými laboranty bez hlubších znalostí studovaných skupin (Hajibabaei et al. 2007; Mann et al. 2010). Podmínkou jsou ovšem dobře vybudované referenční knihovny pro takto studované skupiny.

Další výhodou DNA barcodingu je stanovení nejen kvalitativní, ale i kvantitativní analýzy daného vzorku, resp. kromě zjištěného seznamu druhů ve vzorku můžeme zjistit

i v jakém množství jsou dané druhy ve vzorku zastoupeny (Creach et al. 2006). V takovém případě je zapotřebí kvantitativní PCR (Creach et al. 2006).

2.5 Využití DNA barcodingu

DNA barcoding nalézá využití kromě již zmíněné taxonomie také při fylogenetických analýzách, populačních studiích (Evans et al. 2007) či biomonitoringu (Zimmermann et al. 2015). DNA barcode markery obvykle kvůli malému počtu bází nemají dostatečný fylogenetický signál pro analýzu evoluční příbuznosti taxonů (Hajibabaei et al. 2006). Ačkoli se barcode sekvence analyzují fylogenetickými metodami (např. neighbourjoining), výsledky těchto analýz v žádném případě nelze považovat za spolehlivou fylogenetickou hypotézu. DNA barcoding však může upozornit na přehlížené či nové druhy, identifikovat je, a tak přispět fylogenetice i studiu biologické diverzity (Hajibabaei et al. 2007).

Při populačních studiích se uplatňují markery mitochondriální DNA, neboť mitochondriální DNA je haploidní a děděna od jednoho rodiče (Avise 2004). DNA barcoding nedokáže plně zodpovědět otázky týkající se úrovně populací, avšak může poskytnout jistý vhled do druhové diverzity (Hajibabaei et al. 2007).

Důležitou roli DNA barcoding získává také při biomonitoringu, kde konkuruje tradičním morfologickým metodám (Zimmermann et al. 2015). Pro biomonitoring se začíná využívat tzv. metabarcoding, resp. eDNA (environmental) barcoding (Kerमारrec et al. 2014). Metabarcoding je kombinací DNA barcodingu s metodou sekvenování HTS, angl. high-throughput sequencing (Rivera et al. 2018). Metoda HTS umožňuje sekvenování milionů DNA fragmentů získaných při PCR amplifikaci přírodního vzorku najednou. Získaná data se pak porovnávají s daty v referenčních knihovnách, jejichž existence a zpracovanost podmiňuje efektivní využívání metabarcodingu pro biomonitoring (Zimmermann et al. 2015).

3 BARCODE MARKERY

Pro DNA barcoding u rozsivek doposud nebyl objeven marker, který by byl ideální pro všechny rody (Guo et al. 2015). U rozsivek zatím byly nejčastěji použity tyto markery: *COI*, SSU rDNA, V4 SSU rDNA, LSU rDNA, ITS rDNA a *rbcL* (Pawlowski et al. 2016; Mann et al. 2010; Zimmermann et al. 2015). Pro efektivní amplifikaci je většinou nutné použít alespoň dva markery (Guo et al. 2015). Momentálními favority jsou V4 SSU rDNA (Zimmermann et al., 2011), *rbcL*-3P, D1–D3 LSU rDNA (Mann et al. 2010), přestože jejich použití není plně univerzální (Hamsher et al. 2011).

3.1 *COI*

Elektrontransportní řetězec, který probíhá na membránách mitochondrií, se skládá ze 4 komplexů (označovaných I, II, III, IV). V komplexu IV se nachází enzymatický komplex cytochrom c oxidáza. Skládá se z několika podjednotek a jeho hlavní funkcí je oxidace cytochromu c. Vzniklou energii pak využívá k tvorbě protonového gradientu. Mitochondriální gen kódující podjednotku I cytochrom c oxidázy se běžně označuje jako *COI* (nebo *coxI*) a právě tento gen se dnes hojně využívá při metodě DNA barcoding. V organizaci the Barcode of Life Initiative (BOLI) byl prvním markerem zvoleným pro DNA barcoding (Moniz & Kaczmarek 2009).

COI je pro DNA barcoding hojně využívaný z několika důvodů. Mitochondriální genom se oproti genomu jadernému vyvíjí mnohem rychleji, což zvyšuje jeho potenciál pro studium druhově specifických oblastí u mitochondriálního genomu (Chantangsi et al. 2007). Rychlost evoluce u mitochondriálních genů, ale i genů chloroplastů se však mezi různými taxony liší (Bruder & Medlin 2007). Vzhledem k tomu, že se mitochondrie rozmnožují nepohlavně binárním dělením, nedochází u nich k sexuální rekombinaci DNA. Proto jejich DNA mnohem méně podléhá inzerci, deleci a dalším genovým přestavbám, které pak vnášejí do sekvence změny, jež komplikují interpretaci (Hebert et al. 2003; Saunders 2005). Zároveň je tento gen dostatečně variabilní a umožňuje tak studium příbuznosti (Ehara et al. 2000). Také lze díky němu detekovat potencionálně kryptické taxony (Evans et al. 2007).

Pro zástupce živočišné říše se úsek DNA nacházející se na 5' konci *COI* (označuje se jako *COI*-5P) o délce 648 bp stal dokonce primární barcode sekvencí (Ratnasingham

& Hebert 2007). Osvědčil se také u oddělení Rhodophyta (Robba et al. 2006) či houbových organismů (Seifert et al. 2007). U vyšších rostlin se neosvědčil (Chase et al. 2005; Kress et al. 2005; Newmaster et al. 2006).

Úspěšnost použití *COI* jako barcode markeru u rozsivek se u různých taxonů liší. Bylo zjištěno, že gen *COI-5P* je schopen rozlišit blízké příbuzné linie, jako jsou např. u rodu *Frustulia* (Urbanková & Veselá 2013) či druhových komplexů *Nitzschia palea* agg. (Trobajo et al. 2010) a *Sellaphora pupula* agg. (Evans et al. 2007). Naopak neosvědčila se v případě *Navicula cryptocephala* agg. (Pouličková et al. 2010). Analýza vyšších taxonů s použitím *COI* markeru však nebyla zaznamenána. Navíc stále neexistují primery pro amplifikaci *COI*, které by byly vhodné pro širší škálu taxonů u rozsivek. V již zmiňované studii Guo et al. (2015) došlo k amplifikaci *COI* pouze jedním párem primerů, což bylo následně použito pouze pro potvrzení shlukových analýz některých studovaných druhů rozsivek. Oproti tomu u 22 studovaných taxonů rodu *Sellaphora* byl *COI* jako barcode marker úspěšný (Evans et al. 2007). Důvodem obtížného hledání univerzálního primeru pro *COI* gen je malé množství dostatečně konzervovaných oblastí, na které by se mohl primer připojit (Zimmermann et al. 2011). Vysoká variabilita lokusu *COI* může být způsobena častým výskytem intronů a introgresí bakteriálních genů (Ravin et al. 2010; Armbrust et al. 2004; Bowler et al. 2008).

3.2 SSU rDNA

Ribosom se skládá z velké (Large Sub-Unit; LSU) a malé podjednotky (Small Sub-Unit; SSU), které jsou tvořené rRNA a proteiny. Ribosomální RNA malé podjednotky je kódována genem SSU rDNA (též 18S rDNA dle její sedimentační konstanty, jejíž jednotkou je Svedberg, [S]). Celková velikost SSU rDNA je cca 1800 bp (Zimmermann et al. 2011). Úsek zahrnující oblast V4 SSU rDNA, který byl ve studii Zimmermann et al. (2011) navržen jako barcode marker, má velikost 390–410 bp. Úsek V4 SSU rDNA je pro barcoding dobře přístupný, neboť se nachází mezi známými dobře konzervovanými místy. V těchto místech nedochází často k mutacím, a to u většiny skupin rozsivek, proto se stává ideálním místem pro připojení primerů (Zimmermann et al. 2011). Podle těchto autorů jsou z hlediska univerzálnosti pro amplifikaci V4 SSU rDNA rozsivek nejvhodnější primery označované jako D512F 18S a D978R 18S, které tuto oblast ohraničují. Mezi těmito konzervativními místy genu SSU rDNA se nachází již zmiňovaná variabilní oblast

V4 SSU rDNA. Zde probíhá velké množství mutací, následkem toho je vysoká koncentrace informací ve velmi krátkém úseku (Alverson et al. 2006).

Chceme-li studovat získané PCR produkty pomocí analýzy HTS (high-throughput screening), je nutné, aby měly úseky délku zhruba 400 bp. Samotná oblast V4 SSU rDNA má asi 60 bp (Zimmermann et al. 2011). Délka barcode markeru je stále předmětem výzkumu, např. studie Hajibabaei et al. (2006) vytvořila barcode o délce 100 pb, který je stále možno použít i pro HTS analýzu.

Gen SSU rDNA se stal barcode markerem v mnoha rozličných skupinách; organismů, např. u želvušek (Tardigrada; Blaxter et al. 2004), hlístic (Nematoda; Floyd et al. 2002) a potencionálně také rozsivek (Bacillariophyceae; Zimmermann et al. 2011). Využití V4 oblasti je podstatným krokem pro environmetální DNA barcoding, neboť umožňuje mezidruhové rozlišení ve vzorku (Zimmermann et al. 2011). Ze všech genů rozsivek je databáze SSU rDNA jednou z nejrozsáhlejších, neboť je tento gen široce používán ve fylogenetice rozsivek (Behnke et al. 2004; Beszteri et al. 2001; Kooistra & Medlin 1996; Sorhannus 2007; Medlin & Kaczmarek 2004). Gen SSU rDNA je díky své nízké intraspecifické variabilitě a zároveň vysoké interspecifické variabilitě často používán k odhadům relativních četností a diverzity druhů v přírodních vzorcích (Zimmermann et al. 2011; Jahn et al. 2007).

3.3 LSU rDNA

Geny kódující rRNA velké ribozomální podjednotky (Large Sub-Unit ribosomal DNA; LSU rDNA) se nachází v jádře a jsou označovány dle obvyklé sedimentační konstanty produktu 5S, 5,8S a 28S. Označení LSU rDNA se v literatuře obvykle používá pro nejdelší z těchto tří genů (tj. 28S rDNA). Pro přehlednost budu ale níže užívat LSU rDNA obecně pro geny kódující rRNA velké podjednotky (tj. 5S, 5,8S a 28S rDNA) a budu-li mluvit o konkrétním z nich, pak ho budu specifikovat (např. 28S LSU rDNA). Stejně jako SSU rDNA je i LSU rDNA často používána ve fylogenetických analýzách při studiu vyšších taxonomických úrovní řas (např. obrněnek, Dinophyceae; Edvardsen et al. 2003), včetně rozsivek (Sorhannus 2004; Alverson et al. 2006; Alverson et al. 2007).

Pro identifikaci druhů pomocí DNA barcodingu se využívá především tzv. D1–D3 oblasti genu pro LSU rDNA (Trobajo et al. 2009; Beszteri et al. 2005; Amato et al. 2007).

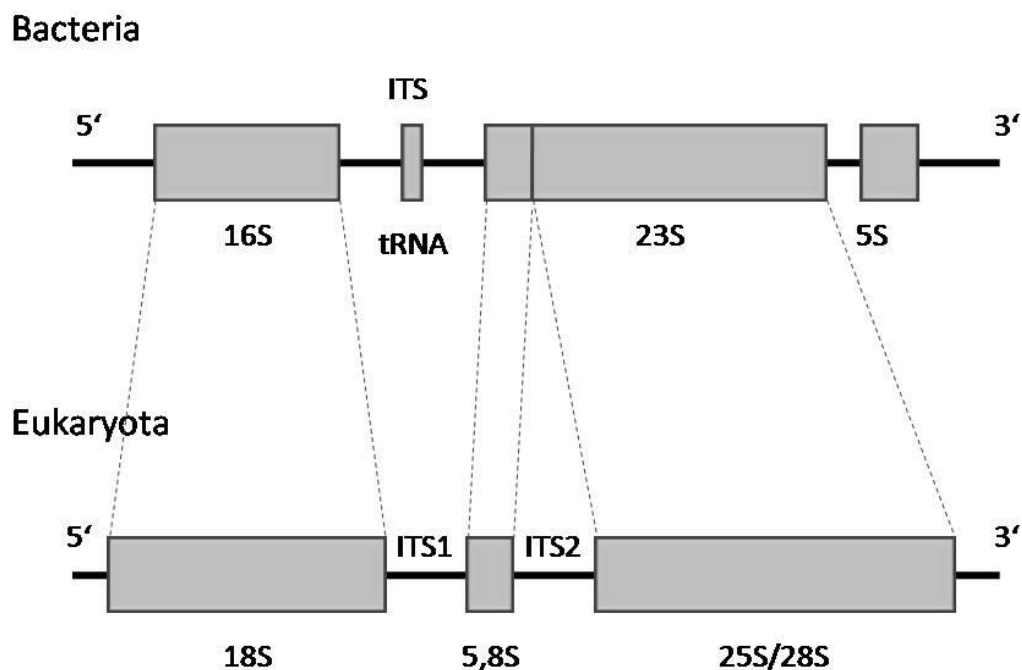
Využití nachází také při screeningu přírodních vzorků (McDonald et al. 2007). Díky tomuto dvojitému přínosu je 28S LSU rDNA vhodnějším kandidátem jako barcode marker než SSU rDNA (Hamsher et al. 2011). Délka oblasti D1–D3 28S LSU rDNA je zhruba 800 bp (Hamsher et al. 2011), avšak tato délka se v rámci rodů liší. Při studiu je pozornost zaměřena především na variabilní oblast D2/D3 28S LSU rDNA, která má zhruba 613 bp (Hamsher et al. 2011). Univerzální primery pro D2/D3 28S LSU rDNA oblast vytvořili Harper & Saunders (2001). Tato oblast je dle Hamsher et al. (2011) vhodná pro analýzu přírodních vzorků, neboť se u řas snadno amplifikuje i sekvenuje, poskytuje lepší rozlišení taxonů než pouze data získaná na základě morfologie a zároveň nabízí možnou detekci kryptických druhů (Hamsher et al. 2011).

Použití oblasti D2/D3 28S LSU rDNA jako barcode markeru je doporučováno v kombinaci s jiným barcode markerem (např. s *rbcL*-3P), neboť sám neposkytuje požadované taxonomické rozlišení (Hamsher et al. 2011). Společně s SSU rDNA barcode markerem poskytovaly dostatečné rozlišení vyšších taxonů, zatímco na nižších úrovních byly méně informativní (Alverson et al. 2007).

Gen5,8S LSU rDNA se často používá v kombinaci s tzv. internal transcribed spacers (ITS1 a ITS2) oblastmi rDNA. ITS rDNA bude více rozvinuto v následující kapitole.

3.4 ITSrDNA

Internal transcribed spacers (ITSs) rDNA jsou oblasti, které jsou sice přepsány do pre-ribosomální RNA (pre-rRNA), ale během dalšího vývoje ve zralou ribosomální RNA jsou odstraněny a ve finálním ribosomu se tak neobjevují (Lafontaine & Tollervey 2001). Organizace pre-rRNA u Eukaryota je znázorněna na Obrázku 1. Pro srovnání je zde uvedena i organizace pre-rRNA u Bacteria.



Obrázek 1: Organizace úseku pre-rRNA (upraveno dle Lafontaine & Tollervey 2001)

Studie Zechman et al. 1994 byla první, kde byla použita sekvence ITS rDNA k determinaci taxonomické úrovně u rozsivek, konkrétně u rodu *Stephanodiscus*. Při analýzách zjistili, že ITS2 rDNA (294–303 bp) je více variabilní a delší než ITS1 rDNA (231–239 bp). Jelikož je v oblasti ITS rDNA poměrně vysoká substituční rychlost, tzn. jsou velmi variabilní, a zároveň se jedná o krátké úseky rDNA, stávají se vhodným nástrojem k řešení intraspecifických a interspecifických vztahů (Zechman et al. 1994).

ITS rDNA oblasti se jako barcode markery obvykle používají v kombinaci s dalším úsekem rDNA, např. s SSU rDNA (Behnke et al. 2004). Moniz & Kaczmarek (2009) považují za nejvhodnější barcode marker ITS2 rDNA + 5,8S LSU rDNA oblast, neboť ji podle jejich studie lze bez obtíží amplifikovat a její malý fragment stačí k rozlišení blízce příbuzných rodů či druhů, konkrétně tato studie probíhala u 22 rodů a 28 druhů. Někteří autoři (Behnke et al. 2004; Evans et al. 2007; Hamsher et al. 2011) však uvádí problémy při amplifikaci právě této kombinace markerů. Příčinou jsou prý časté mutace v místě připojení standardních primerů, v tzv. binding site. Tato intraklonální variabilita tak může bránit úspěšné amplifikaci.

3.5 *rbcL*

Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (RuBisCO) je enzym spojený s krokem fixace uhlíku do těl fotosyntezujících organismů v podobě vysoce energetických sloučenin. Skládá se z velkých (L) a malých podjednotek (S). Geny kódující tyto podjednotky jsou pak označovány jako *rbcL* a *rbcS*. Gen *rbcL* je součástí DNA chloroplastu, a stal se hojně využívaným při DNA barcodingu a při fylogenetických analýzách taxonů (Evans et al. 2007; Lundholm et al. 2006; MacGillivray & Kaczmarska 2012). Gen *rbcS* byl také použit pro fylogenetické studium rozsivek (Delaney et al. 2011), avšak databáze nedisponují dostatečným počtem takových záznamů, což posléze znemožňuje srovnání (An et al. 2017).

Tento gen *rbcL* ovšem může při DNA barcodingu způsobovat i jisté problémy, neboť dědičnost plastidů (resp. chloroplastů) u rozsivek není uniformní, plastidy tak mohou být děděny uniparentálně i biparentálně (Casteleyn et al. 2009; Ghiron et al. 2008).

Ve studii Zimmermann et al. (2011) byl jako testovací marker zvolen úsek o délce zhruba 1400 bp, neboť jej mnoho prací použilo k identifikaci druhů a k fylogenetickým analýzám rozsivek (Amato et al. 2007; Evans et al. 2007). Právě délka tohoto úseku je nevýhodná, neboť neumožňuje úplnou sekvenaci při jednom čtení (Hamsher et al. 2011). Z tohoto důvodu se pro barcoding používají fragmenty *rbcL*.

U kvetoucích rostlin se používá 5' konec úseku genu *rbcL* o délce cca 600 bp (de Vere et al. 2012). Funkčnost *rbcL*-5' (resp. *rbcL*-5P) při barcodingu rozsivek byla také již prověřena (MacGillivray & Kaczmarska 2011), stejně tak jako 748 bp dlouhá oblast *rbcL*-3', resp. *rbcL*-3P (Hamsher et al. 2011). Oblast *rbcL*-5P je oproti *rbcL*-3P méně variabilní. Marker *rbcL*-3P je výbornou kombinací dvou základních charakteristik barcode markerů, tj. univerzalita a taxonomické rozlišení, avšak to nemusí platit pro všechny taxony (Kollár et al. – v přípravě). Osvědčil se při barcodingu rodů *Sellaphora*, *Nitzschia* a *Navicula* (Hamsher et al. 2011). MacGillivray & Kaczmarska (2011) navrhuje tzv. dual-locus barcode, tedy kombinaci dvou barcode markerů lokalizovaných na odlišných místech. Konkrétně navrhuje kombinaci *rbcL*-3P (úsek o délce 540 bp) s 5.8S LSU rDNA + ITS2 rDNA pro lepší druhové rozlišení. Zároveň tento dual-locus barcode poskytne podrobnější vhled do identity druhů z oddělených částí genomu.

4 LOKALITY

Vzorky nárostových rozsivek jsem opakovaně odebírala z pěti vytipovaných lokalit nacházejících se v okrese Třebíč a jednorázově jsem provedla odběr ve dvou lokalitách nacházejících se v okolí Olomouce. Vzorky byly odebírány z ponořených kamenů v zatopených kamenolomech. Kamenolomy se lišily typem těženého kamene.

4.1 Charakteristika oblasti

Vybrané pravidelně vzorkované lokality zatopených lomů se nachází v České republice na území Českomoravské vrchoviny, v kraji Vysočina, v okrese Třebíč. Jedná se o zatopené lomy nacházející se v katastru obcí Kamenná, Kojatín, Pocoucov, Pyšel (dále je tato lokalita označovaná názvem Častotice, neboť se rozkládá blíže této obci a ve veřejném mínění je takto obecně označována), Rudíkov. Lokality Častotice, Kamenná, Kojatín a Rudíkov spadají do oblasti tzv. ekologického mikroregionu Horácko, jež se rozkládá mezi městy Třebíč, Velké Meziříčí a Náměšť nad Oslavou. Lokalita Pocoucov se nachází na hranici tohoto mikroregionu.

Severní část mikroregionu tvoří amfibolicko-biotitická žula, kromě okolí obce Rudíkov, kde se vyskytují spraše. Jih mikroregionu tvoří amfibolity, serpentinity (hadce) a migmatity, jež prostupují žuly a spraše (Horácko – ekologický mikroregion 2018).

Dominantními toky mikroregionu jsou řeky Jihlava a Oslava. Řeka Jihlava protéká jihozápadní částí, řeka Oslava severovýchodní částí. Nenachází se zde přírodní jezera. Avšak je tu vysoký počet rybníků. Největší vodní plochou je vodní nádrž Dalešice (celková plocha 480 ha).

Další dvě lokality, ve kterých byl odběr proveden pouze jednorázově, se nachází v České republice, v Olomouckém kraji, v okrese Přerov a v okrese Olomouc.

4.2 Popis jednotlivých lokalit

4.2.1 Častotice

GPS souřadnice: 49.2400328 N, 16.0858833 E

Lom se nachází jihovýchodně asi 1600 m od Pyšela u polní cesty vedoucí z Pyšela do Častotic. Jedná se v podstatě o dvě vodní plochy oddělené přírodním valem širokým asi 1,5 metru. Od této cesty je lom vzdálen asi 100 metrů po levé straně v uvedeném směru. Je obklopen borovicemi (*Pinus* sp.), vrbami (*Salix* sp.), prorůstá jej sítina (*Juncus* sp.), rákos (*Phragmites* sp.) a orobinec (*Typha* sp.). Je zde monitorován výskyt kuňky (*Bombina* sp.), čolka obecného (*Lissotriton vulgaris*) a čolka velkého (*Triturus cristatus*; dle osobního sdělení od Mgr. Lenky Jeřábkové). Těžba v tomto lomě není přesně datována, údajně probíhal odběr drolicího se kamene příležitostně místními občany dle jejich osobní potřeby (osobní sdělení od Mgr. Martiny Brestovské, starostky obce Pyšel). Žulové eluvium a zvětralý aplit byl používán do cest (Vavřínová 1948). Údaje z roku 1941 uvádí hloubku 1,5–2 metry (Vavřínová 1948).

4.2.2 Kamenná

GPS souřadnice: 49.2763950 N, 16.0682833 E

Lom se nachází za částí obce zvané Žleb podél žluté turistické trasy asi 300 metrů od slepě končící silnice ve směru toku potoka Kameňák. Od tohoto bodu se nachází na levé straně (ve směru toku) zhruba 70 metrů. Těžba durbachitu začala v roce 1983. Lom byl zatopen vodou do dnešní podoby v roce 1998. Hloubka nyní činí asi 5 m (dle osobního sdělení majitele JUDr. Jindřicha Zedníčka). Ze stále aktivního lomu přitéká voda nesoucí prach vznikající při opracování kamene. V okolí zatopeného lomu rostou hlavně borovice (*Pinus* sp.) a olše (*Alnus* sp.).

4.2.3 Kojatín

GPS souřadnice: 49.2463297 N, 16.0199117 E

Lom se nachází severovýchodně asi půl kilometru od Kojatína vedle železniční trati propojující Kojatín a Pozďatín. Těžba durbachitu byla započata v roce 1940 a ukončena

byla v roce 1946 (dle osobního sdělení p. Smejkal, pamětníka). Díky několika pramenům byl lom postupně přirozeně zaplaven. Toho v cca 50. letech využilo i místní pozďatínské družstvo k napájení dobytka. Lom se nachází v březovém háji (*Betula pendulina*). Ve vodě žijí kaprovité ryby (*Cyprinidae*), jejichž mrtvé pozůstatky byly při odběru vzorků opakovaně pozorovány.

4.2.4 Nová Ves

GPS souřadnice: 49.6788597 N, 17.0109914 E

Těženou surovinou byla droba. Lom je v letním období využíván ke koupání. Bližší informace se nepodařilo sehnat.

4.2.5 Pocoucov

GPS souřadnice: 49.2327586 N, 15.8972033 E

Lom se nachází asi 600 metrů jižně od Pocoucova po pravé straně asi 20 metrů od silnice ve směru na Třebíč. Jedná se o stěnový zatopený lom se zvětralým trebičským syenitem s mylonitovanými partiemi (Vavřínová 1948). Hloubka činí asi 4 metry. Počátky těžby jsou datovány do druhé poloviny 30. let 20. století a zhruba od 40. let je tento lom zatopený (dle osobního sdělení p. Votoupala, pamětníka). Kolem vodní plochy jsou vysázeny okrasné druhy vrby (*Salix* sp.) a borovice (*Pinus* sp.), které jsou upravovány na způsob bonsají.

4.2.6 Rudíkov

GPS souřadnice: 49.2905692 N, 15.9416931 E

Původním majitelem tohoto malého žulového lomu byl místní obyvatel Jan Šoukal. Lom byl vyhlouben zhruba roku 1945. Těžba kamene byla nepravidelná. Lom byl vždy postupně zaplaven podzemní vodou, ta byla mezi těžbou vždy odčerpávána. Těžba byla ukončena v 80. letech minulého století. Od té doby je lom zaplavený. Lom je hluboký cca 2–3 metry v závislosti na klimatických podmínkách. V dnešní době se nachází na soukromém pozemku p. Stanislava Kašpara, resp. na zahradě. V okolí lomu rostou

ovocné stromy, hladina prorůstá orobincem (*Typha* sp.), sítinou (*Juncus* sp.). Žije zde také několik jedinců kaprovitých ryb (*Cyprinidae*).

4.2.7 Výkleky

GPS souřadnice: 49.5567403 N, 17.4826322 E

Počátky těžby se datují již od 70. let 19. století (dle osobního sdělení Romana Zapletala, starosty obce Výkleky). Těženou surovinou byla droba. Lom dosahuje hloubky až 7 metrů. V letním období hojně využíván ke koupání (Kawi 2018).

5 METODIKA

5.1 Terénní část

Terénní část práce zahrnovala pravidelný sběr vzorků z již zmíněných pěti lokalit zatopených lomů: Častotice, Kamenná, Kojatín, Pocoucov, Rudíkov a jednorázový sběr vzorků z lokalit Nová Ves a Výkleky. Jednalo se o lokality o rozloze od 105 m² do 30000 m². Vzorky jsem sbírala během měsíců duben – říjen roku 2017. Sběr vzorků nárostových rozsivek byl prováděn dvěma metodami.

První z nich je seškrab nárostu řas ze substrátu, resp. z kamene. Kámen nacházející se při břehu ponořený v hloubce cca 10–30 cm byl vyjmut z vody a jemnými pohyby z něj byl zubním kartáčkem seškrabán nárost. Kartáček se získaným materiálem byl vymáčán ve vodě nabrané z konkrétné lokality v malé plastové lahvičce (objem 50 ml). Mezi jednotlivými takto prováděnými odběry bylo nutné kartáček vždy pečlivě promýt, aby nedošlo ke kontaminaci při dalším odběru. Takto získaný materiál byl uchován v chladničce a následující den byl zpracován v laboratoři.

Druhá metoda byla z hlediska přípravy složitější. Použila jsem polymethylmethakrylátová skla (běžně známé jako plexisklo) s rozměry 150 × 85 mm. V horních rozích a ve středu spodní strany byly vyvrtány otvory (průměr otvoru 3 mm) ve vzdálenosti cca 7 mm od okraje. Na takto připravená plexiskla jsem připevnila krycí skla (rozměry 22 × 22 mm nebo 18 × 18 mm) a to pomocí klasické průhledné lepicí pásky. Tenkými proužky (cca 3–4 mm široké) pásky jsem po obvodu oblepila jednotlivá krycí skla tak, aby páska zasahovala maximálně 1 mm do plochy krycího skla. Na jednotlivé obdélníky z plexiskla jsem tímto způsobem umístila 8–10 krycích skel. Otvory v horních rozích obdélníků sloužily k zavěšení na bojku, resp. průhlednou nebarevnou PET lahev (nejvíce se osvědčily PET lahve od mléka o objemu 1 litr, a to díky jejich jednoduchému tvaru). Na PET lahve byly obdélníky z plexiskla zavěšeny pomocí tenkého průsvitného rybářského vlasce (značka Triforce, DAIWA, tloušťka vlasce 0,18 mm) tím způsobem, aby se pak obdélníky nacházely 20 cm ponořené pod vodní hladinou. Otvor na spodní straně obdélníku sloužil k ukotvení pomocí vlasce k pevnému bodu u břehu. Takto připravená plexiskla jsem rozmístila do jednotlivých lokalit (fotografie v příloze č. 16). Odběr jednotlivých krycích skel jsem prováděla 1 až 3 týdny od umístění na lokality. Odebraná řasami porostlá krycí skla jsem uchovávala v uzavíratelných plastových krabičkách

(neprůhledné, bílé, objem 15 ml, průměr misky 40 mm), která byla naplněna vodou z dané lokality, do druhého dne, kdy byly zpracovány v laboratoři.

5.2 Laboratorní část

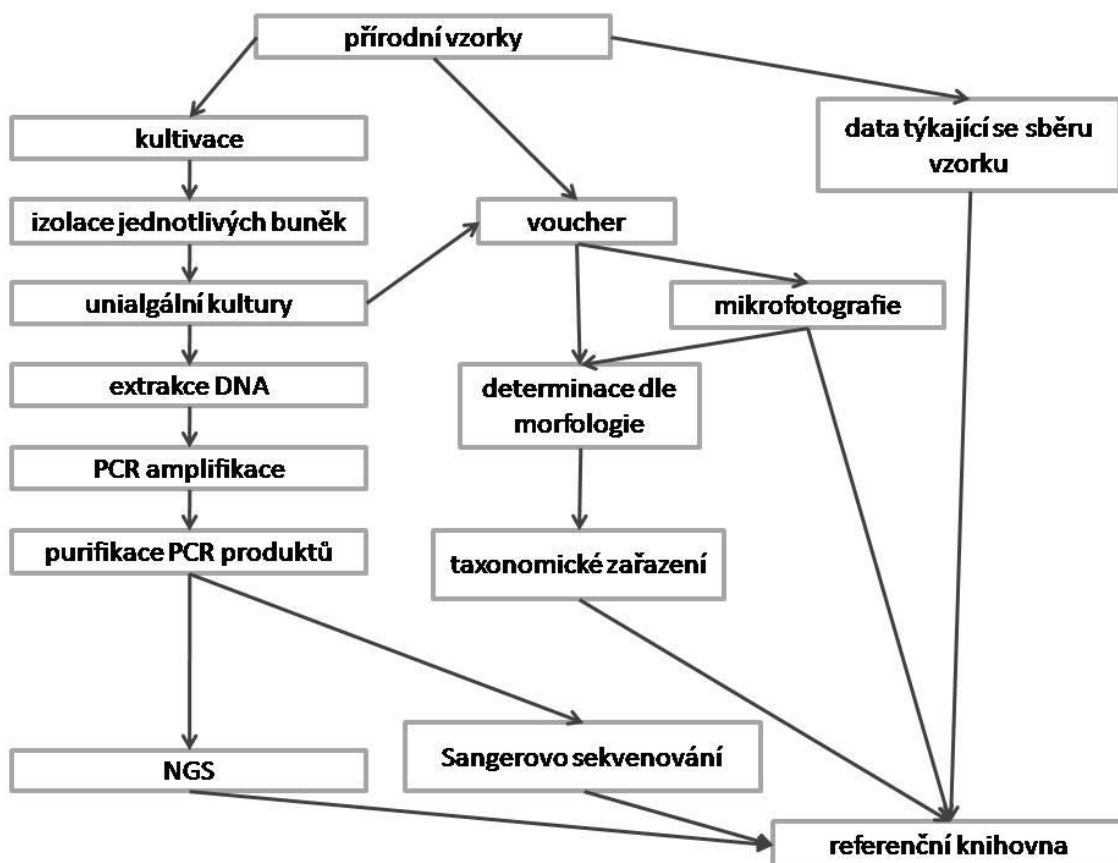
5.2.1 Tvorba trvalých preparátů

Vzorky získané v terénu byly následující den po odběru zpracovány v algologické laboratoři. Z každého vzorku byl vždy pořízen tzv. voucher. Ze vzorků získaných metodou seškrabu jsem na podložní sklo pipetou kapla 2–3 kapky vzorku. Každé takové podložní sklo bylo opatřeno kódem, např. K-100217-LE, kde první písmeno je zkratka dané lokality (Č = Častotice, K = Kamenná, Ko = Kojatín, P = Pocoucov, R = Rudíkov), číselný údaj značí datum odběru (měsíc, den, rok) a „LE“ mé iniciály. Po zaschnutí kapky jsem z takto připravených voucherů dělala trvalé preparáty. V případě krycích skel s nárosty získaných metodou „in situ“ (expozice v lomu) bylo následné vypalování prováděno přímo na krycím skle. Tvorba trvalých preparátů probíhala v digestoři. Podložní/krycí skla se zaschlými vzorky jsem umístila na laboratorní vaňič (typ Stuart CB160), na kterém byla umístěna hliníková deska (rozměry 15 × 25 cm). Po rozehtání na cca 170 °C jsem na podložní skla kapala po jedné kapce 30% peroxid vodíku a to třikrát, vždy po důsledném odpaření. Tímto způsobem byla ze vzorku odstraněna organická část, křemičité frustuly rozsivek zůstaly zachovány. Na takto upravený vzorek jsme poté přiklopila krycí sklo s kapkou pryskyřice Naphrax a téměř hotový trvalý preparát jsem zhruba minutu nechala ještě na horké hliníkové desce z důvodu odpaření toluenu, jenž je součástí Naphraxu. Po vychladnutí trvalých preparátů je již bylo možné mikroskopovat. Rozsivky jsem determinovala na základě mikroskopování trvalých preparátů mikroskopem (Olympus CX21) s imerzním objektivem při zvětšení 10 × 100 s použitím klasických determinačních klíčů: Krammer & Lange-Bertalot 1986; 1988; 1991a; 1991b; 2004; Hoffmann, Lange-Bertalot & Werum 2011.

5.2.2 Další laboratorní zpracování

Pro další studium rozsivek ze zatopených lomů byly získané vzorky dále zpracovávány. Z každého vzorku byla ponechána část na přípravu trvalého preparátu, k pozdějšímu vyhodnocení druhového složení vzorku. Nativní přírodní vzorky jsem rozetřela v Petriho miskách (průměr 10 cm) na agaru s WC médiem (Guillard & Lorenzen 1972). Po 10–15 dnech jsem pozorovala narostlé kolonie různých řas pod stereomikroskopem. Pomocí sterilní skleněné Pasteurovy pipety vytažené do kapiláry jsem jednotlivé kolonie izolovala do serologických destiček s tekutým WC médiem. Při izolaci jsem se na agaru vyhýbala koloniím plísní, bakterií a zelených řas, aby izoláty nebyly kontaminovány. Mezi izolací jednotlivých kolonií jsem kapiláru sterilizovala ve vařící destilované vodě umístěné na rychlovarné plotýnce (typ Stuart CB160). Každá kolonie reprezentovala klon rozsivky jednoho druhu a v mističkách serologické destičky izoláty rostly po dobu 2–4 týdnů. Čisté jednodruhové kultury byly přeočkovány do Petriho misek o průměru 5 cm a část byla ponechána na přípravu trvalého preparátu (voucher). Kontaminované kultury (sinice, zelené řasy, víc než jeden druh rozsivek) se nepoužily, pokud ale obsahovaly zajímavou rozsivku, použila jsem reizolaci (opět přes agarovou plotnu). Takto získané kultury je třeba určit do druhu klasickými morfologickými metodami a poté mohou být zdrojem DNA pro molekulární práci. Zjednodušené schéma postupu je znázorněno v Obrázku 2. Z unialgálních kultur jsem izolovala DNA, která bude následně osekvenována. Součástí extrakce a izolace DNA je fyzické rozbití křemičitých frustul rozsivek a následné uvolnění protoplastu. S použitím vhodných primerů se poté pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) amplifikuje cílová oblast DNA, tzv. barcode, který má pro každý druh specifickou strukturu, resp. pořadí bazí DNA. K vizualizaci a kontrole PCR produktů dochází při gelové elektroforéze. Získaný PCR produkt je purifikován a poté podroben Sangerovu sekvenování. Získané sekvence jsou srovnávány s databází.

Získané vyizolované DNA unialgálních kultur, resp. osekvenované DNA se stanou předmětem detailního studia pro navazující diplomovou práci.



Obrázek 2: Schéma postupu (upraveno podle Zimmermann et al. 2014)

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Celkem jsem zpracovala 31 vzorků z 5 lokalit okresu Třebíč (Častotice, Kamenná, Kojatín, Pocoucov, Rudíkov), 1 vzorek z lokality okresu Olomouc (Nová Ves) a 1 vzorek z lokality okresu Přerov (Výkleky). Mapy zachycující zkoumané lokality jsou v příloze (Příloha 1–5). Měřené fyzikálně-chemické charakteristiky (pH, konduktivita) jsou uvedeny v tabulce v příloze (Příloha 6). Hodnota pH se pohybovala od 5,82 do 8,48. Konduktivita se pohybovala od $40 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ do $616 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Ve vzorcích bylo zastoupeno 26 rodů, nejčastěji se vyskytoval rod *Nitzschia*, pouze jedním druhem byly zastoupeny rody *Cyclotella*, *Cymbopleura*, *Diadesmis*, *Eunotia*, *Platessa*, *Selaphora*, *Stenopteroberia*, *Stephanodiscus*. Celkem jsem determinovala 102 taxonů rozsivek. Výskyt taxonů v jednotlivých lokalitách je zaznamenán v Tabulce 1. Kompletní názvy taxonů jsou uvedeny v příloze (Příloha 7). Druhovú bohatost v lokalitách se pohybovala od 4 do 31 druhů. Druhově nejbohatší lokalitou byl lom v Pocoucově, druhově nejchudší byl lom ve Výklekách. Tyto hodnoty ovšem nelze srovnávat, neboť ve Výklekách byl proveden pouze jeden odběr vzorku, zatímco v Pocoucově bylo provedeno osm odběrů. Druhovú bohatost jednotlivých vzorků se pohybovala od 2 (lom Častotice, kód trvalého preparátu Č-100217-LE) do 15 druhů (lom Kojatín, kód trvalého preparátu Ko-041717-LE). Pro porovnání, druhová bohatost epifytických nárostů v rybnících a tocích v povodí řeky Svitavy a v pohoří Bílé Karpaty se pohybuje v rozmezí od 1 do 34 druhů na vzorek (Kollár et al. 2015). Celková druhová bohatost epifytických nárostů v rybnících nacházejících se v různých částech České republiky se pohybuje v rozmezí od 11 do 51 druhů (Pouličková et al. 2017).

Téměř na všech lokalitách byla přítomna rozsivka *Achnantheidium minutissimum* agg. Jde o nejrozšířenější druhový komplex, který dominuje i v rybnících a potocích (Kollár et al. 2015; Letáková et al. 2018). Další druhové komplexy, které se v epilitonu v lomech vyskytly, byly *Gomphonema parvulum* agg., *Navicula cryptocephala* agg., *Nitzschia palea* agg., *Planothidium lanceolatum* agg. Podrobný rozbor druhových komplexů přináší Pouličková et al. (2017). Z indikačních druhů se v lomech vyskytla acidofilní *Eunotia bilunaris*, a to v lomu Častotice (pH 5,82) a také v lomu Pocoucov (pH 7,86). Jako indikátor kyselých vod je uváděna v literatuře (Krammer & Lange-Bertalot 1991). Planktonní rozsivky byly zastoupeny rozsivkou *Cyclotella ocellata*. Na substrát se centrické rozsivky dostávají obvykle sedimentací z planktonu (Pouličková et al. 2008). Přítomnost aerofytických rozsivek *Diadesmis* sp. div., *Hantzschia amphioxys*, *Luticola* sp.

div., *Pinnularia borealis* svědčí o tom, že odběrová místa bývají periodicky obnažena, při kolísání vodní hladiny v lomu. Výskyt těchto druhů byl zaznamenán v lomu Kamenná. Tyto druhy jsou velmi odolné vůči vysychání (Krammer & Lange-Bertalot 1986). Dále se vyskytly i druhy typicky epifytické, např. *Cocconeis* sp. div. (Letáková et al. 2018), případně druhy známé z tekoucích vod *Diatoma* sp. div.

Tab. 1: Zaznamenaný výskyt taxonů v jednotlivých lokalitách. Zkratky lokalit: Č = Častotice, K = Kamenná, Ko = Kojatín, P = Pocoucov, R = Rudíkov, V = Výkleky, NV = Nová Ves. Pro zaznamenaný výskyt druhu je použito označení „+“, v opačném případě „-“.

Název taxonu	Lokalita						
	Č	K	Ko	P	R	V	NV
<i>Achnanthes</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-
<i>Achnanthes exigua</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Achnanthidium caldonicum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Achnanthidium lanceolatum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Achnanthidium minutissimum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Cocconeis pediculus</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Cocconeis placentula</i>	-	+	-	+	+	-	+
<i>Cyclotella ocellata</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cymbella cymbiformis</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Cymbella excisa</i>	-	+	-	+	-	-	+
<i>Cymbella tumida</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Cymbopleura inaequalis</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Diadismus brekkaensis</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Diatoma mesodon</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Diatoma tenuis</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Encyonema caespitosum</i>	-	-	+	+	-	-	-
<i>Encyonema minutum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Encyonema silesiacum</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>Encyonema ventricosum</i>	-	-	+	+	-	-	-
<i>Encyonema lacustre</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Epithemia adnata</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Eunotia bilunaris</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>Fragilaria</i> sp.	-	-	+	+	+	-	-
<i>Fragilaria nanana</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Fragilaria acus</i>	-	-	+	-	+	-	-
<i>Fragilaria construem</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Fragilaria tenera</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Fragilaria vaucherie</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Gomphonema acidoclinatum</i>	+	+	+	+	-	-	-

Tab. 1: Pokračování.

Název taxonu	Lokalita						
	Č	K	Ko	P	R	V	NV
<i>Gomphonema acuminatum</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>Gomphonema exilissimum</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>Gomphonema innocens</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Gomphonema lacustre</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Gomphonema olivaceolacuum</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Gomphonema parvulum</i>	-	+	+	-	+	-	-
<i>Gomphonema parvulum</i> f. <i>saprophilum</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Gomphonema</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-
<i>Gomphonema truncatum</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Hantzchia amphioxys</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Hantzschia abundans</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Luticola nivalis</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Luticola ventriconfusa</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Navicula cryptocephala</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>Navicula cryptofallax</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Navicula cryptotenella</i>	-	-	+	-	+	-	-
<i>Navicula exilis</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Navicula germanii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Navicula gregaria</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Navicula lanceolata</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Navicula radiosa</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Navicula schadei</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Navicula vandamii</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Navicula veneta</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Navicula wildii</i>	-	-	+	+	-	-	-
<i>Nitzschia palea</i>	-	-	+	-	+	-	-
<i>Nitzschia fonticola</i>	-	+	-	+	-	-	-
<i>Nitzschia tabellaria</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nitzschia</i> sp.	-	+	-	-	+	+	-
<i>Nitzschia abbreviata</i>	-	-	+	+	-	-	-
<i>Nitzschia adamata</i>	-	+	-	+	-	-	+
<i>Nitzschia brunoii</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Nitzschia communis</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Nitzschia draveillensis</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Nitzschia filiformis</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Nitzschia fonticola</i>	-	+	-	+	-	-	-
<i>Nitzschia frustulum</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Nitzschia gracilis</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Nitzschia heufleriana</i>	-	+	-	-	+	-	-
<i>Nitzschia intermedia</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nitzschia linearis</i>	-	-	-	-	-	-	+

Tab. 1: Pokračování.

Název taxonu	Lokalita						
	Č	K	Ko	P	R	V	NV
<i>Nitzschia palea</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Nitzschia palea</i> var. <i>tenuirostris</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Nitzschia paleaeformis</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Nitzschia pura</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Nitzschia radiculara</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Nitzschia solgensis</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Nitzschia subaciculari</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Nitzschia supralitorea</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Nitzschia tenuis</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Nitzschia tabellaria</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nitzschia umbonata</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Pinnularia borealis</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pinnularia gibba</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>Pinnularia marchica</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pinnularia subrupestris</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Placoneis paraelginensis</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Placoneis placentula</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Planothidium joursacence</i>	-	-	+	-	+	-	-
<i>Planothidium lanceolatum</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Planothidium rostratum</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Platessa hustedtii</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Selaphora auldreekie</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Stauroneis kriegeri</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Stenopterobia delicatissima</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Stephanodiscus</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-
<i>Surirella</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-
<i>Surirella brebissonii</i> var. <i>kuetzingii</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>Surirella brebissonii</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Surirella crumena</i>	-	+	+	+	+	-	-
<i>Surirella minuta</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Surirella subsalsa</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Surirella visurgis</i>	-	+	-	-	-	-	-
Celkem taxonů v lokalitě	24	29	27	31	30	4	11

ZÁVĚR

Bakalářská práce uvádí do problematiky tvorby DNA barcode databáze a shrnuje dosavadní znalosti o identifikaci rozsivek ve smyslu polyfázického přístupu (tj. kombinace molekulárních, morfologických a ekologických dat) v podobě literární rešerše.

Při sběru v terénu byly vyzkoušeny dvě metody – seškrab a expozice krycích sklíček, obě se osvědčily a je možno je kombinovat. Ideální doba expozice sklíček je 14 dnů. Dosud bylo determinováno 102 taxonů rozsivek, fotografická dokumentace byla pořízena u 32 taxonů. Dále byly vyzkoušeny i metody preparace, izolace a kultivace rozsivek. Zatím bylo získáno 55 voucherů ke vzorkům z lomů, 14 čistých klonových kultur, 14 voucherů k těmto kulturám. Kromě toho byla optimalizována metoda izolace DNA, dosud jsem získala DNA u 14 druhů. V této činnosti se bude dále pokračovat v diplomové práci.

Ukázalo se že epilithon zatopených lomů je co do celkové diverzity a druhové bohatosti rozsivek srovnatelný s rybníky, jezery i toky. Nejvíce jsou zastoupeny rody *Gomphonema*, *Navicula* a *Nitzschia*. Z druhů je nejvíce zastoupen komplex *Achnanthydium minutissimum* agg. a *Planothydium lanceolatum* agg. Kromě typických nárostových druhů se vyskytují sedimentované druhy planktonní, alochtonní druhy tekoucích vod (z přítoků) a rovněž bioindikátory, jako *Eunotia bilunaris* (acidofilní), *Hantzschia amphioxys* a *Pinnularia borealis* (aerofytické – indikující obnažování substrátu).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alverson A. J., Cannone J. J., Gutell R. R. & Theriot E. C. (2006): The evolution of elongate shape in diatoms. – *Journal of Phycology*, 42: 655-668.

Alverson A. J., Jansen R. K. & Theriot E. C. (2007): Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 193-210.

Amato A., Kooistra W., Ghiron J. H. L., Mann D. G., Proschold T. & Montresor M. (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. – *Protist*, 158: 193-207.

An S. M., Choi D. H., Lee J. H., Lee H. & Noh J. H. (2017): Identification of benthic diatoms isolated from the eastern tidal flats of the Yellow Sea: Comparison between morphological and molecular approaches. – *Plos One*, 12.

Armbrust E. V., Berges J. A., Bowler C., Green B. R., Martinez D., Putnam N. H., Zhou S. G., Allen A. E., Apt K. E., Bechner M., Brzezinski M. A., Chaal B. K., Chiovitti A., Davis A. K., Demarest M. S., Detter J. C., Glavina T., Goodstein D., Hadi M. Z., Hellsten U., Hildebrand M., Jenkins B. D., Jurka J., Kapitonov V. V., Kroger N., Lau W. W. Y., Lane T. W., Larimer F. W., Lippmeier J. C., Lucas S., Medina M., Montsant A., Obornik M., Parker M. S., Palenik B., Pazour G. J., Richardson P. M., Rynearson T. A., Saito M. A., Schwartz D. C., Thamatrakoln K., Valentin K., Vardi A., Wilkerson F. P. & Rokhsar D. S. (2004): The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. – *Science*, 306: 79-86.

Avice J. C. (2004): What is the field of biogeography, and where is it going? – *Taxon*, 53: 893-898.

Babanazarova O. V., Likhoshway Y. V. & Sherbakov D. Y. (1996): On the morphological variability of *Aulacoseira baicalensis* and *Aulacoseira islandica* (Bacillariophyta) of Lake Baikal, Russia. – *Phycologia*, 35: 113-123.

Behnke A., Friedl T., Chepurnov V. A. & Mann D. G. (2004): Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). – Journal of Phycology, 40: 193-208.

Beszteri B., Acs E., Makk J., Kovacs G., Marialigeti K. & Kiss K. T. (2001): Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences. – International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 1581-1586.

Beszteri B., Acs E. & Medlin L. K. (2005): Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity. – Protist, 156: 317-333.

Blaxter M., Elsworth B. & Daub J. (2004): DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. – Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 271: S189-S192.

Bowler C., Allen A. E., Badger J. H., Grimwood J., Jabbari K., Kuo A., Maheswari U., Martens C., Maumus F., Otilar R. P., Rayko E., Salamov A., Vandepoele K., Beszteri B., Gruber A., Heijde M., Katinka M., Mock T., Valentin K., Verret F., Berges J. A., Brownlee C., Cadoret J. P., Chiovitti A., Choi C. J., Coesel S., De Martino A., Detter J. C., Durkin C., Falciatore A., Fournet J., Haruta M., Huysman M. J. J., Jenkins B. D., Jiroutova K., Jorgensen R. E., Joubert Y., Kaplan A., Kroger N., Kroth P. G., La Roche J., Lindquist E., Lommer M., Martin-Jezequel V., Lopez P. J., Lucas S., Mangogna M., McGinnis K., Medlin L. K., Montsant A., Oudot-Le Secq M. P., Napoli C., Obornik M., Parker M. S., Petit J. L., Porcel B. M., Poulsen N., Robison M., Rychlewski L., Rynearson T. A., Schmutz J., Shapiro H., Siaut M., Stanley M., Sussman M. R., Taylor A. R., Vardi A., von Dassow P., Vyverman W., Willis A., Wyrwicz L. S., Rokhsar D. S., Weissenbach J., Armbrust E. V., Green B. R., Van De Peer Y. & Grigoriev I. V. (2008): The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. – Nature, 456: 239-244.

Bruder K. & Medlin L. K. (2007): Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. – Nova Hedwigia, 85: 331-352.

Casteleyn G., Adams N. G., Vanormelingen P., Debeer A. E., Sabbe K. & Vyverman W. (2009): Natural Hybrids in the Marine Diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): Genetic and Morphological Evidence.– *Protist*, 160: 343-354.

Chantangsi C., Lynn D. H., Brandl M. T., Cole J. C., Hetrick N. & Ikononi P. (2007): Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2412-2425.

Chase M. W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J. M., Kesanakurthi R. P., Haider N. & Savolainen V. (2005): Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals.– *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360: 1889-1895.

Creach V., Ernst A., Sabbe K., Vanelslander B., Vyverman W. & Stal L. J. (2006): Using quantitative PCR to determine the distribution of a semicryptic benthic diatom, *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae)– *Journal of Phycology*, 42: 1142-1154.

De Stefano L., Rea I., Rendina I., De Stefano M. & Moretti L. (2007): Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*– *Optics Express*, 15: 18082-18088.

De Tommasi E., De Stefano L., Rea I., Moretti L., De Stefano M. & Rendina I. (2008): Light micro-lensing effect in biosilica shells of diatoms microalgae.– In *Micro-Optics 2008*. (eds. H. Thienpont, P. VanDaele, J. Mohr & M. R. Taghizadeh), Vol. 6992.

De Tommasi E., Gielis J. & Rogato A. (2017): Diatom Frustule Morphogenesis and Function: a Multidisciplinary Survey.– *Marine Genomics*, 35: 1-18.

de Vere N., Rich T. C. G., Ford C. R., Trinder S. A., Long C., Moore C. W., Satterthwaite D., Davies H., Allainguillaume J., Ronca S., Tatarinova T., Garbett H., Walker K. & Wilkinson M. J. (2012): DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales.– *Plos One*, 7.

Delaney J. A., Ulrich R. M. & Paul J. H. (2011): Detection of the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia* multiseriis using the RuBisCO small subunit (rbcS) gene in two real-time RNA amplification formats– Harmful Algae, 11: 54-64.

Edvardsen B., Shalchian-Tabrizi K., Jakobsen K. S., Medlin L. K., Dahl E., Brubak S. & Paasche E. (2003): Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA– Journal of Phycology, 39: 395-408.

Ehara M., Inagaki Y., Watanabe K. I. & Ohama T. (2000): Phylogenetic analysis of diatom coxI genes and implications of a fluctuating GC content on mitochondrial genetic code evolution– Current Genetics, 37: 29-33.

Eiler A., Drakare S., Bertilsson S., Pernthaler J., Peura S., Rofner C., Simek K., Yang Y., Znachor P. & Lindstrom E. S. (2013): Unveiling Distribution Patterns of Freshwater Phytoplankton by a Next Generation Sequencing Based Approach– Plos One, 8.

Erdem E., Colgecen G. & Donat R. (2005). The removal of textile dyes by diatomite earth. – Journal of Colloid and Interface Science, 282: 314-319.

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: 349-364.

Floyd R., Abebe E., Papert A. & Blaxter M. (2002): Molecular barcodes for soil nematode identification. – Molecular Ecology, 11: 839-850.

Gale D. K., Gutu T., Jiao J., Chang C. H. & Rorrer G. L. (2009): Photoluminescence Detection of Biomolecules by Antibody-Functionalized Diatom Biosilica. – Advanced Functional Materials, 19: 926-933.

Ghiron J. H. L., Amato A., Montresor M. & Kooistra W. (2008): Plastid inheritance in the planktonic raphid pennate diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). – Protist, 159: 91-98.

Gross M. (2012): The mysteries of the diatoms. – *Current Biology*, 22: R581-R585.

Guillard R. R. L. & C. J. Lorenzen (1972): Yellow-green algae with chlorophyllide C. – *J. Phycol.* 8: 10-14.

Guo L. L., Sui Z. H., Zhang S., Ren Y. Y. & Liu Y. (2015): Comparison of potential diatom 'barcode' genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 1369-1380.

Hajibabaei M., DeWaard J. R., Ivanova N. V., Ratnasingham S., Dooh R. T., Kirk S. L., Mackie P. M. & Hebert P. D. N. (2005): Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360: 1959-1967.

Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N. & Hickey D. A. (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. – *Trends in Genetics*, 23: 167-172.

Hajibabaei M., Smith M. A., Janzen D. H., Rodriguez J. J., Whitfield J. B. & Hebert P. D. N. (2006): A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. – *Molecular Ecology Notes*, 6: 959-964.

Hamsher S. E., Evans K. M., Mann D. G., Pouličková A. & Saunders G. W. (2011): Barcoding Diatoms: Exploring Alternatives to COI-5P. – *Protist*, 162: 405-422.

Harper J. T. & Saunders G. W. (2001): The application of sequences of the ribosomal cistron to the systematics and classification of the florideophyte red algae (Florideophyceae, Rhodophyta)– *Cahiers De Biologie Marine*, 42: 25-38.

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

Hoffmann 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 ihre Ökologie.– ARG Gantner Verlag KG, Ruggell, pp. 1–908.

Jahn R., Zetzsche H., Reinhardt R., & Gemeinholzer B. (2007): Diatoms and DNA barcoding: A pilot study on an environmental sample. – Proceedings of the 1st Central European diatom meeting (pp. 63-68).

Kalina T. & Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. – Karolinum, Praha, 606 pp.

Kawecka B. & Olech M. (1993): Diatom communities in the vanishing and ornithologist creek, King George Island, South Shetland, Antarctica– *Hydrobiologia*, 269: 327-333.

Kelly M. G., Cazaubon A., Coring E., Dell' Uomo A., Ector L., Goldsmith B., Guasch H., Hurlimann J., Jarlman A., Kawecka B., Kwandrans J., Laugaste R., Lindstrom E. A., Leitao M., Marvan P., Padisak J., Pipp E., Prygiel J., Rott E., Sabater S., van Dam H. & Vizinet J. (1998): Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. – *Journal of Applied Phycology*, 10: 215-224.

Kermarrec L., Franc A., Rimet F., Chaumeil P., Frigerio J. M., Humbert J. F. & Bouchez A. (2014): A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. – *Freshwater Science*, 33: 349-363.

Kermarrec L., Franc A., Rimet F., Chaumeil P., Humbert J. F. & Bouchez A. (2013): Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. – *Molecular Ecology Resources*, 13: 607-619.

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: 259-271.

Kooistra W. & Medlin L. K. (1996): Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). 4. Reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6: 391-407.

Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1986): Bacillariophyceae: 1. Teil: Naviculaceae. In: *Susswasserflora von Mitteleuropa* (Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D., eds.). – Gustav Fisher Verlag, Jena, 876 pp.

Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1988): Bacillariophyceae: 2. Teil: Epithemiaceae, Surirellaceae. In: *Susswasserflora von Mitteleuropa* (Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D., eds.). – Gustav Fisher Verlag, Jena, 876 pp.

Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1991): Bacillariophyceae: 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: *Susswasserflora von Mitteleuropa* (Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D., eds.). – Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 576 pp.

Krammer K. & Lange-Bertalot H. (2004): Bacillariophyceae: 4. Teil: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula(Lineolatae), Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. In: *Susswasserflora von Mitteleuropa* (Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenhauer D., eds.). – Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 468 pp.

Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A. & Janzen D. H. (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 8369-8374.

Lafontaine D. L. J. & Tollervey D. (2001): The function and synthesis of ribosomes. – *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 514-520.

Letáková M., Fránková M. & Pouličková A. (2018): Ecology and applications of freshwater epiphytic diatoms - review. – *Cryptogamie Algologie*, 39: 3-22.

Lundholm N., Moestrup O., Kotaki Y., Hoef-Emden K., Scholin C. & Miller P. (2006): Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex

(Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. – *Journal of Phycology*, 42: 464-481.

MacGillivray M. L. & Kaczmarska I. (2011): Survey of the Efficacy of a Short Fragment of the *rbcL* Gene as a Supplemental DNA Barcode for Diatoms. – *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58: 529-536.

MacGillivray M. L. & Kaczmarska I. (2012): Genetic differentiation within the *Paralia longispina* (Bacillariophyta) species complex. – *Botany-Botanique*, 90: 205-222.

Mann D. G. (1989): The diatom genus *Sellaphora* - separation from *Navicula*. – *British Phycological Journal*, 24: 1-20.

Mann D. G. (1999): The species concept in diatoms. – *Phycologia*, 38: 437-495.

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: 251-264.

Mann D. G. & Droop S. J. M. (1996): Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. – *Hydrobiologia*, 336: 19-32.

Mann D. G., McDonald S. M., Bayer M. M., Droop S. J. M., Chepurinov V. A., Loke R. E., Ciobanu A. & Du Buf J. M. H. (2004): The *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyceae): morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence for five new species. – *Phycologia*, 43: 459-482.

Mann D. G., Sato S., Trobajo R., Vanormelingen P. & Souffreau C. (2010): DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. – *Cryptogamie Algologie*, 31: 557-577.

Mann D. G. & Vanormelingen P. (2013): An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. – *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60: 414-420.

McDonald S. M., Sarno D. & Zingone A. (2007): Identifying *Pseudo-nitzschia* species in natural samples using genus-specific PCR primers and clone libraries. – *Harmful Algae*, 6: 849-860.

Medlin L. K., Elwood H. J., Stickel S. & Sogin M. L. (1991): Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletoma costatum* (Bacillariophyta) - evidence for new species, *Skeletoma pseudocostatum*. – *Journal of Phycology*, 27: 514-524.

Medlin L. K. & Kaczmarek I. (2004): Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. – *Phycologia*, 43: 245-270.

Moniz M. B. J. & Kaczmarek I. (2009): Barcoding diatoms: Is there a good marker? – *Molecular Ecology Resources*, 9: 65-74.

Morales E. A. (2001): Morphological studies in selected fragilarioid diatoms (Bacillariophyceae) from Connecticut waters (USA). – *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151: 105-120.

Moritz C. & Cicero C. (2004): DNA barcoding: Promise and pitfalls. – *Plos Biology*, 2: 1529-1531.

Newmaster S. G., Fazekas A. J. & Ragupathy S. (2006): DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. – *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84: 335-341.

Pawlowski J., Lejzerowicz F., Apotheloz-Perret-Gentil L., Visco J. & Esling P. (2016): Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. – *European Journal of Protistology*, 55: 12-25.

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

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., 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: 23-33.

Pouličková A., Veselá J., Neustupa J. & Skaloud P. (2010): Pseudocryptic Diversity versus Cosmopolitanism in Diatoms: a Case Study on *Navicula cryptocephala* Kutz. (Bacillariophyceae) and Morphologically Similar Taxa. – *Protist*, 161: 353-369.

Ratnasingham S. & Hebert P. D. N. (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). – *Molecular Ecology Notes*, 7: 355-364.

Ravin N. V., Galachyants Y. P., Mardanov A. V., Beletsky A. V., Petrova D. P., Sherbakova T. A., Zakharova Y. R., Likhoshway Y. V., Skryabin K. G. & Grachev M. A. (2010): Complete sequence of the mitochondrial genome of a diatom alga *Synedra acus* and comparative analysis of diatom mitochondrial genomes. – *Current Genetics*, 56: 215-223.

Rivera S. F., Vasselon V., Jacquet S., Bouchez A., Ariztegui D. & Rimet F. (2018): Metabarcoding of lake benthic diatoms: from structure assemblages to ecological assessment. – *Hydrobiologia*, 807: 37-51.

Robba L., Russell S. J., Barker G. L. & Brodie J. (2006): Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). – *American Journal of Botany*, 93: 1101-1108.

Saunders G. W. (2005): Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360: 1879-1888.

Schoeman F. R., Archibald R. E. M. & Ashton P. J. (1984): The diatom flora in the vicinity of the Pretoria Salt Pan, Republic of South Africa. Part 3. (Final). – *South African Journal of Botany*, 3: 191-207.

Schulz K., Mikhailiyuk T., Dressler M., Leinweber P. & Karsten U. (2016): Biological Soil Crusts from Coastal Dunes at the Baltic Sea: Cyanobacterial and Algal Biodiversity and Related Soil Properties. – *Microbial Ecology*, 71: 178-193.

Seifert K. A., Samson R. A., Dewaard J. R., Houbraken J., Levesque C. A., Moncalvo J. M., Louis-Seize G. & Hebert P. D. N. (2007): Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 3901-3906.

Sharma N. K., Singh S. & Rai A. K. (2006): Diversity and seasonal variation of viable algal particles in the atmosphere of a subtropical city in India. – *Environmental Research*, 102: 252-259.

Sorhannus U. (2007): A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution. – *Marine Micropaleontology*, 65: 1-12.

Špačková J., Hašler P., Štěpánková J. & Pouličková A. (2009): Seasonal succession of epipelagic algae: a case study on a mesotrophic pond in a temperate climate. – *Fottea*, 9: 121-133.

Toster J., Iyer K. S., Xiang W. C., Rosei F., Spiccia L. & Raston C. L. (2013): Diatom frustules as light traps enhance DSSC efficiency. – *Nanoscale*, 5: 873-876.

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: 443-459.

Trobajo R., Mann D. G., Clavero E., Evans K. M., Vanormelingen P. & McGregor R. C. (2010): The use of partial *cox1*, *rbcL* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and

species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae). – European Journal of Phycology, 45: 413-425.

Urbánková P. & Veselá J. (2013): DNA-barcoding: A case study in the diatom genus *Frustulia* (Bacillariophyceae). – Nova Hedwigia: 147-162.

Vavřínová M. (1948): Soupis lomů ČSR. Číslo 27, Pol. okres Třebíč: s přehlednou mapou lomů, pískoven a hlinišť. – Státní geologický ústav ČSR, Praha, 73 pp.

Vanelslander B., Creach V., Vanormelingen P., Ernst A., Chepurnov V. A., Sahan E., Muyzer G., Stal L. J., Vyverman W. & Sabbe K. (2009): Ecological differentiation between sympatric pseudocryptic species in the estuarine benthic diatom *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae) 1. – Journal of Phycology, 45: 1278-1289.

Veselá J., Neustupa J., Pichrtová M. & Pouličková A. (2009): Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. – Fottea, 9: 307-316.

Zampella R. A., Laidig K. J. & Lowe R. L. (2007): Distribution of diatoms in relation to land use and pH in blackwater coastal plain streams. – Environmental Management, 39: 369-384.

Zechman F. W., Zimmer E. A. & Theriot E. C. (1994): Use of ribosomal DNA internal transcribed spacers for phylogenetic studies in diatoms. – Journal of Phycology, 30: 507-512.

Zhou W. Q., Ye H., Zhang D. & Zhang C. L. (2015): Diatomaceous Earth precoat filtration for drinking water treatment. – Hydraulic Engineering Iii: 185-189.

Zimmermann J., Glockner G., Jahn R., Enke N. & Gemeinholzer B. (2015): Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. – Molecular Ecology Resources, 15: 526-542.

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: 173-192.

INTERNETOVÉ ZDROJE

Horácko – ekologický mikroregion. [Online]. © 2018. Geologie a pedologie: [cit. 12. 4. 2018]. Dostupné z:<http://www.horacko.cz/geografie/geologie-a-pedologie/>

Kawi. [Online]. © 2018. Zatopené lomy: [cit. 12. 4. 2018]. Dostupné z:<https://kawi.cz/patrani/lomy/>

Mapy 2018. [Online]. © 2018. Vysočina, okolí Olomouce: [cit. 12. 4. 2018]. Dostupné z:<http://www.mapy.cz>

SEZNAM PŘÍLOH:

Příloha 1: Mapa lokality Častotice.

Příloha 2: Mapa lokality Kamenná.

Příloha 3: Mapa lokality Kojatín.

Příloha 4: Mapa lokality Pocoucov.

Příloha 5: Mapa lokality Rudíkov.

Příloha 6: Základní měřené charakteristiky lokalit.

Příloha 7: Seznam zaznamenaných druhů s kompletními názvy.

Příloha 8: Mikrofotografie rozsivek z vytvořených trvalých preparátů 1.

Příloha 9: Mikrofotografie rozsivek z vytvořených trvalých preparátů 2.

Příloha 10: Mikrofotografie rozsivek z vytvořených trvalých preparátů 3.

Příloha 11: Fotografie lokality Častotice.

Příloha 12: Fotografie lokality Kamenná.

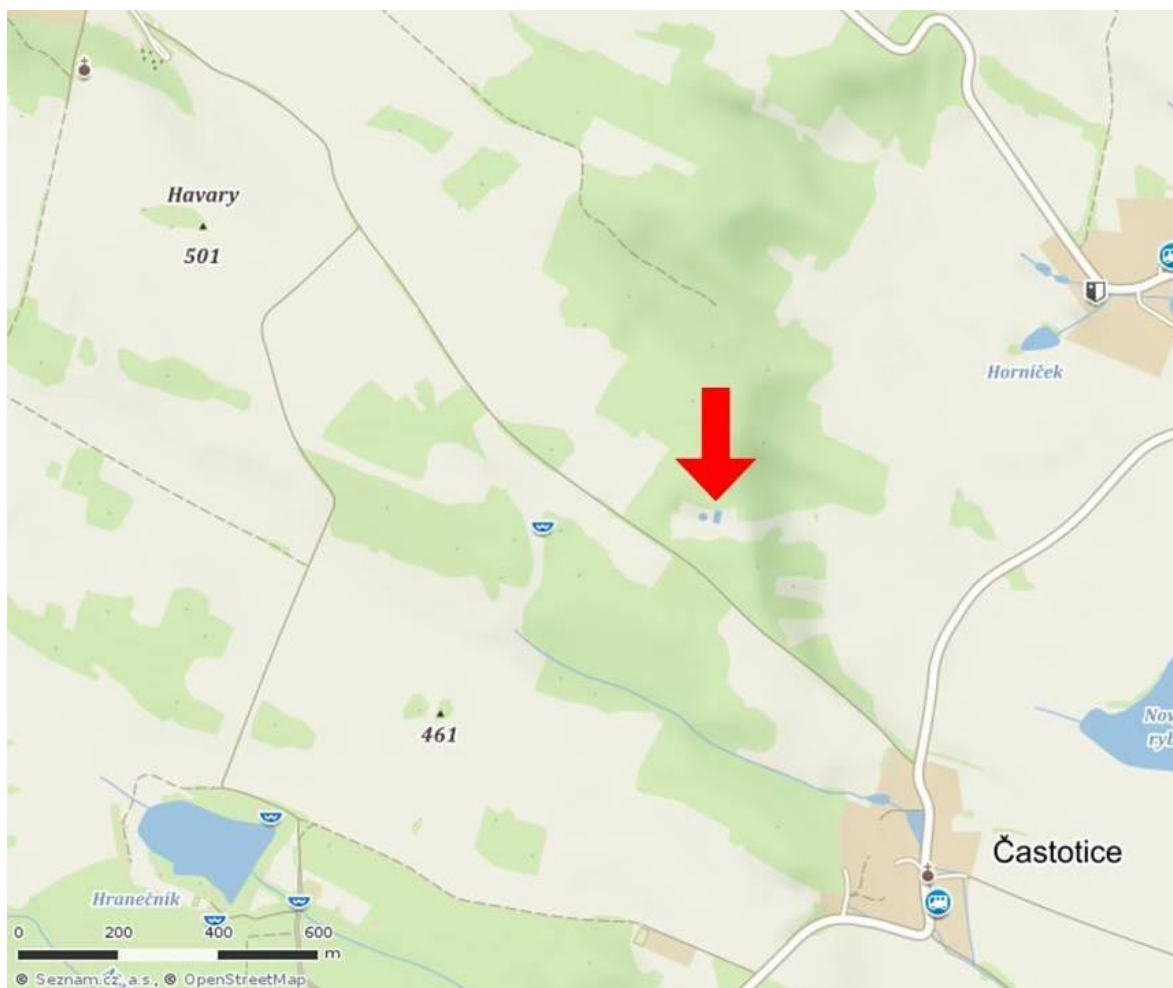
Příloha 13: Fotografie lokality Kojatín.

Příloha 14: Fotografie lokality Pocoucov.

Příloha 15: Fotografie lokality Rudíkov.

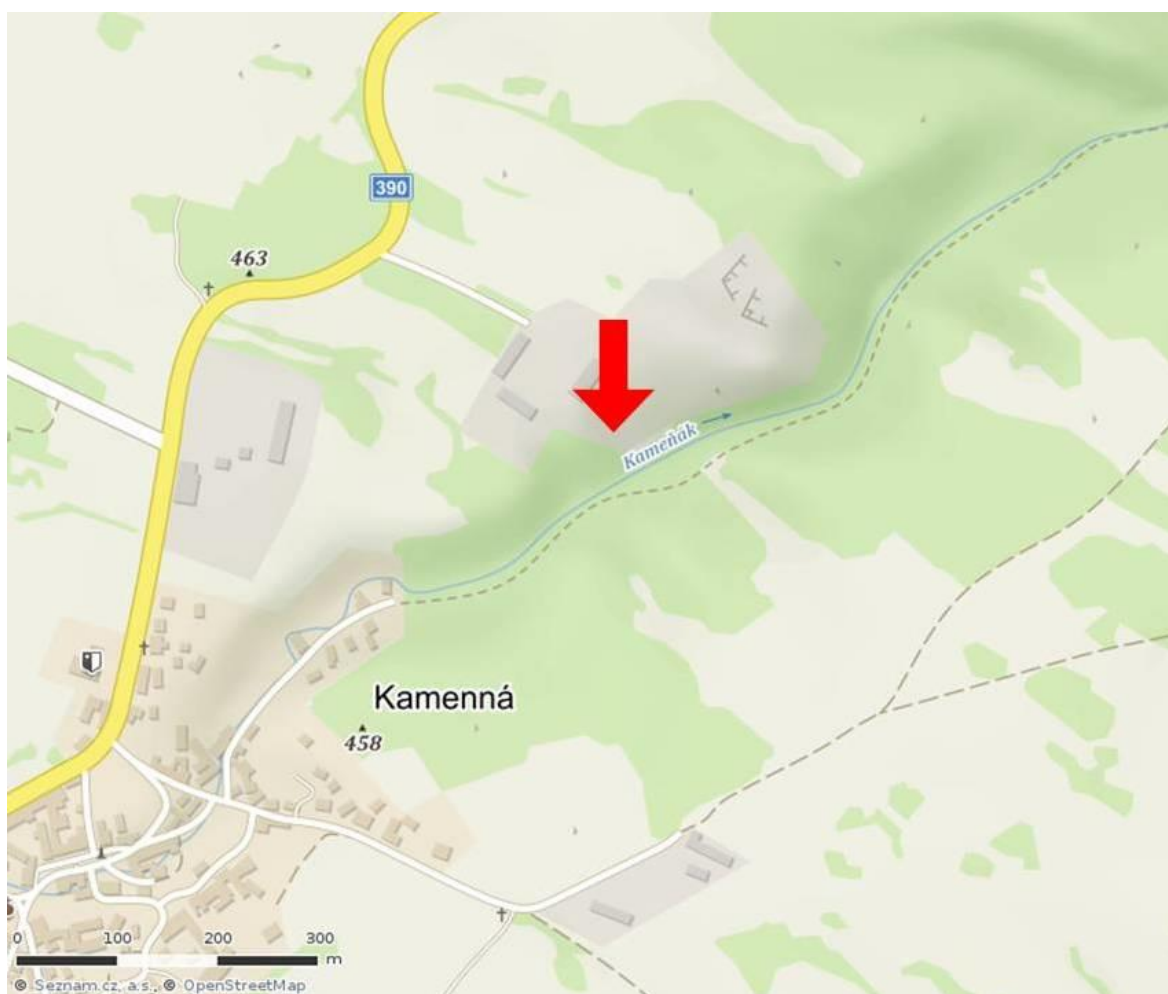
Příloha 16: Fotografie metody odběru vzorku.

Příloha 1: Mapa lokality Častotice.



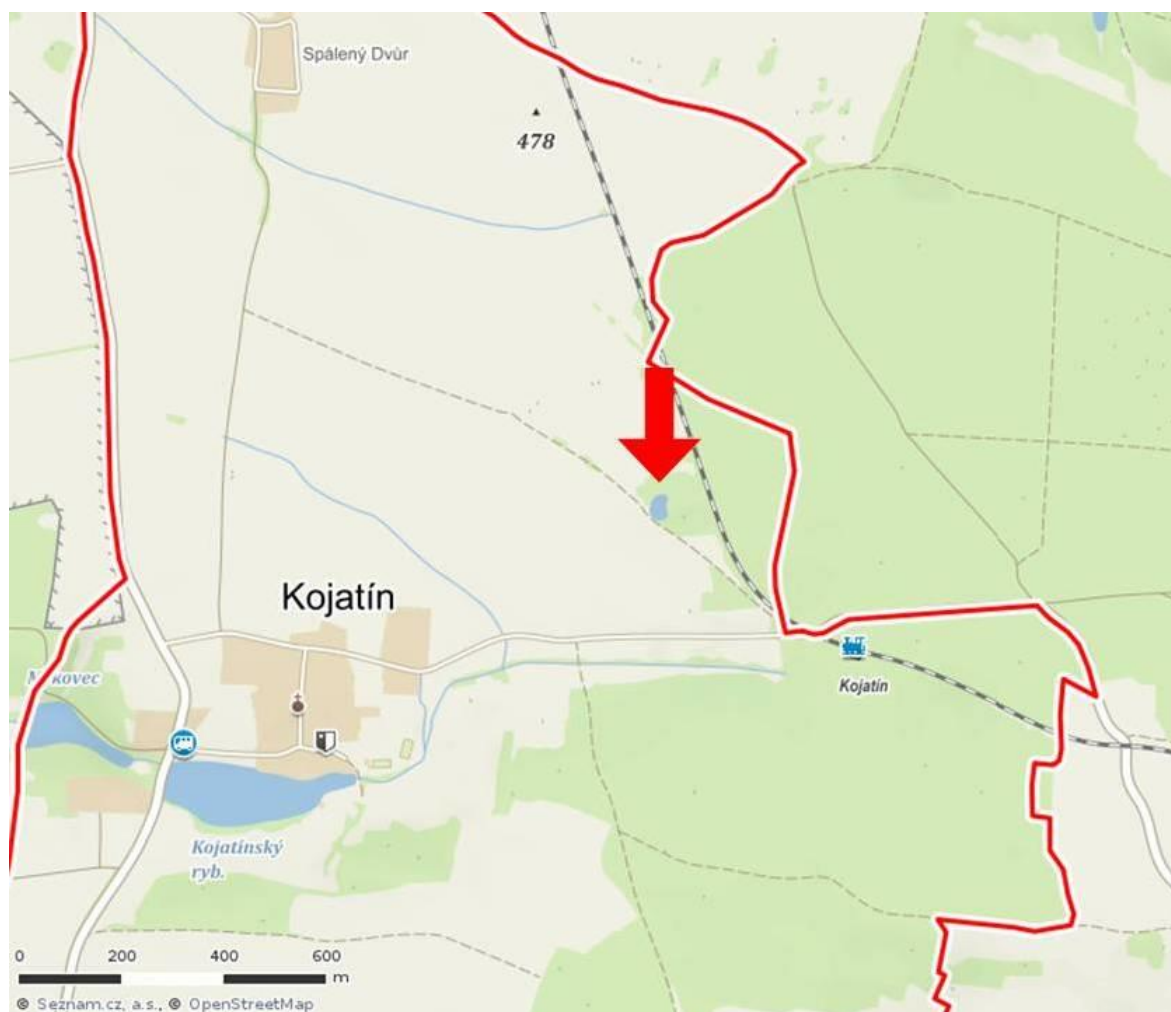
Zdroj: www.mapy.cz (upraveno)

Příloha 2: Mapa lokality Kamenná.



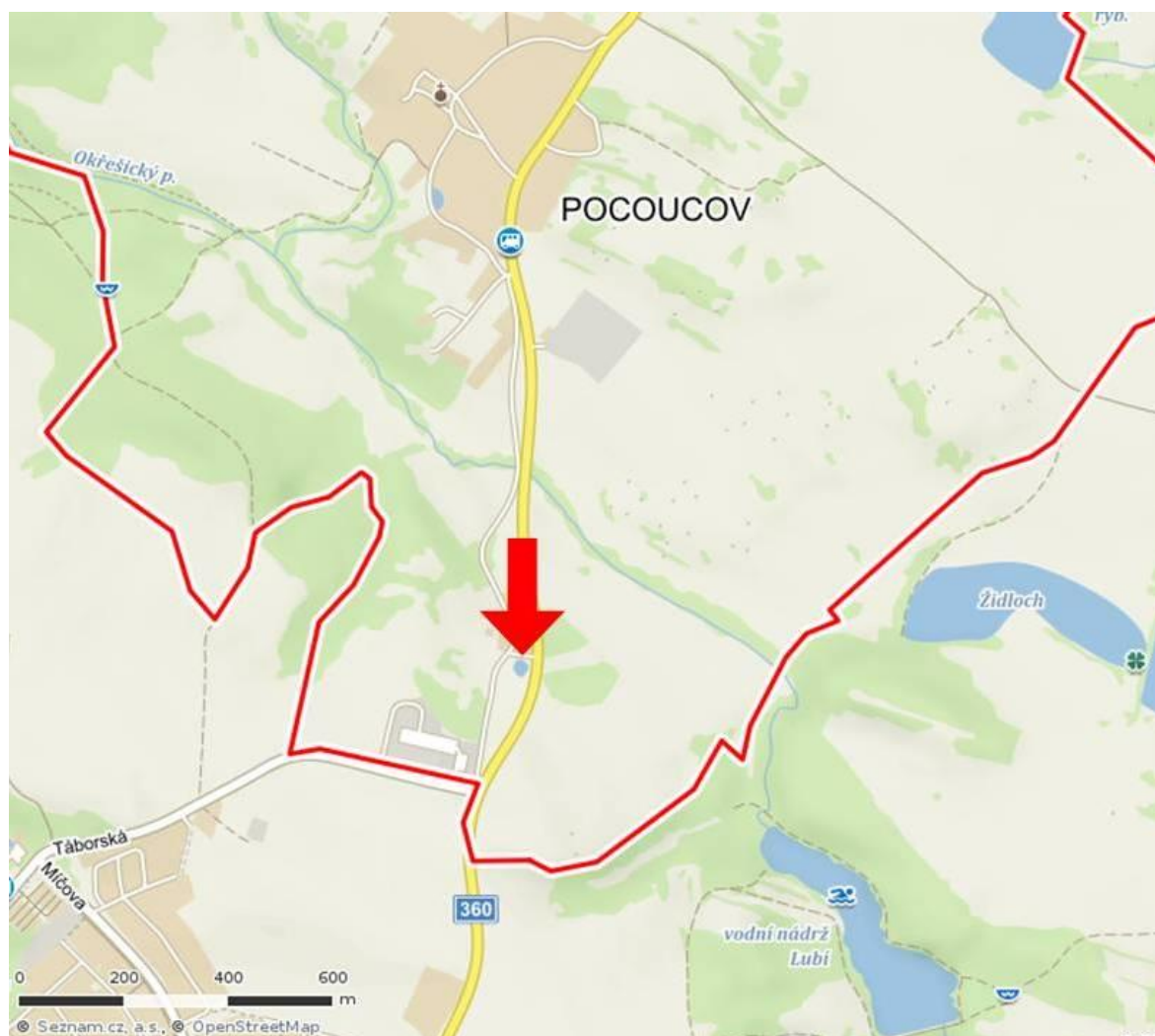
Zdroj: www.mapy.cz (upraveno)

Příloha 3: Mapa lokality Kojatín.



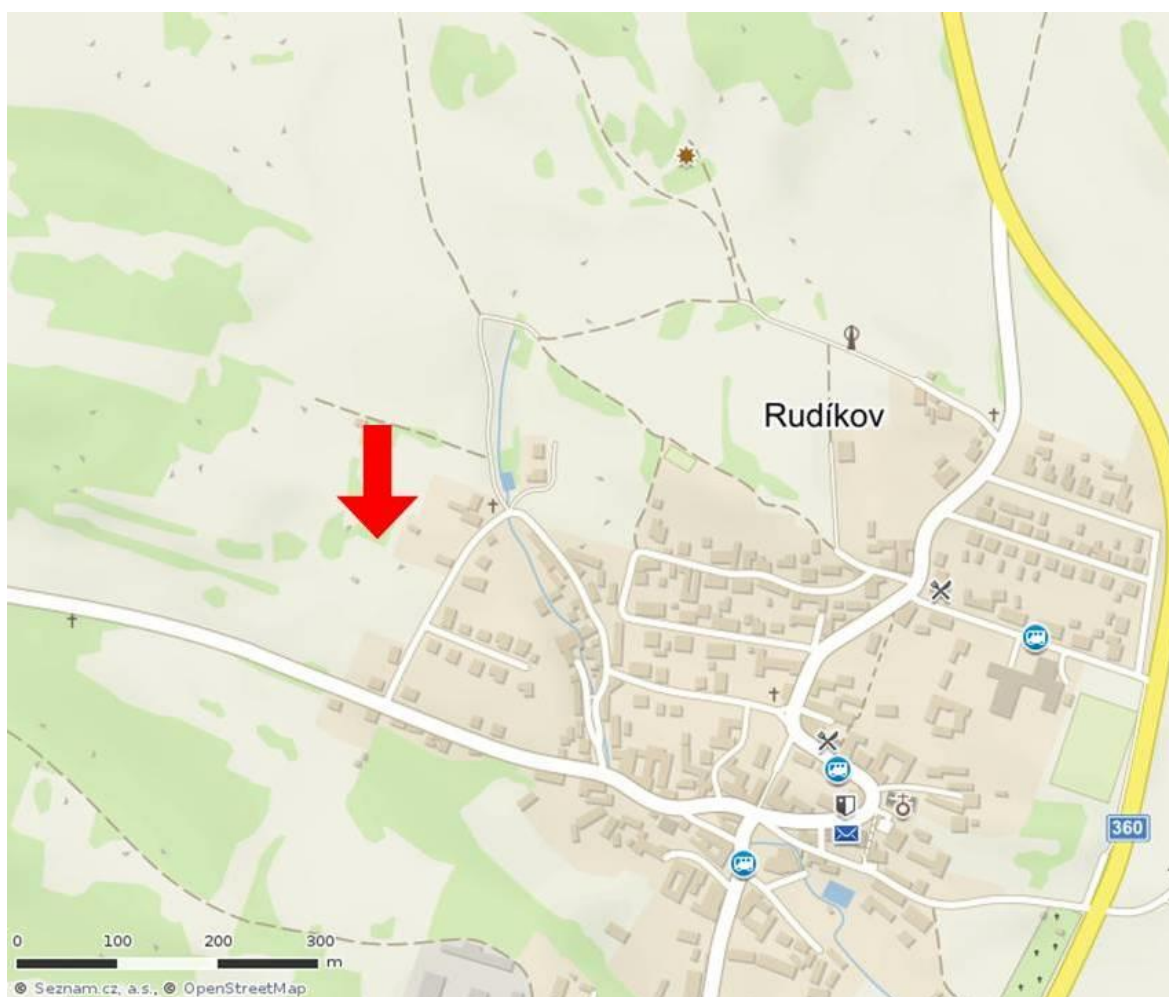
Zdroj: www.mapy.cz (upraveno)

Příloha 4: Mapa lokality Pocoucov.



Zdroj: www.mapy.cz (upraveno)

Příloha 5: Mapa lokality Rudíkov.



Zdroj: www.mapy.cz (upraveno)

Příloha 6: Základní měřené charakteristiky lokalit.

Lokalita	Nadmořská výška [m n. m.]	Vodní plocha [m²]	Obvod [m]	pH*	Konduktivita* [μS]
Častotice	466	120+93	44+36	5,82	40
Kamenná	430	257	78	8,48	460
Kojatín	485	1082	132	7,34	143
Pocoucov	451	322	67	7,86	616
Rudíkov	535	105	39	7,05	219
Nová Ves	293	30000	756	-	-
Výkleky	330	30000	852	-	-

*Údaje byly měřeny 24. 3. 2018.

Hodnoty pH byly naměřeny pomocí multimetru Hach, typ HQ40d multi. Konduktivita byla měřena pomocí multimetru Hanna Instruments, typ COMBO pH/EC/TDS (mS/cm) HI 98130.

Příloha 7: Seznam zaznamenaných taxonů s kompletními názvy.

Kompletní název taxonu

Achnanthes sp. Bory

Achnanthes exigua Grunow

Achnantheidium caledonicum (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot

Achnantheidium lanceolatum (Brébisson ex Kützing)

Achnantheidium minutissimum (Kützig) Czarnecki

Cocconeis pediculus Ehrenberg

Cocconeis placentula Ehrengerg

Cyclotella ocellata Pantocsek

Cymbella cymbiformis C. Agardh

Cymbella excisa Kützing

Cymbella tumida (Brébisson) Van Heurck

Cymbopleura inaequalis (Ehrenberg) Krammer

Diadsmis brekkaensis (Peterson) D. G. Mann

Diatoma mesodon (Ehrenberg) Kützing

Diatoma tenuis C. Agardh

Encyonema caespitosum Kützing

Encyonema minutum (Hilse) D. G. Mann

Encyonema silesiacum (Bleisch) D. G. Mann

Encyonema ventricosum (C. Agardh) Grunow

Příloha 7: Pokračování.

Kompletní název taxonu

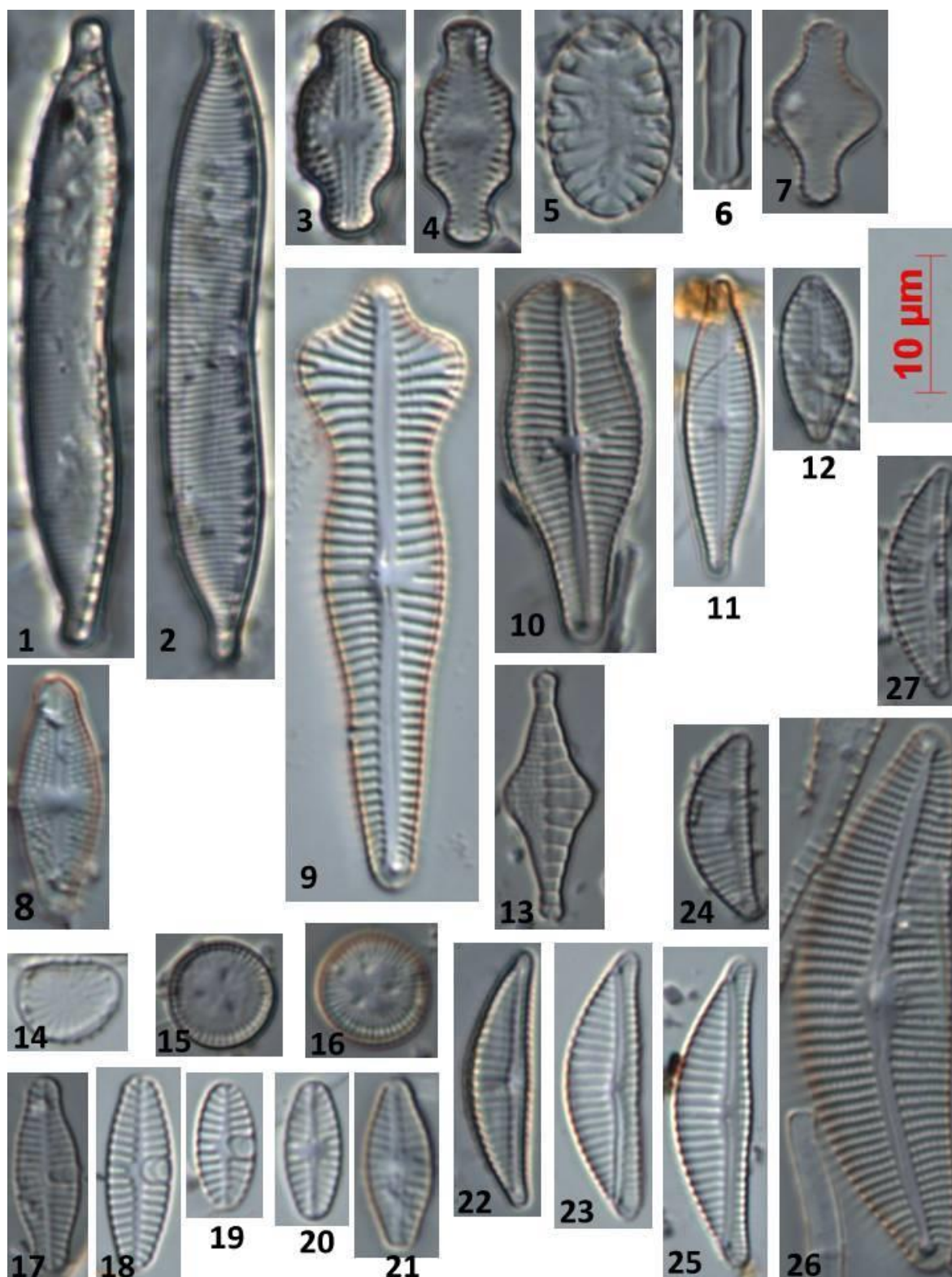
Encyonema lacustre (C. Agardh) Pantocsek
Epithemia adnata (Kützing) Brébisson
Eunotia bilunaris (Ehrenberg) Schaarschmidt
Fragilaria sp. Lyngbye, 1819
Fragilaria nanana Lange-Bertalot
Fragilaria acus (Kützing) Lange-Bertalot
Fragilaria construens (Ehrenberg) Grunow
Fragilaria tenera (W. Smith) Lange-Bertalot
Fragilaria vaucheriae (Kützing) Petersen
Gomphonema acidoclinatum Lange-Bertalot & Reichardt
Gomphonema acuminatum Ehrenberg
Gomphonema exilissimum (Grunow) Lange-Bertalot & E. Reichardt
Gomphonema innocens E, Reichardt
Gomphonema olivaceolacuum (Lange-Bertalot & E. Reichardt) Lange-Bertalot & E. Reichardt
Gomphonema parvulum (Kützing) Kützing
Gomphonema parvulum f. saprophilum Lange-Bertalot & E. Reichardt
Gomphonema sp. Ehrenberg, 1832
Gomphonema truncatum Ehrengerb
Hantzschia amphioxys (Ehrenberg) Grunow
Hantzschia abundans Lange-Bertalot
Luticola nivalis (Ehrenberg) D. G. Mann
Luticola ventriconfusa Lange-Bertalot
Navicula cryptocephala Kützing
Navicula cryptofallax Lange-Bertalot & G. Hofmann
Navicula cryptotenella Lange-Bertalot
Navicula exilis Kützing
Navicula germanii Grunow
Navicula gregaria Donkin
Navicula lanceolata Ehrenberg
Navicula radiosa Kützing
Navicula shadei Krasske
Navicula vandamii Schoeman & R. E. M. Archibald
Navicula veneta Kützing
Navicula wildii Lange-Bertalot
Nitzschia palea (Kützing) W. Smith
Nitzschia fonticola (Grunow) Grunow
Nitzschia tabellaria (Grunow) Grunow
Nitzschia sp. Hassall, 1845
Nitzschia abbreviata Hustedt
Nitzschia adamata Hustedt
Nitzschia brunoii Lange-Bertalot
Nitzschia communis Rabenhorst

Příloha 7: Pokračování.

Kompletní název taxonu

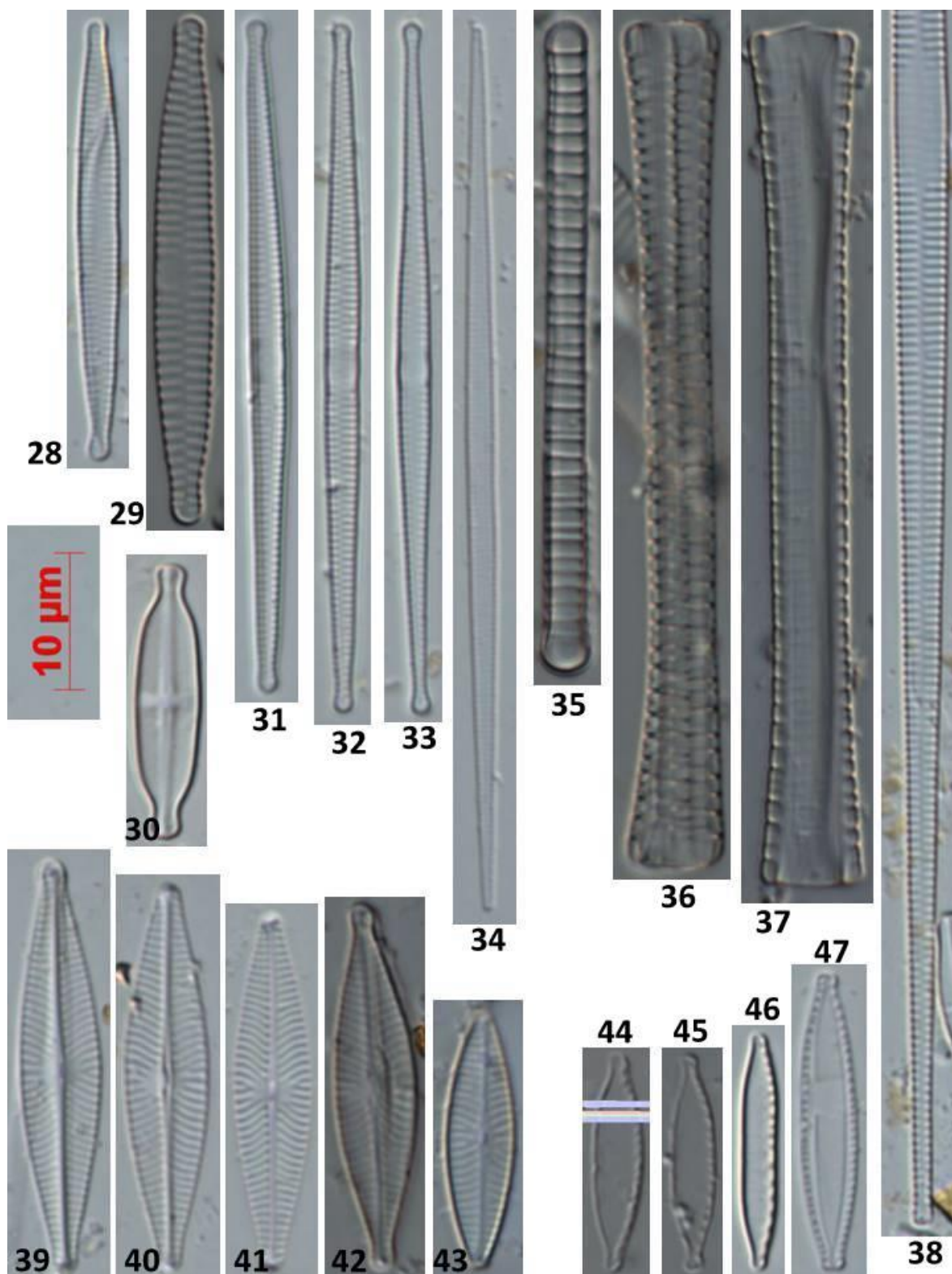
Nitzschia draveillensis Coste & Ricard
Nitzschia filiformis (W. Smith) Van Heurck
Nitzschia fonticola (Grunow) Grunow
Nitzschia frustulum (Kützing) Grunow
Nitzschia gracilis Hantzsch
Nitzschia heufleriana Grunow
Nitzschia intermedia Hantzsch
Nitzschia linearis (C. Agardh) W. Smith
Nitzschia palea (Kützing) W. Smith
Nitzschia palea var. *tenuirostris* Grunow
Nitzschia paleaeformis Hustedt
Nitzschia pura Hustedt
Nitzschia radícula Hustedt
Nitzschia solgensis Cleve-Euler
Nitzschia subacicularis Hustedt
Nitzschia supralitorea Lange-Bertalot
Nitzschia tenuis W. Smith
Nitzschia tabellaria Grunow
Nitzschia umbonata (Ehrenberg) Lange-Bertalot
Pinnularia borealis Ehrenberg
Pinnularia gibba (Ehrenberg) Ehrenberg
Pinnularia marchica I. Schönfelder
Pinnularia subrupestris Krammer
Placoneis paraelginensis Lange-Bertalot
Placoneis placentula (Ehrenberg) Mereschowsky
Planothidium joursacence (Héribaud-Joseph) Lange-Bertalot
Planothidium lanceolatum (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot
Planothidium rostratum (Østrup) Lange-Bertalot
Platessa hustedtii (Krasske) Lange-Bertalot
Selaphora auldreekie D. G. Mann & S. M. McDonald
Stauroneis kriegeri Patrick
Stenopterobia delicatissima (F.W.Lewis) Brébisson ex Van Heurck
Stephanodiscus sp. Ehrenberg
Surirella sp. Turpin
Surirella brebissonii var. *Kuetzingii* Krammer & Lange-Bertalot
Surirella breibissonii Krammer & Lange-Bertalot
Surirella crumena Brébisson ex Kützing
Surirella minuta Brébisson ex Kützing
Surirella subsalsa W. Smith
Surirella visurgis Hustedt

Příloha 8: Mikrofotografie rozsivek z vytvořených trvalých preparátů 1.



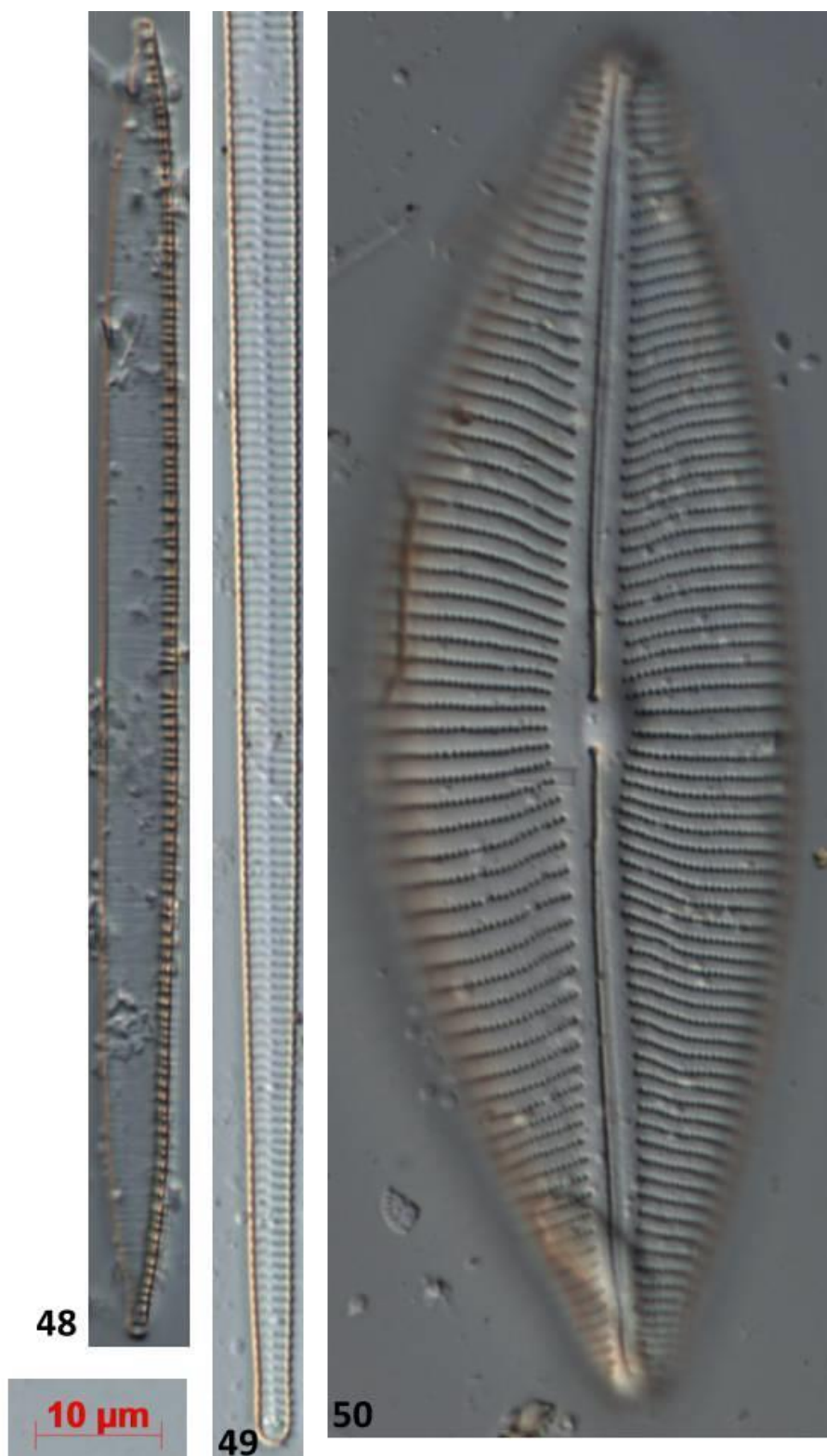
Kompletní název taxonu	Kód preparátu	Lokalita
1 - <i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenberg) Grunow	K-050217-LE	Kamenná
2 - <i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenberg) Grunow	K-050217-LE	Kamenná
3 - <i>Luticola ventriconfusa</i> Lange-Bertalot	K-050217-LE	Kamenná
4 - <i>Luticola nivalis</i> (Ehrenberg) D. G. Mann	K-050217-LE	Kamenná
5 - <i>Surirella minuta</i> Brébisson ex Kützing 1849	K-050217-LE	Kamenná
6 - <i>Diadesmis brekkaensis</i> (Peterson) D. G. Mann	K-050217-LE	Kamenná
7 - <i>Navicula schadei</i> Krasske	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
8 - <i>Selaphora auldreekie</i> D. G. Mann & S. M. McDonald	K-050217-LE	Kamenná
9 - <i>Gomphonema acuminatum</i> Ehrenberg	Ko-041717-LE	Kojatín
10 - <i>Gomphonema truncatum</i> Ehrberg	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
11 - <i>Gomphonema acidoclinatum</i> Lange-Bertalot & Reichardt	Ko-041717-LE	Kojatín
12 - <i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	K-050217-LE	Kamenná
13 - <i>Nitzschia tabellaria</i> Grunow	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
14 - <i>Stephanodiscus</i> sp. Ehrenberg	Ko-041717-LE	Kojatín
15 - <i>Cyclotella ocellata</i> Pantocsek	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
16 - <i>Cyclotella ocellata</i> Pantocsek	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
17 - <i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	K-050217-LE	Kamenná
18 - <i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
19 - <i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
20 - <i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
21 - <i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	P-092517-LE	Pocoucov
22 - <i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D. G. Mann	K-050217-LE	Kamenná
23 - <i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D. G. Mann	Ko-041717-LE	Kojatín
24 - <i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D. G. Mann	K-050217-LE	Kamenná
25 - <i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D. G. Mann	Ko-041717-LE	Kojatín
26 - <i>Cymbella cymbiformis</i> C. Agardh 1830	NV-5. 4. 2017	Nová Ves

Příloha 9: Mikrofotografie rozsivek z vytvořených trvalých preparátů 2.



Kompletní název taxonu	Kód preparátu	Lokalita
27 - <i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D. G. Mann	K-050217-LE	Kamenná
28 - <i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) Petersen	Ko-041717-LE	Kojatín
29 - <i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) Petersen	NV-5. 4. 2018	Nová Ves
30 - <i>Stauroneis kriegeri</i> Patrick	Ko-041717-LE	Kojatín
31 - <i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
32 - <i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
33 - <i>Fragilaria tenera</i> (W. Smith) Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
34 - <i>Fragilaria nanana</i> Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
35 - <i>Diatoma tenuis</i> Agardh	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
36 - <i>Diatoma tenuis</i> Agardh	NV-5. 4. 2018	Nová Ves
37 - <i>Diatoma tenuis</i> Agardh	NV-5. 4. 2019	Nová Ves
38 - <i>Fragilaria nanana</i> Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
39 - <i>Navicula wildii</i> Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
40 - <i>Navicula wildii</i> Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
41 - <i>Navicula wildii</i> Lange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
42 - <i>Navicula cryptofallax</i> Lange-Bertalot & G. Hofmann	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
43 - <i>Navicula wildii</i> Lange-Bertalot	P-092517-LE	Pocoucov
44 - <i>Nitzschia adamata</i> Hustedt	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
45 - <i>Nitzschia adamata</i> Hustedt	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
46 - <i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	Ko-041717-LE	Kojatín
47 - <i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	Ko-041717-LE	Kojatín

Příloha 10: Mikrofotografie rozsivek z vytvořených trvalých preparátů 3.



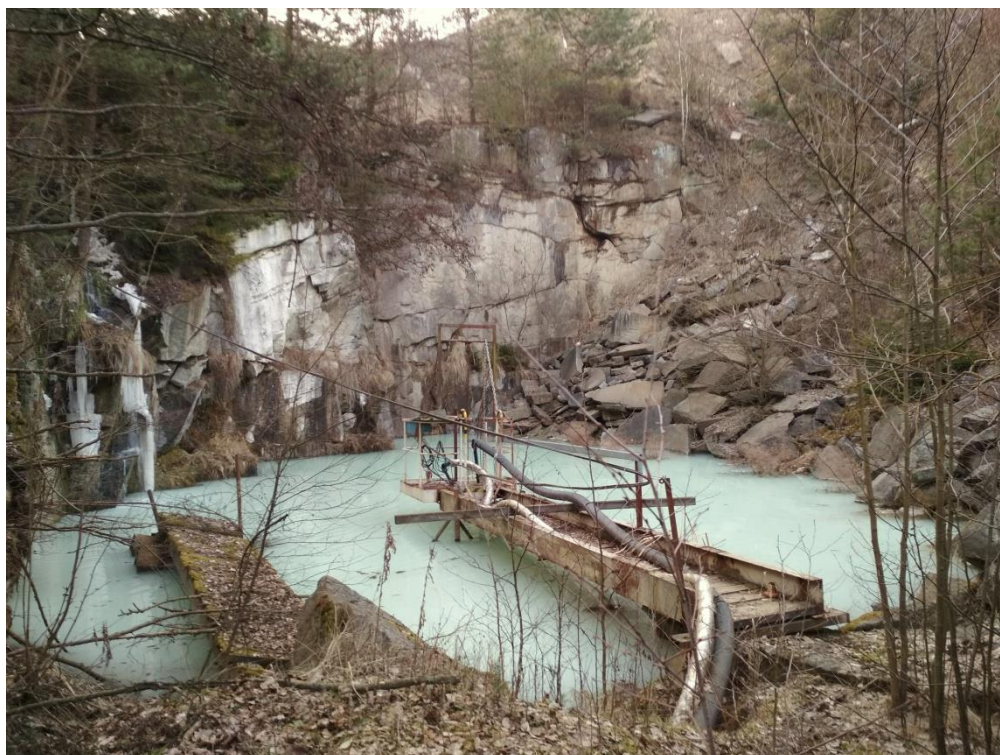
	Kompletní název taxonu	Kód preparátu	Lokalita
48 -	<i>Nitzschia linearis</i> (C. Agardh) W. Smith	NV-5. 4. 2017	Nová Ves
49 -	<i>Fragilaria nanana</i> Ange-Bertalot	Ko-041717-LE	Kojatín
50 -	<i>Cymbopleura inaequalis</i> (Ehrenberg) Krammer 2003	NV-5. 4. 2017	Nová Ves

Příloha 11: Fotografie lokality Častotice.



Fotografie pořízena 24. 3. 2018, autor Leona Eichlerová.

Příloha 12: Fotografie lokality Kamenná.



Fotografie pořízena 24. 3. 2018, autor Leona Eichlerová.

Příloha 13: Fotografie lokality Kojatín.



Fotografie pořízena 24. 3. 2018, autor Leona Eichlerová.

Příloha 14: Fotografie lokality Pocoucov.



Fotografie pořízena 24. 3. 2018, autor Leona Eichlerová.

Příloha 15: Fotografie lokality Rudíkov.



Fotografie pořízena 24. 3. 2018, autor Leona Eichlerová.

Příloha 16: Fotografie metody odběru vzorku.



Fotografie pořízena 17. 4. 2017, autor Ladislav Eichler.