

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**DNA barcode databáze pro identifikaci
rozsivek z pískoven**

DNA barcode database for identification of diatoms inhabiting
sandpits

Bakalářská práce

Tereza Reimerová

Studijní program: Tělesná výchova a sport

Studijní obor: Tělesná výchova a biologie

Olomouc 2019

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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma „DNA barcode databáze pro identifikaci rozsivek z pískoven“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce Prof. RNDr. Aloisie Pouličkové, CSc. a s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 25. 4. 2019

.....

Tereza Reimerová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Aloisii Poulíčkové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vytváření této práce. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D. za rady při vytváření mikrofotografií z preparátů.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Tereza Reimerová

Název práce: DNA barcode databáze pro identifikaci rozsivek z pískoven

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UP

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

Rok obhajoby: 2019

ABSTRAKT

Rozsivky jsou jednobuněčné organismy, patřící do skupiny mikroskopických řas, které se vyskytují ve všech vodních prostředích. Díky jejich rozšíření a citlivosti na změny prostředí jsou důležitými indikátory pro určování kvality vody. Určování rozsivek na základě morfologie pomocí světelné mikroskopie je velice časově náročné a vyžaduje taxonomickou odbornost. V současné době je pro jednodušší identifikaci rozsivek navržena metoda DNA barcodingu. DNA barcoding je založen na identifikaci pomocí krátkého úseku DNA, tzv. DNA barcodes. Pro účinné použití je zapotřebí dobře vytvořená databáze, která zahrnuje morfologická, molekulární a ekologická data o rozsivkových druzích. V této práci byla zpracována rešerše k tomuto tématu na navazující diplomovou práci, detailnější charakteristika sledované skupiny řas a byly vyzkoušeny metody sběru, izolace a kultivace materiálu. Vzorky rozsivek byly odebrány na 12 lokalitách a ze všech vytvořeny trvalé preparáty. Z 8 vzorků byly izolovány klonové kultury rozsivek pro další zpracování. Na závěr práce bylo vytvořeno praktické cvičení na téma: „Rozsivky v přírodě a pod drobnohledem“ pro studenty SŠ.

Klíčová slova: DNA barcoding, rozsivky, praktické cvičení, pískovny, Morava

Počet stran: 75

Počet příloh: 13

Jazyk: Český

BIBLIOGRAFIC IDENTIFICATION

First name and surname of the autor: Tereza Reimerová

Name of the thesis: DNA barcode database for identification of diatoms inhabiting sandpits

Type of thesis: Bachelor

Workplace: Department of Botany, Faculty of Science

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

Year of defence: 2019

ABSTRACT

Diatoms are unicellular organisms belonging to the group of microscopic algae that occur in all aquatic environments. Due to their spread and sensitivity to environmental changes, they are important indicators for water quality monitoring. Identification based on morphology by light microscopy is time consuming and requires taxonomic expertise. Currently, the DNA barcoding method is suggested for easier identification of diatoms. DNA barcoding is based on the identification of a short DNA segment, the so-called DNA barcode. A well-developed database that includes morphological, molecular and ecological data on diatom species is needed for effective use. This bachelor theses (as introduction of the diploma theses) focus on detail characterization of investigated algal group and training methods of diatom sampling, isolation and cultivation. Diatoms from 12 sites were sampled, cleaned and mounted in Naphrax pernamet slides. Finally, a practical exercise “Diatoms in nature and under microscope” arised as a didactic output for secondary school students.

Keywords: DNA barcoding, diatoms, practical exercise, sandpits, Morava

Number of pages: 75

Number of appendices: 13

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD	8
CÍLE PRÁCE	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CHARAKTERISTIKA TŘÍDY BACILLARIOPHYCEAE	10
1.1 Taxonomické zařazení a vývoj rozsivek	10
1.1.1 Systém rozsivek	12
1.2 Stavba buňky	12
1.2.1 Frustula.....	12
1.2.2 Raphe.....	14
1.2.3 Protoplast	14
1.3 Rozmnožování.....	16
1.3.1 Nepohlavní rozmnožování	16
1.3.2 Pohlavní rozmnožování.....	17
1.4 Ekologie.....	19
2 VYBRANÉ RODY PÍSKOVEN	20
3 DNA BARCODING V BIOMONITORINGU	35
3.1 Biomonitoring	35
3.2 DNA barcoding	36
3.3 DNA barcoding u rozsivek.....	36
3.4 Princip identifikace pomocí DNA barcodingu	37
PRAKTICKÁ ČÁST	39
4 LOKALITY	39
4.1 Charakteristika jednotlivých lokalit	39
5 METODIKA	44
5.1 Terénní práce	44
5.2 Laboratorní práce	44
5.2.1 Trvalé preparáty	45
5.2.2 Zpracování nativních vzorků.....	45
6 DIDAKTICKÁ ČÁST	47
6.1 Praktické cvičení určené pro studenty SŠ	47
6.2 Praktické cvičení – verze pro učitele SŠ	51
ZÁVĚR	52
REFERENČNÍ SEZNAM	53
SEZNAM PŘÍLOH	62

ÚVOD

Rozsivky jsou významnou skupinou jednobuněčných mikroskopických řas s výskytem ve sladkých, brakických i slaných vodách, v planktonu i bentosu a v široké škále ekologických podmínek s výjimkou horkých pramenů a hypersalinních vod (Zimmermann et al., 2014). Jejich citlivost k jednotlivým ekologickým faktorům je druhově specifická, proto jsou v rámci států EU využívány pro biomonitoring čistoty povrchových vod. Toto využití má velmi dlouhou tradici, v níž sehráli klíčovou roli i čeští hydrobiologové jako Prof. Vladimír Sládeček a Dr. Petr Marvan (Pouličková, 2011). Systémy indikace trofie a saprobity používané u nás i v EU jsou založeny na morfologické identifikaci rozsivek ve světelném mikroskopu a mají své nevýhody: jsou pracné, zdlouhavé a vyžadují dobrou znalost taxonomie rozsivek. Tyto nevýhody by mohly být eliminovány využitím molekulárních metod, u nichž se v blízké budoucnosti předpokládá rozvoj, větší dostupnost a snižování finančních nákladů. Ekologické informace, které jsou dostupné pro jednotlivé druhy rozsivek, je třeba propojit s moderními molekulárními metodami formou databáze (Zimmermann et al. 2014). Databáze by měla obsahovat všechny dostupné informace ke každému bioindikačnímu druhu, tj. morfometrii, morfologii s fotografickou dokumentací, ekologickou valenci a sekvenci, tzv. DNA barcode. Diatomologové z evropských zemí vytvořili na Mezinárodní diatomologické konferenci v Ghentu v roce 2011 volné společenství DIADEM, které usiluje o doplňování databáze a prosazení nové metody DNA barcodingu do norem EU.

Moje práce se věnuje dokumentaci diverzity rozsivek žijících přisedle na vodních rostlinách v dosud přehlížených vodních nádržích - pískovných.

CÍLE PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce je příprava na práci diplomovou, která by měla přispět k doplnění databáze rozsivek o druhy typické pro pískovny. Součástí DNA barcode databáze jsou data morfologická, ekologická a molekulární a má v budoucnu sloužit pro účely moderního biomonitoringu povrchových vod. Bakalářská práce je literární rešerší k danému tématu, dále je třeba nasbírat vzorky z vybraných pískoven na Moravě a naučit se metody zpracování vzorků.

Dalším cílem práce je aplikace rozsivek ve výuce na středních školách vytvořením praktického cvičení na téma: „Rozsivky v přírodě a pod drobnohledem“.

Bakalářská práce:

- 1) Vytvoření literární rešerše
- 2) Výběr lokalit a sběr vzorků
- 3) Vytvoření trvalých preparátů a kultivace vzorků
- 4) Výběr a popis nejčastěji se vyskytujících rodů rozsivek v pískovnách
- 5) Vytvoření praktického cvičení pro studenty SŠ

Diplomová práce:

- 1) Determinace vzorků na základě morfologických znaků
- 2) Izolace klonových kultur rozsivek
- 3) Izolace DNA a sekvenování
- 4) Vyhodnocení druhového složení pískoven

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA TŘÍDY BACILLARIOPHYCEAE

Rozsivky (Bacillariophyceae) jsou mikroskopické jednobuněčné eukaryotické řasy. Tyto jednobuněčné organismy mohou žít samostatně nebo vytvářet kolonie, ty jsou ve tvaru vláken, pásů či trubek (Hildebrandt, 2011). Samotnou buňku rozsivek chrání křemičitá frustula složená vždy ze dvou částí. Frustuly mohou být bilaterálně souměrné (penátní rozsivky) nebo paprscitě souměrné (centrické rozsivky). Rozsivky jsou organismy, které obsahují chlorofyl a + c, β -karoten a některé xantofyly, jako například fukoxantin, diatoxantin a diadinoxantin. Zásobní látkou rozsivek je chrysolaminaran a olej. Rozsivky se rozmnožují nepohlavně i pohlavně a jejich životní cyklus je gametický (Kalina & Váňa, 2010).

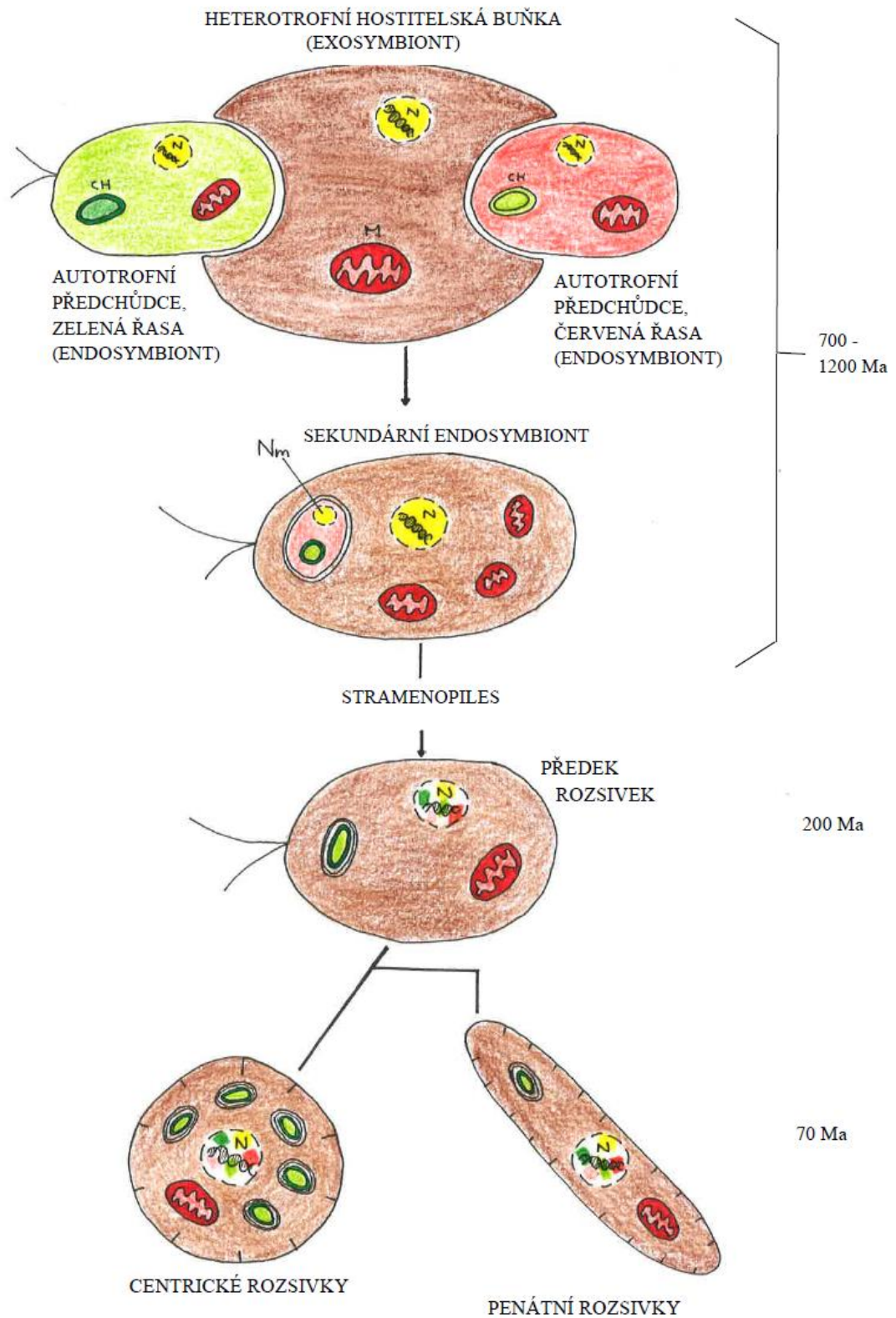
1.1 Taxonomické zařazení a vývoj rozsivek

Rozsivky patří mezi Stramenopiles do vývojové skupiny SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria) (Adl et al., 2019).

Naše znalosti o původu rozsivek rozšiřují a potvrzují informace, které byly odhaleny fylogenomickými analýzami. Již před více než 30 lety bylo na základě plastidové infrastruktury navrhnuo, že skupina Stramenopiles (součástí jsou rozsivky) se vyvinula sekundární endosymbiózou (graficky znázorněno na obr. 1). Díky této události nesou rozsivkové genomy stopy obou endosymbiotických řas (Bowler et al., 2009). Tato událost proběhla přibližně před 1200 až 700 Ma (Benoiston et al., 2017).

Skupina Bacillariophyceae se dříve rozdělovala na dvě hlavní skupiny, a to centrické a penátní rozsivky, které jsou někdy popisovány jako dva řády (Centrales a Pennales) (Hoek van den et al., 1995). Tyto dvě skupiny se od sebe odlišují symetrií schránky, vzorováním, způsobem pohlavního rozmnožování, počtem a strukturou plastidů (Round et al., 1990). Od vývojově starších rozsivek centrických se cca před 70 Ma odštěpily vývojově mladší rozsivky penátní (Theriot et al., 2010; Benoiston et al., 2017).

Nicméně Round et al. (1990) rozlišuje tři třídy – Coscinodiscophyceae (centrické rozsivky), Fragilariophyceae (penátní rozsivky bez raphe), Bacillariophyceae (penátní rozsivky s raphe).



Obr. 1: Schématické znázornění vývoje rozsivek sekundární endosymbiózou. N – jádro, Nm- nukleomorf, CH – chloroplast, M – mitochondrie (upraveno podle Benoiston et al., 2017)

1.1.1 Systém rozsivek

Systém rozsivek podle Kalina & Váňa (2010):

Podtřída: Coscinodiscophycidae (centrické rozsivky)

Řád: Coscinodiscales

Řád: Biddulphiales

Řád: Rhizosoleniales

Řád: Chaetocerales

Podtřída: Fragilariophycidae (penátní rozsivky bez raphe)

Řád: Fragilariales

Podtřída: Bacillariophycidae (penátní rozsivky s raphe)

Řád: Eunotiales

Řád: Naviculales

Řád: Achnanthes

Řád: Bacillariales

Řád: Epithemiales

Řád: Surirellales

1.2 Stavba buňky

Buňky rozsivek jsou uloženy v křemičité schránce a jsou vždy jednojaderné. Stélka je kokální a ve vegetativním stádiu se u nich nenacházejí bičíky. U zástupců penátních rozsivek bičíkatá stádia vůbec nenajdeme. Buněčná stěna je tvořena pektinovou vrstvou a ta je chráněna již zmíněnou křemičitou schránkou (frustula) (Zerov, 1977). Pohyb u některých rodů rozsivek je umožněn díky podélné šterbině (raphe), která prochází přes schránku (Hindák et al., 1978). Frustula, raphe a protoplast jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

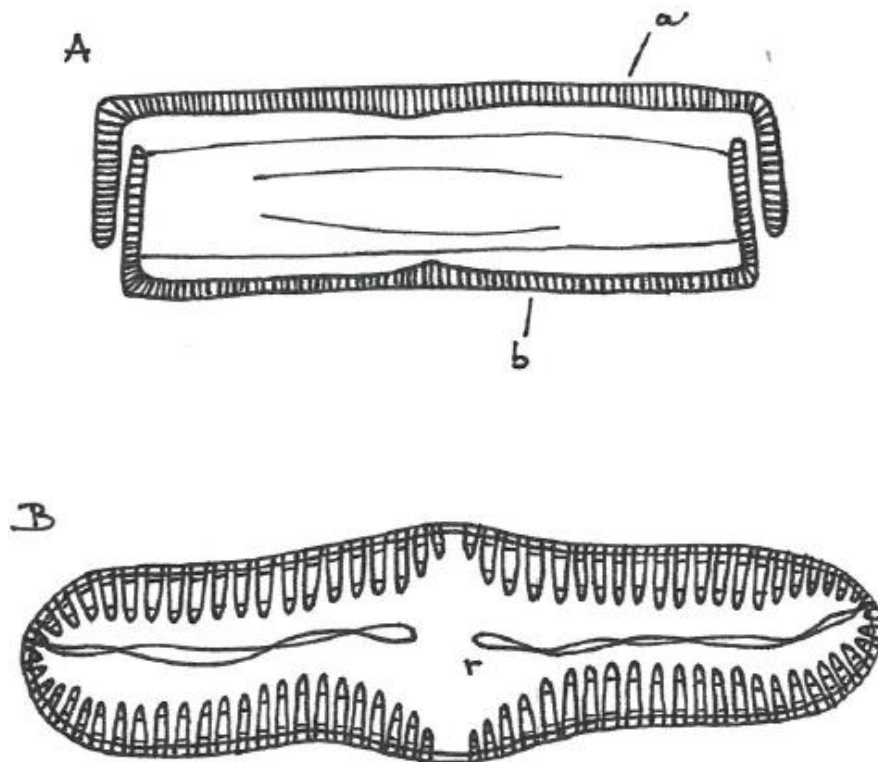
1.2.1 Frustula

Hlavním znakem rozsivek je křemičitá frustula (Kalina & Váňa, 2010). Kompletní frustula se obvykle skládá ze dvou částí tzv. thek (Cox, 2011). Větší theka je označována jako epitheka a přikrývá menší theku (hypotheku) jako víko krabičku. Výška těchto dvou polovin je přibližně stejná. Každá z polovin je tvořena ze dna (valva) a boční části theky

(pleura). Pleura epitheky překrývá pleuru hypotheky (Fott, 1956). Některé centrické rozsivky pleuru nemají a uzavírají se ohnutými okraji valvy. Schránky mají složitou stavbu, na které můžeme rozeznat řadu struktur jako tečky, rýhy, lišty a také komůrky (areoly). Prostřednictvím teček, které představují póry, je protoplast spojen s vnějším okolím (Zerov, 1977). Při pozorování jednotlivých schránek v mikroskopu rozeznáváme valvární pohled (vidíme plochu misky) a pleurální pohled (pozorujeme buňku z boku) (Kalina & Váňa, 2010) (viz obr. 2).

Frustula je považována za pilíř a její morfologie je většinou popsána ze dvou pohledů, valvy a bočního pásu (pleury, angl. girdle). Ty se nacházejí na čelní straně a z boku frustuly. Větší morfologickou variabilitu vykazují pohledy na valvy než na pleury. Valvy mohou mít tvar kruhový až oválný nebo různě podlouhlý až sigmoidní (Cox, 2011). Varianty tvaru a jejich popisy lze nalézt v Hendeý (1964) a Barber & Haworth (1981).

Schránka u rozsivek může mít buď bilaterální souměrnost (penátní rozsivky) nebo radiální souměrnost (centrické rozsivky) (Hindák et al., 1978).



Obr. 2: Frustula. A – pleurální pohled, B – valvární pohled, a – epitheka, b – hypotheka, r – raphe (upraveno podle Oltmannse, 1922)

1.2.2 Raphe

U většiny penátních rozsivek kromě čeledi *Fragilariaceae* probíhá přes valvu podélná štěrbinová rapha. Štěrbinovitá rapha většinou probíhá středem misky, zřídka je posunutá k jednomu z jejích okrajů (*Cymbella*). U některých vývojově odvozených typů rozsivek nastala úplná nebo částečná redukce raphe aspoň na jedné z misek. Ty druhy, u kterých se rapha vyvinulo, mají schopnost aktivního pohybu. Ten se vysvětluje prouděním cytoplazmy ve štěrbinách nebo v kanálku raphe (Hindák et al., 1978). Typy rozsivek bez raphe mají v místech, kde rapha bývá, přerušeno rýhování (pseudoraphe) (Zerov, 1977).

Raphe je často rovná, avšak výjimkou jsou její centrální a pólové uzly (Round et al., 1990). Můžeme si představit, že růst raphe končí, když narazí na tuhou překážku, jako je centrální uzel nebo stěna ephitheky. Ostrost ohýbání konce může odrážet tuhost překážky (Gordon & Tiffany, 2011).

První nález rozsivky s raphe byl z období paleocenu na území Ruska (Sim et al., 2006).

1.2.3 Protoplast

Protoplast vyplňuje celou buňku rozsivek a zasahuje i do raphe. Ve středu buňky je uloženo ± kulovité jádro. Uvnitř jádra je umístěno jedno nebo více jadérek (nukleolů) a drobná chromatinová zrnka (Fott, 1956). Rozmístění chromatinu v interfázním jádře je druhově specifické a je možné ho pozorovat po obarvení (Pouličková et al. 2010).

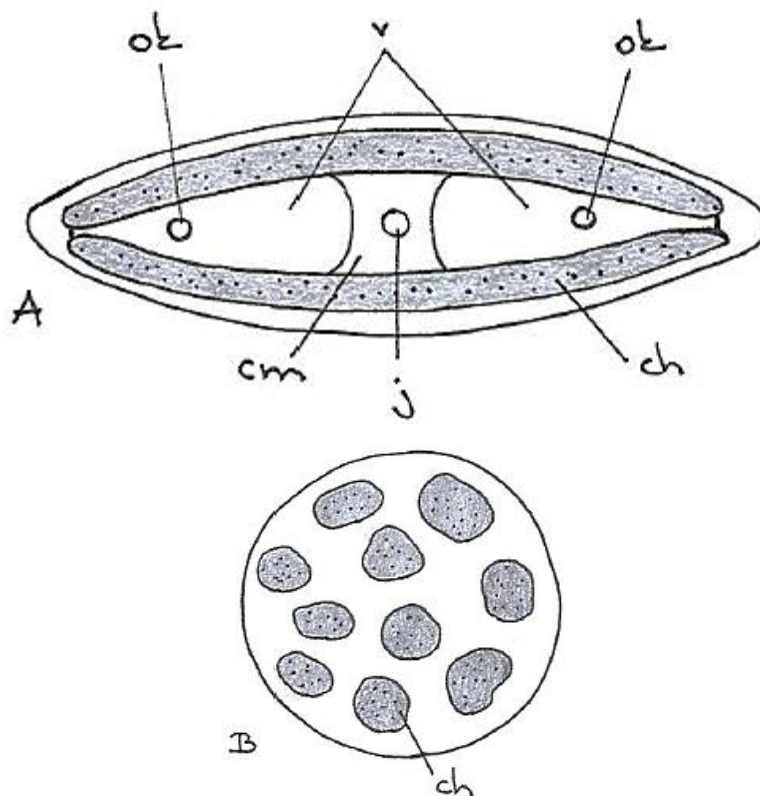
Chloroplasty mohou být velké a deskovité, buď s členitými, nebo s celistvými okraji či laloky. Mohou to být také malé kotoučovitě struktury (Cox, 1996). Chloroplasty jsou obvykle zlatavě hnědé, protože chlorofyl je maskován pomocným pigmentem fukoxantinem (Hoek van den et al., 1995). Kromě fukoxantinu a chlorofylu obsahují tyto organely ještě další pigment, β -karoten (Fott, 1956). U každého plastidu je v elektronovém mikroskopu možné vidět, že je obklopen čtyřmi membránami. Vnější dvě představují plastické endoplasmatické retikulum a další dvě jsou membrány samotné organely. Uvnitř plastidů je řada více či méně paralelních lamel, z nichž každá je tvořena třemi thylakoidy, které vedou přes celou délku plastidu. DNA plastidu je lokalizována v kruhu kolem jeho okraje, těsně pod pleurou (Round et al., 1990). U větších plastidů je někdy viditelné jedno nebo více bílkovinných tělísek (pyrenoidy). U taxonů s větším množstvím plastidů jsou plastidy zhruba kruhovitě tvaru a jsou nepravidelně

rozmístěny po obvodu buňky (obr. 3, B). U taxonů s menším množstvím plastidů jsou tyto plastidy poměrně velké a zaujmají charakteristické místo v buňce (obr. 3, A).

Většina buněk obsahuje jednu nebo dvě vakuoly (obr. 3, v), takže cytoplazma je periferní. Některé rozsivky vytvářejí cytoplazmatický můstek (obr. 3, cm) obsahující jádro (obr. 3, j). Často jsou také v mikroskopu viděny olejové kapky (obr. 3, ok) a zrnité inkluze (Cox, 1996).

Stejně jako chloroplasty, jádro, vakuoly, obsahují buňky rozsivek také mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a ribozomy, všechny orgány charakteristické pro eukaryotické buňky (Hoek van den et al., 1995).

U rozsivek jsou nejdůležitějšími zásobními látkami chrysolaminaran a β -1, 3-glukan (Roessler, 1987), které jsou uloženy v roztocích ve speciálních vakuolách. Chrysolaminaran se jako zásobní látka vyskytuje také u Chrysophyceae (zlativky) a Phaeophyceae (chaluhy). Rozsivky často ve svých buňkách hromadí i tuky (Hoek van den et al., 1995).



Obr. 3: Protoplast rozsivek. A – penátní rozsivka, B – centrická rozsivka, ch – chloroplast, v – vakuola, j – jádro, cm – cytoplazmatický můstek, ok – olejové kapičky (upraveno podle Cox, 1996)

1.3 Rozmnožování

Kromě typické stavby schránky u rozsivek je u nich typický také jejich životní cyklus, ve kterém hraje velkou roli velikost a pohlaví. Navíc je cyklus rozsivek oproti jiným jednobuněčným organismům poměrně dlouhý (Mann, 2011). Během životního cyklu se střídají dvě fáze:

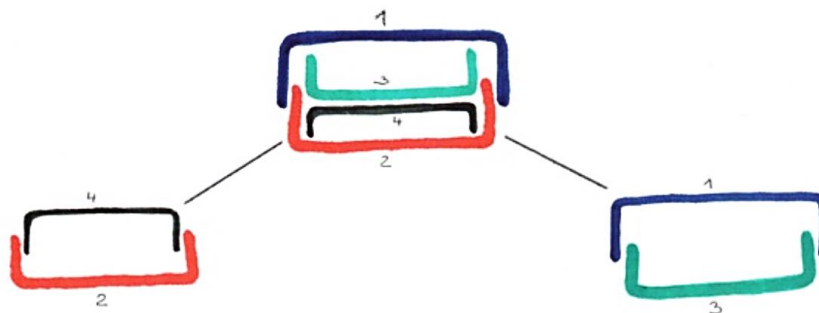
1) Vegetativní fáze, ve které se buňky rozmnožují nepohlavně mitoticky a jejich buňky se neustále zmenšují. Tato fáze může trvat měsíce až roky.

2) „Omlazovací fáze“ – pohlavní rozmnožování, které trvá několik dní a které obnoví velikost buněk na maximum pomocí speciální buňky, auxospory (Round et al., 1990).

1.3.1 Nepohlavní rozmnožování

U rozsivek převládá nepohlavní rozmnožování, tzv. dělení. Při tomto dělení vzniknou dvě dceřiné buňky a každá z nich obdrží jednu polovinu frustuly. Protože si mohou dotvořit pouze hypoteku (menší část frustuly), tak dochází k tomu, že část populace, která při dělení obdržela hypoteku, se v průběhu vegetativního množení zmenšuje (obr. 4). Tomuto principu, který je u rozsivek unikátní, se říká Pfitzner-MacDonaldovo pravidlo (Pfitzner, 1869; Macdonald, 1869). K neustálému zmenšování buněk dochází až do dosažení pohlavní zralosti. Pohlavního rozmnožování jsou rozsivky schopné v určitém velikostním rozpětí, které je druhově specifické (Kalina & Váňa, 2010). Jako je tomu u buněk všech organismů, i buňka rozsivek musí zdvojnásobit všechny své organely, replikovat chromozomy a následně vše rozdělit mezi dvě dceřiné buňky (Round et al., 1990).

Dobře lze změnu velikosti schránky pozorovat na velkých rozsivkách, protože je viditelné, že hypoteka je menší než epitheka (Round et al., 1990).



Obr. 4: Schéma dělení schránky u rozsivek. 1 – epitheka mateřské buňky, 2 – hypoteka mateřské buňky, 3 – nově vytvořená hypoteka, 4 – nově vytvořená hypoteka

Například u velkého rodu *Coscinodiscus* se může průměr schránky zmenšit z 600 na 250 μm , což způsobí také snížení objemu buňky. Takové velké změny velikostí vedou k problémům v identifikaci a klasifikaci rozsivek. Hlavně kvůli tomu, že u většiny druhů není známá celá škála velikostí od počáteční největší buňky (iniciální buňky) po pohlavně aktivní buňku (gametangium), nebo nejsou tyto informace dostatečně dokumentovány (Round et al., 1990).

U centrických rozsivek se hlavní tvarové vlastnosti schránky téměř nemění. U penálních rozsivek zůstává struktura a vzorování schránky stejné, ale její obrys se může z lineárního či lineárně-kopinatého změnit na oválný až téměř kruhový. Děje se tak proto, že šířka schránky u penálních rozsivek klesá úměrně mnohem pomaleji než jejich délka (např. rody *Rhaphoneis* a *Delphineis*) (Round et al., 1990).

Nicméně existuje několik záznamů (Geitler, 1932; Locker, 1950), hlavně z experimentálních studií, že u některých taxonů k redukci velikosti vůbec nedochází. Avšak není dosud známo, jak často se tento jev vyskytuje v přírodě. U *Eunotia pectinalis* (Geitler, 1932) je teoreticky možné, a v kulturách se vyskytující, že její dceřiné schránky mohou být větší než rodičovské. Ovšem za předpokladu, že pleura je dostatečně klenutá (Round et al., 1990).

1.3.2 Pohlavní rozmnožování

Po fázi nepohlavního rozmnožování (dělení), kdy se buňky neustále zmenšují, následuje fáze auxosporulace, kdy se díky expanzi auxospory obnoví výchozí velikost buňky. Této fázi většinou (existují výjimky) předchází meióza a pohlavní rozmnožování (Round et al., 1990). Pohlavního rozmnožování jsou rozsivky schopné v určitém velikostním rozpětí, které je druhově specifické (Kalina & Váňa, 2010).

Rozsivky jsou diploidní a meióza nastává během gametogeneze (Mann, 2011). Jedinou haploidní buňkou u rozsivek je gameta (Kalina & Váňa, 2010). K tomu, aby se buňky začaly pohlavně množit, jsou potřebné, kromě dosažení určitého rozpětí velikosti, také faktory prostředí: optimální podmínky a hustota populace (Mann, 2011).

Důležitým objevem v rozmnožování rozsivek je fakt, že mnoho penálních rozsivek je heterothalických a většina centrických, kromě výjimek, je homothalických. Jsou to obecně proterogyniční hermafroditi, kteří v první fázi produkují samičí vaječnou buňku. Následuje fáze druhá, kdy buňka produkuje samčí pohlavní buňky, spermatozoidy. Tyto fáze se často překrývají (Chepurnov & Mann, 2004).

U centrických rozsivek probíhá oogamie. V tomto procesu dochází k oplodnění velké samičí nepohyblivé buňky menší pohyblivou samčí gametou (spermatozoid) za vzniku auxospory (Round et al., 1990). Spermatozoidy mohou vznikat více způsoby. V nejjednodušším případě dochází k přímé produkci spermatocytů pomocí nediferencovaných buněk (Geitler, 1952). V jiných případech jsou spermatocyty produkovány spermatogoniemi, což jsou diferencované a mitoticky aktivní buňky. Spermatozoidy centrických rozsivek jsou jediným monadoidním stádiem u rozsivek a mají jeden bičík (Round et al., 1990). Vaječné buňky jsou produkovány jednodušeji než spermatozoidy, protože mezi vegetativní buňkou a oocytem neprobíhá mitóza. Oocyt se od vegetativní buňky liší větší délkou, hustší cytoplazmou a četnějšími plazmidy. Mohou se vytvářet tři různé typy vaječných buněk v závislosti na tom, jestli po meióze I nastává cytokineze či nikoli (Drebes, 1977).

Penátní rozsivky se rozmnožují izogamicky (obě gamety jsou stejné morfologicky i chováním) nebo anizogamicky (jedna z gamet je aktivní, druhá pasivní). Tyto rozsivky mají bezbičíkaté gamety omezeného, amoeboidního pohybu. Po splynutí gamet vzniká zygota, nazývaná auxospora. Auxospora začne expandovat, vyvíjet a uvnitř ní vzniká iniciální buňka, která obnoví velikost buňky redukovanou vegetativním dělením (Kalina & Váňa, 2010).

U některých druhů nebylo pohlavní rozmnožování dosud pozorováno a u některých pouze v určitých podmínkách (Mann, 2011). Například u mořské bentické rozsivky *Cocconeis scutellum* var. *ornata* probíhá pohlavní proces při kombinaci nízkých teplot (10 - 14°C) a krátkých dnů. Zatímco pro vegetativní růst jsou nejlepší podmínky při vyšších teplotách (14 - 18°C) a delších dnech (Mizuno & Okuda, 1985).

Pokud u populace rozsivek nedojde k pohlavnímu rozmnožování v daném velikostním rozmezí, buňky se dále dělí, délka se zmenšuje, schránky se deformují a populace odumře.

1.4 Ekologie

Na celém světě existuje více než 250 rodů žijících rozsivek s přibližně 100 000 druhy (Round et al., 1990). Bacillariophyceae jsou rozšířeny ve sladkovodních i mořských stanovištích a kromě moře a sladké vody se mohou některé druhy vyskytovat také na vlhkých skalách nebo na půdě. V mořích se vyskytují spíše centrické rozsivky, zatímco ve sladkých vodách převládají rozsivky penátní (Fott, 1956).

Fytoplankton oceánů se skládá z velkého množství rozsivek. Zejména ve vodách bohatých na živiny jsou rozsivky z velké části odpovědné za velmi vysokou primární produktivitu, která zde probíhá (Seibold & Berger, 1982). Velké fosilní nánosy z minulých geologických období (v třetihorách) jsou nyní těženy jako křemelina. Ta se využívá pro výrobu filtrů, deodorantů, odbarvujících činidel a jako brusivo, například v zubní pastě (Hoek van den et al., 1995).

Planktonní rozsivky ve sladkých vodách jsou tvarově mnohem jednodušší než mořské. Vlastnosti vod na jednotlivých stanovištích jsou dobře charakterizovány některými druhy, které slouží jako bioindikátory: oligotrofní vody rod *Cyclotella* a *Synedra*, eutrofní vody rod *Melosira* a *Stephanodiscus hantzschii* a vody dystrofní rod *Frustulia* a *Tabellaria flocculosa*. Dají se využít jako indikátory fyzikálně - chemických vlastností povrchových vod (Fott, 1956).

Kromě planktonních rozsivek existuje také mnoho bentických forem žijících na rostlinách, sedimentech nebo na skalách (McIntire & Moore W. Wendy, 1977). Tyto bentické druhy většinou patří do skupiny penátních rozsivek. Mnoho z nich má raphe, díky kterému se mohou pohybovat přes nebo skrz substrát (Hoek van den et al., 1995). Bentické rozsivky jsou z ekologického hlediska méně pochopeny než planktonní druhy. Z hlediska počtu druhů a forem života je bentos mnohem pestřejší než výše zmiňovaný plankton (Round et al., 1990).

Další druhy rozsivek můžeme rozlišit podle substrátu, na kterém žijí, na epipsamické (písčítý substrát), epilithické (skála nebo kamenitý substrát), epifytické (na rostlinném substrátu) a epizotické (na zvířatech) (Round et al., 1990).

Epifytické rozsivky, které se vyskytují na ponořených rostlinách a řasách, mohou být připevněny k podkladu pomocí slizové stopky (*Gomphonema*), slizového polštářku (*Synedra*) nebo leží ve slizových trubicích (*Encyonema*) (Fott, 1956).

2 VYBRANÉ RODY PÍSKOVEN

Pískovny/štěrkovny jsou jámy po těžbě štěrkopísku zaplavené vodou. Bývají hluboké a poměrně čisté s chudým fytoplanktonem. Litorál nebývá vyvinutý s ohledem na strmé břehy. Vývoj eutrofizace těchto lokalit je závislý na charakteru okolních pozemků (lesy, pole, louky, bodové zdroje živin) a způsobu využití (rybaření, rekreace atd.) (Heteša et al., 2012).

Rozsivky pískoven a štěrkoven v České Republice nejsou zatím významněji prozkoumány. Ze štěrkoven v Podyjí uvádí Heteša et al. (2012) zejména rody *Synedra*, *Cymbella*, *Diatoma*, *Cyclotella*, *Navicula*, *Achnantheidium*, *Amphora*, *Rhopalodia*, *Fragilaria*, *Gomphonema*, *Nitzschia*, *Cocconeis*. Stejně rody z pískoven popisuje i John (1993), zdá se však, že druhové složení je odlišné a koresponduje s výrazně kyselejším pH těchto lokalit v Západní Austrálii. Práce Navrátila & Pouličkové (2001) se zabývá fytoplanktonem štěrkoviště Chomoutov u Olomouce, kde bylo popsáno 13 druhů rozsivek. V podobných lokalitách - vytěžených lomech v okolí Plzně - bylo nalezeno 31 druhů rozsivek (Valešová, 2015). Na Slovensku bylo prozkoumáno více pískoven a štěrkoven. Tyto práce popisují druhové složení sinic a řas ve štěrkovnách na Slovensku. Z výsledků studií je patrné, že rozsivky tvoří více než polovinu skladby studovaných organismů (sinic a řas) (Kapusta & Kováčik, 2000; Hindák & Hindáková, 2002; Hindák & Hindáková, 2003; Hindák & Hindáková, 2005; Hindáková & Hindák, 2014). Detailněji rozsivky studovala Hindáková (1996) ve štěrkovnách v Bratislavě.

Na základě literárních údajů, zejména rozsivkové flóry pískoven jižní Moravy (Heteša et al., 2012), jsem do další části vybrala 12 nejčastějších rodů rozsivek, které jsem ve svých vzorcích nacházela, dokumentovala a blíže je charakterizovala. Přiložené fotografie byly pořízeny pomocí světelného mikroskopu (a kamery) při zvětšení 100x. Na každé stránce je přiloženo měřítko 10 μm , které je platné pro všechny fotografie na stránce. Určování jednotlivých druhů rozsivek bylo provedeno pomocí klíče pro identifikaci bentických rozsivek (Hofmann et al., 2013). Nomenklatura penátních rozsivek byla sjednocena podle Hofmann et al. (2013) a centrických rozsivek podle Kaštovský et al. (2018).

Vybrané rody rozsivek jsou: *Navicula*, *Nitzschia*, *Gyrosigma*, *Cocconeis*, *Meridion*, *Fragilaria*, *Amphora*, *Cyclotella*, *Cymbella*, *Gomphonema*, *Cymatopleura*, *Caloneis*.

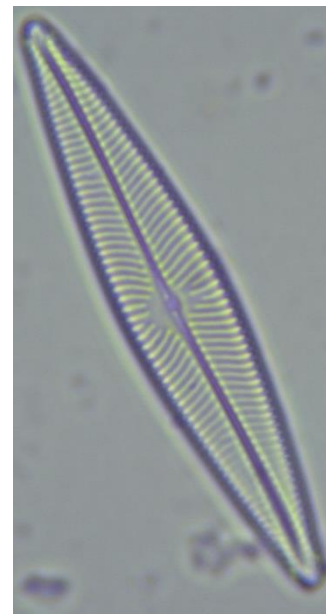
2.1 *Navicula*

Většina druhů rodu *Navicula* se nachází ve valvárním pohledu, avšak některé druhy leží v pleurálním pohledu. Buňky obsahují dva chloroplasty, které se nacházejí podél pleury. V každém chloroplastu je podlouhlý tyčovitý pyrenoid. Valvy mají kopinatý až lineární tvar. *Navicula* je epipelický, velice běžný rod. Jedná se o druhy sladkovodní i mořské a žijí samostatně (Round et al., 1990).

Rod *Navicula* se vyskytoval ve všech vybraných pískovnách.



Obr. 5: *Navicula radiosa*
Kützing, lokalita: Pískovny mezi
Olomoucí a Chomoutovem,
autor Tereza Reimerová



Obr. 6: *Navicula radiosa*
Kützing, lokalita:
Hlušovice, autor Tereza
Reimerová



Obr. 7: *Navicula cryptocephala* Kützing,
lokalita: Šlajza, autor Tereza Reimerová

2.2 *Nitzschia*

Obvykle mají rovný jehlicovitý tvar, někdy sigmoidní. Obsahují dva chloroplasty, každý leží na jednom konci buňky (bipolární). Chloroplasty u rodu *Nitzschia* obsahují jeden až mnoho tyčkovitých pyrenoidů. Valvy jsou úzké, lineární, kopinaté nebo eliptické. Vyskytují se ve sladké, ale i slané vodě, obvykle jsou epipelické nebo planktonní. Mohou se vyskytovat jednotlivě, tvoří řetězovité či hvězdicovité kolonie nebo žijí ve slizovitých trubkách (Round et al., 1990).

Rod *Nitzschia* se vyskytoval ve všech vybraných pískovnách.



Obr. 8: *Nitzschia* sp. Hassall, lokalita: Chomoutovské jezero, autor Tereza Reimerová



Obr. 9: *Nitzschia* sp.
Hassall, lokalita: Krčmaň,
autor Tereza Reimerová



Obr. 10: *Nitzschia* sp.
Hassall, lokalita:
Příkazská šterkovna, autor
Tereza Reimerová

2.3 *Gyrosigma*

Buňky rodu *Gyrosigma* leží obvykle ve valvárním pohledu. Obsahují dva velké deskovité chloroplasty podél pleury. Okraje chloroplastů jsou často laločnaté. Valvy jsou sigmoidní, lineární až kopinaté. Raphe se obvykle nachází podél středové linie valvy a má také sigmoidní tvar. Jedná se převážně o epipelické druhy, které žijí v brakických biotopech, ale zasahují i do mořských a sladkovodních stanovišť. Žijí samostatně, někdy uvnitř slizových trubek (Round et al., 1990).

Rod *Gyrosigma* se vyskytoval v těchto pískovnách: Šlajza, Medkovy rybníky, Hrubý rybník (Hráza), Krčmaň, Poděbrady, Náklo, Chomoutovské jezero.

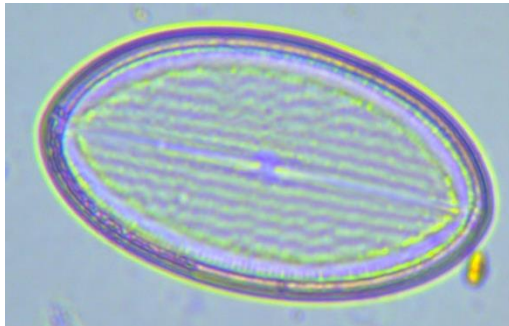


Obr. 11: *Gyrosigma obtusatum* (Sullivan & Wormley) C. S. Boyer, lokalita: Náklo, autor Tereza Reimerová

2.4 *Cocconeis*

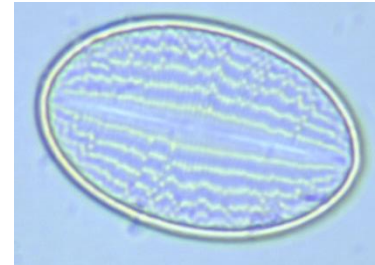
Ve většině případů leží rod *Cocconeis* ve valvárním pohledu. Obsahují jeden chloroplast, který je plochý a tvarem připomíná písmeno C. Okraje chloroplastu mohou být celistvé nebo výrazně laločnaté. Uvnitř chloroplastu se nachází jeden až několik podlouhlých pyrenoidů. Valvy jsou eliptické až kruhové. Jedna valva obsahuje raphe a druhá valva pseudoraphe. Obě raphe jsou centrální a rovné. Jedná se o sladkovodní i mořské druhy žijící na rostlinách, skalách a jiných substrátech. Na substráty jsou buňky připojeny slizem. Žijí samostatně a nevytvářejí kolonie (Round et al., 1990).

Rod *Cocconeis* se vyskytoval v těchto písčovnách: Šlajza, Medkovy rybníky, Krčmaň, Poděbrady, Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, Hlušovice, Příkazská štěrkovna, Náklo, Kaluhy, Nemilanská písčovina, Chomoutovské jezero.



Obr. 12: *Cocconeis placentula*
Ehrenberg, lokalita: Pískovny
mezi Olomoucí a Chomoutovem,
autor Tereza Reimerová

10 μm



Obr. 13: *Cocconeis placentula*
Ehrenberg, lokalita: Příkazská
štěrkovna, autor Tereza
Reimerová

2.5 *Meridion*

Buňky rodu *Meridion* přiléhají valvami těsně k sobě a vytvářejí vějířovité kolonie. Obsahují mnoho chloroplastů, které jsou spíše nepravidelné, diskoidní a leží podél valvy. Valvy mají klínovitý tvar. Tento rod patří k výhradně sladkovodním zástupům rozsivek. Nejčastěji je přisedlý na kamenech či rostlinách. Rod *Meridion* je podobný rodům *Fragilaria*, *Hannaea* a *Synedra*.

Rod *Meridion* se vyskytoval v těchto písčovnách: Šlajza, Hrubý rybník (Hráza), Krčmaň, Náklo, Chomoutovské jezero.

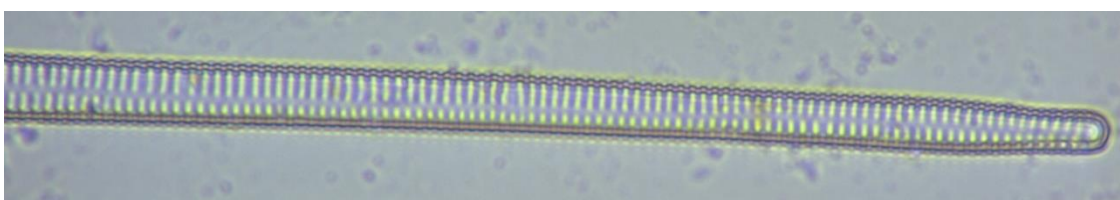


Obr. 14: *Meridion* sp. C. Agardh, lokalita:
Náklo, autor Tereza Reimerová

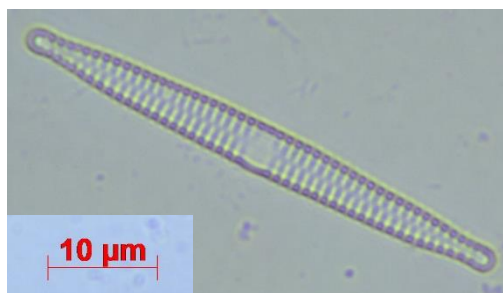
2.6 *Fragilaria*

Buňky rodu *Fragilaria* jsou spojeny středem buněk a vytváří pásovité kolonie. Obsahují dva centrální deskovité plastidy. Valvy mohou být lineární, lineárně-kopinaté a eliptické. Mnoho druhů se vyskytuje na sedimentech ve sladkých vodách a jen zřídka v planktonu (Round et al., 1990).

Rod *Fragilaria* se vyskytoval v těchto pískovnách: Šlajza, Poděbrady, Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, Hlušovice, Příkazská štěrkovna, Náklo, Kaluhy, Nemilanská pískovna, Chomoutovské jezero.



Obr. 15: *Fragilaria ulna* (Nitzsch) Lange-Bertalot, lokalita: Náklo, autor Tereza Reimerová



Obr. 16: *Fragilaria* cf. *radians* (Kützing) Williams & Round, lokalita: Příkazská štěrkovna, autor Tereza Reimerová

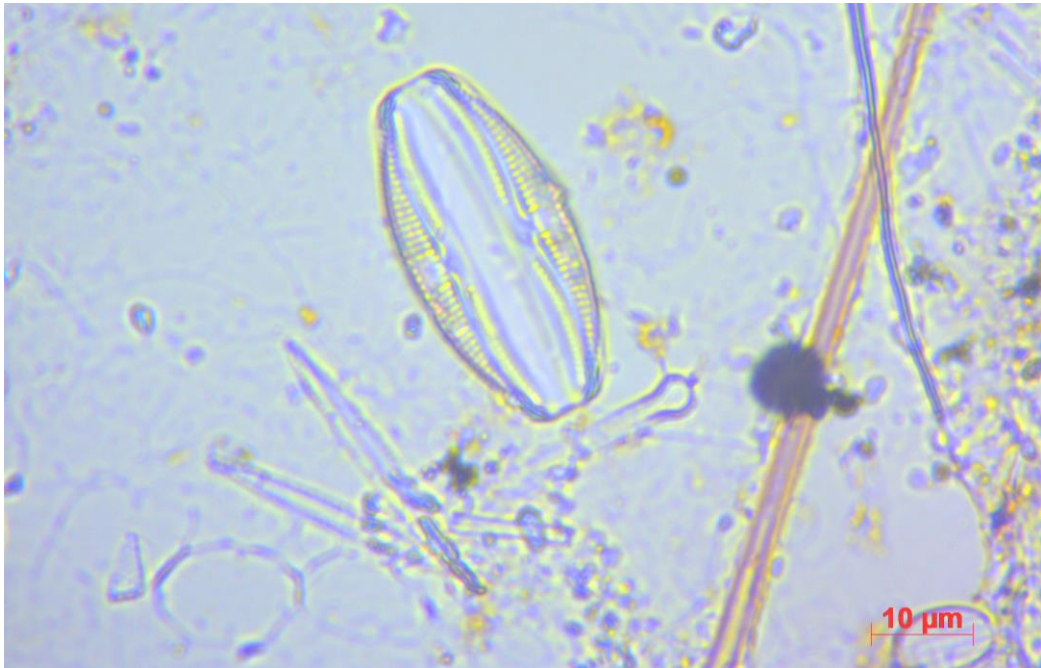


Obr. 17: *Fragilaria construens* f. *subsalina* Hustedt, lokalita: Chomoutovské jezero, autor Tereza Reimerová

2.7 *Amphora*

Téměř vždy rod *Amphora* můžeme pozorovat v pleurálním pohledu. Jeho tvar je pak eliptický nebo kopinatý se zkrácenými konci. Obsahuje obvykle 1 – 2 chloroplasty, které jsou velmi různorodé tvarem, strukturou i polohou. Raphe na obou valvách leží na stejné (ventrální) straně. Valvy jsou asymetrické kolem apikální roviny a někdy jsou zúženy uprostřed nebo v blízkosti pólů. Struktura pleury je velice důležitá pro správnou identifikaci. Jedná se především o rod žijící v mořích, ale najdou se zástupci i ve sladkých vodách. Buňky rodu *Amphora* žijí samostatně, obvykle jsou pohyblivé, někdy mohou být přisedlé (Round et al., 1990).

Rod *Amphora* se vyskytoval v těchto pískovnách: Šlajza, Medkovy rybníky, Nemilanská pískovna, Chmoutovské jezero.

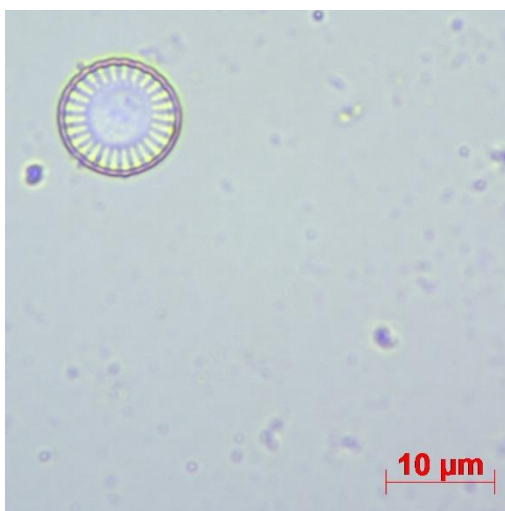


Obr. 18: *Amphora ovalis* Kützing, lokalita: Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, autor Tereza Reimerová

2.8 *Cyclotella*

Buňky u *Cyclotelly* jsou krátké a mají bubnovitý tvar. Uvnitř buňky se nachází mnoho chloroplastů diskoidního tvaru. Valvy jsou kruhovitěho tvaru s koncentrickým zvlněním čelní strany. Druhy rodu *Cyclotella* jsou hlavně sladkovodní a planktonní. Mohou žít volně, nebo vytvářet vlákna, řetězce či shluky spojené slizem (Round et al., 1990). Tento rod je velice podobný rodům *Stephanodiscus* a *Cyclostephanos*.

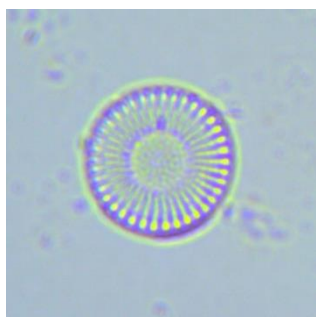
Rod *Cyclotella* a *Stephanodiscus* se vyskytovaly v těchto pískovnách: Šlajza, Medkovy rybníky, Hrubý rybník (Hráza), Krčmaň, Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, Hlušovice, Příkazská šterkovna, Náklo, Nemilanská pískovna.



Obr. 20: *Cyclotella meneghiniana* Kützing, lokalita: Nemilanská pískovna, autor Tereza Reimerová



Obr. 19: *Puncticulata balatonis* (Pantocsek) Wojtal & Budzynska, lokalita: Hlušovice, autor Tereza Reimerová



Obr. 21: *Cyclostephanos dubius* (Hustedt) Round, lokalita: Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, autor Tereza Reimerová

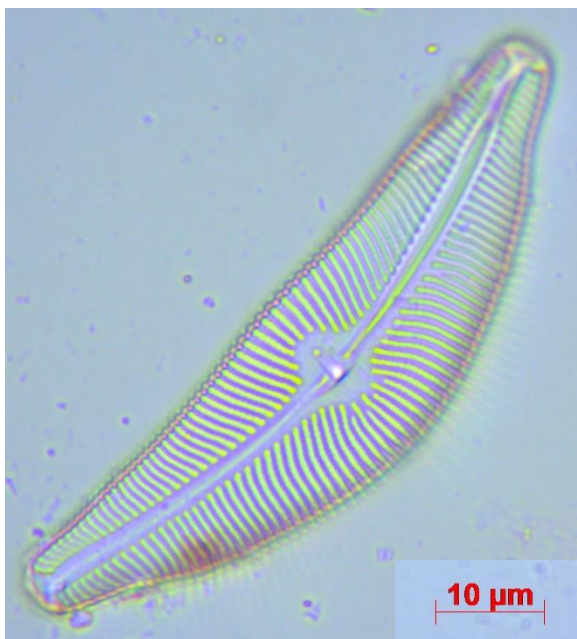


Obr. 22: *Cyclostephanos dubius* (Hustedt) Round, lokalita: Příkazská šterkovna, autor Tereza Reimerová

2.9 *Cymbella*

Buňky u rodu *Cymbella* jsou mírně až silně dorsoventrální. Obsahují jeden chloroplast, který se skládá ze dvou desek a jeho tvar připomíná písmeno H. K dorzální straně pleury je chloroplast připojen můstkem obsahující pyrenoid. Okraje chloroplastů jsou většinou celistvé, výjimkou je *Cymbella lanceolata*, u které mají chloroplasty laločnaté okraje. Valvy jsou téměř naviculoidní a silně obloukovité. Raphe leží podél středové linie valvy. Druhy rodu *Cymbella* jsou epifytické, epilithické nebo epipelické a žijí ve sladkovodních ekosystémech. Vyskytují se volně nebo mohou vytvářet kolonie tvořící větvené slizové stonky. Tento rod je podobný rodu *Encyonema*. Liší se dorzálním plastidem, ventrálním jádrem, strukturou a orientací raphe (Round et al., 1990).

Rod *Cymbella* se vyskytoval v těchto pískovnách: Šlajza, Medkovy rybníky, Hrubý rybník (Hráza), Pískovny mezi Olomocí a Chomoutovem, Hlušovice, Příkazská šterkovna, Náklo, Nemilanská pískovna.



Obr. 23: *Cymbella tumida* (Brébisson)

Van Heurck, lokalita: Šlajza, autor

Tereza Reimerová



Obr. 24: *Cymbella neocystula*

Krammer, lokalita: Příkazská

šterkovna, autor Tereza Reimerová

2.10 *Gomphonema*

Tvary rodu *Gomphonema* mohou být různorodé. Obsahují jeden chloroplast, ležící na jedné straně pleury, ve kterém se nachází pyrenoid. Valvy jsou lineární nebo kopinaté, heteropolární, s jedním pólem úzkým a druhým pólem rozšířeným. Raphe je centrální. Rod *Gomphonema* je velmi rozšířený ve sladkých vodách. Buňky tvoří kolonie a rozvětvené slizovité stonky připojené k pevnému substrátu. (Round et al., 1990).

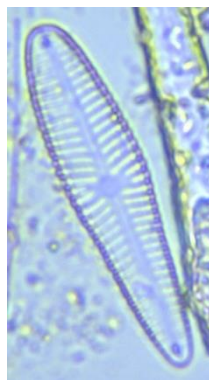
Rod *Gomphonema* se vyskytoval v těchto pískovnách: Šlajza, Medkovy rybníky, Krčmaň, Poděbrady, Kaluhy, Chomoutovské jezero.



Obr. 25: *Gomphonema truncatum* Ehrenberg, lokalita: Šlajza, autor Tereza Reimerová



Obr. 26: *Gomphonema acuminatum* Ehrenberg, lokalita: Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, autor Tereza Reimerová



Obr. 27: *Gomphonema* sp. Ehrenberg, lokalita: Poděbrady, autor Tereza Reimerová

2.11 *Cymatopleura*

Frustula je izopolární, občas zkroucená kolem apikální osy. Buňka obsahuje jeden chloroplast, který je složen ze dvou úzce spojených velkých desek. Okraje chloroplastu jsou často velice laločnaté a zasahují do pleury. Valvy jsou ve tvaru “buráku“, nebo lineární až eliptické. Raphe probíhá podél celého obvodu valvy. Ačkoli je frustula izopolární, samotná buňka uvnitř je heteropolární. Jedná se o sladkovodní epipelické druhy vyskytující se spíše ve vodách s větší vodivostí. Žijí samostatně a nevytvářejí kolonie (Round et al., 1990).

Rod *Cymatopleura* se vyskytoval v pískovně: Hrubý rybník (Hráza).



Obr. 28: *Cymatopleura solea* (Brébisson) W. Smith, lokalita: Hrubý rybník (Hráza), autor Tereza Reimerová

2.12 *Caloneis*

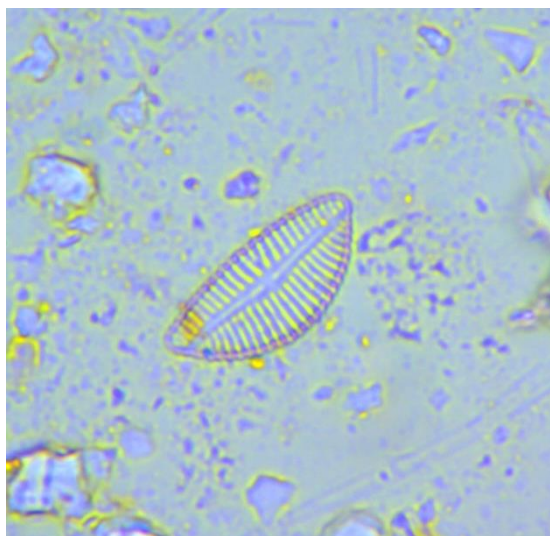
Rod *Caloneis* se nachází jak ve valvárním, tak i v pleurálním pohledu. Buňky obsahují dva podlouhlé deskovité chloroplasty. Jejich okraj může být někdy vysoce členitý. Některé druhy vytvářejí jeden chloroplast ve tvaru písmene H, který má dvě části spojené úzkým můstkem. Valvy jsou lineární, kopinaté nebo eliptické. Raphe je obvykle umístěno centrálně. Jedná se o rozšířený epipelický druh, vyskytující se hlavně ve sladkých a zřídka i ve slaných vodách. Žijí samostatně nebo mohou vzácně vytvářet kolonie ve tvaru pásu (Round et al., 1990). Tento rod je velice podobný rodu *Pinnularia*.

Rod *Caloneis* se vyskytoval v pískovně: Hrubý rybník (Hráza).

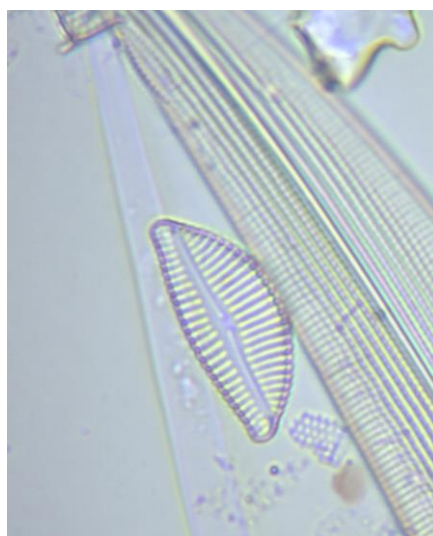


Obr. 29: *Caloneis silicula* (Ehrenberg) Cleve, lokalita: Hrubý rybník (Hráza), autor Tereza Reimerová

2.13 Příklady další nalezených druhů ve vybraných lokalitách

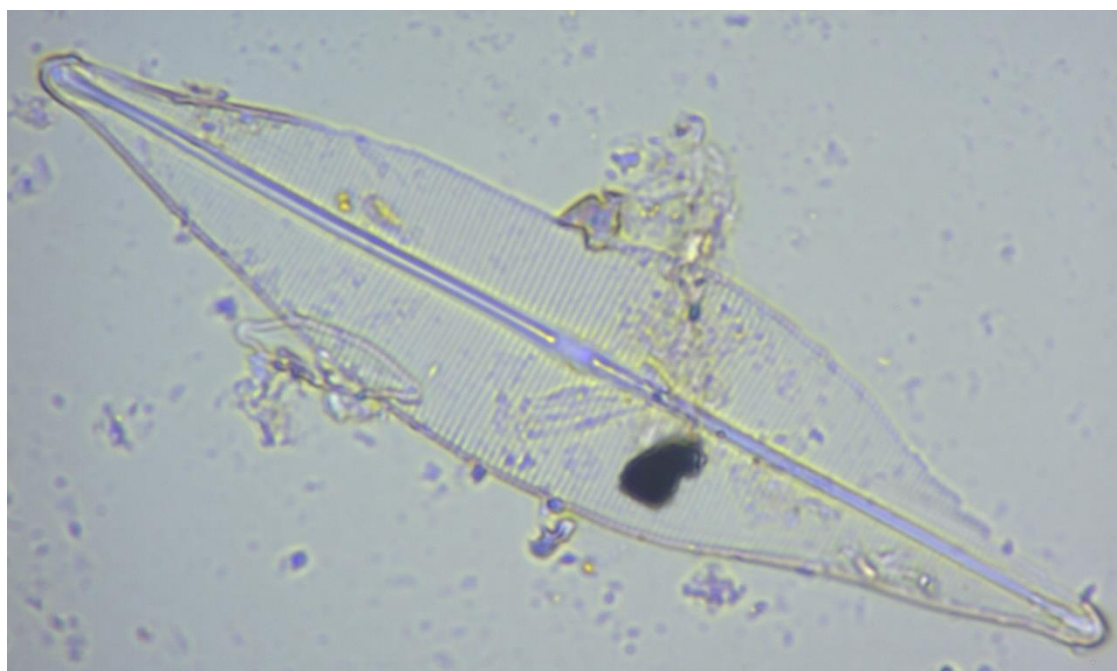


Obr. 30: *Encyonema auerswaldii*
Rabenhorst, lokalita: Hrubý rybník (Hráza),
autor Tereza Reimerová



Obr. 31: *Encyonema silesiacum*
(Bleisch) D. G Mann, lokalita:
Chomoutovské jezero, autor
Tereza Reimerová

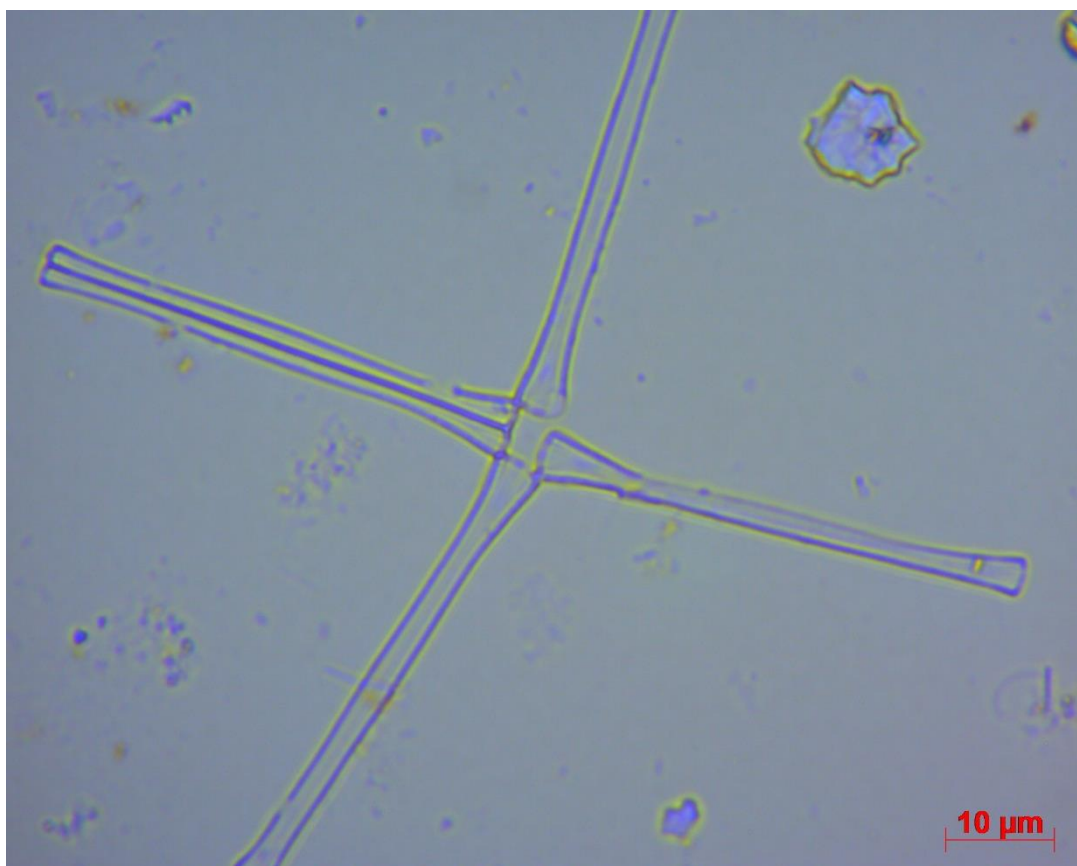
10 μm



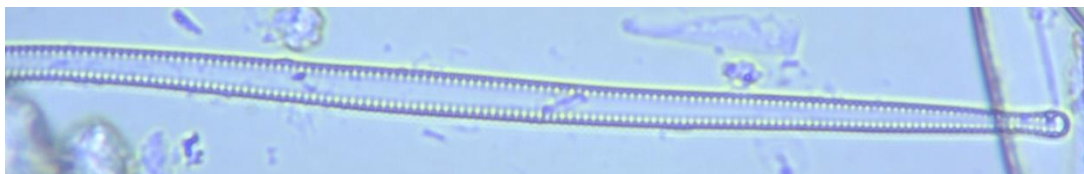
Obr. 32: *Craticula* sp. Grunow, lokalita: Krčmaň, autor Tereza Reimerová



Obr. 33: *Epithemia odonata* (Kützing) Brébisson., lokalita: Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, autor Tereza Reimerová



Obr. 34: *Asterionela formosa* Hassall, lokalita: Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, autor Tereza Reimerová



Obr. 35: *Tabularia* sp. Kützing, lokalita: Příkazská štěrkovna, autor Tereza Reimerová



Obr. 36: *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow, lokalita: Kaluhy, autor Tereza Reimerová



Obr. 37: *Rhoicopenia* sp. Grunow, lokalita: Poděbrady, autor Tereza Reimerová

10 μm



Obr. 38: *Rhopalodia gibba* (Ehrenberg) O. Müller, lokalita: Náklo, autor Tereza Reimerová

3 DNA BARCODING V BIOMONITORINGU

3.1 Biomonitoring

Všechny sladkovodní biotopy na celém světě čelí vážným hrozbám, což zvyšuje zájem o jejich ochranu. Monitorování těchto vod se neustále vyvíjí. Jedním z cílů environmentálních vědců je zhodnotit, jak se v průběhu času mění kvalita vody. Rychlé zdokonalování biomolekulárních technik způsobuje vývoj, jakým vědci popisují biologická společenstva a přinášejí tak zásadní změny v biomonitoringu. V kombinaci s vysoce výkonným sekvenováním je DNA barcoding rychlý, ekonomicky efektivní a vytváří obrovské množství dat. Toto velké množství dat vede ke zlepšení účinnosti biologického monitorování jednotlivých společenstev sladkovodních vod (Keck et al., 2017).

Biomonitoring je založen na organismech, které mají výrazné ekologické požadavky, nebo na specifických reakcích např. znečištění a velké množství živin (Pouličková et al., 2017). Většina biomonitoringových metod vyžaduje taxonomický popis „společenstva“. Biomonitoring v podstatě spočívá ve sběru vzorků, taxonomické identifikaci a použití seznamu organismů a jejich individuálních trofických nebo saprobních indexů k odhadu stavu prostředí dané lokality (trofie, saprobity). Trofie vyjadřuje stupeň zatížení živinami (N, P) a rozděluje biotopy od nejčistších na oligotrofní, mezotrofní, eutrofní, hypertrofní. Saprobity vyjadřuje stupeň zatížení organickými látkami a zde rozlišujeme stupně oligosaprobní, α - a β -mezosaprobní a polysaprobní. Nevýhody tohoto způsobu biomonitoringu souvisejí především s taxonomickou identifikací, která je založena na morfologických kritériích. Tento proces je časově velice náročný, složitý a vyžaduje značnou odbornost (Keck et al., 2017).

Morfologický přístup určování druhů má hned čtyři značné nevýhody. Prvním omezením je jak fenotypová plasticita, tak i genetická variabilita znaků používaných k rozpoznávání druhů, které mohou vést až k nesprávné identifikaci (Knowlton, 1993). Částečně je to způsobeno životním cyklem rozsivek (viz kapitola 1.3 Rozmnožování), kdy dochází ke změnám ve velikosti a tvaru rozsivek, částečně změnami pod vlivem ekologických podmínek (např. salinita). Za druhé tento přístup přehlíží morfologicky kryptické taxony, které jsou běžné v řadě skupin (Jarman & Elliott, 2000). Bylo prokázáno, že řada tradičních morfologických druhů je ve skutečnosti druhovým komplexem, v němž jednotlivé kryptické druhy nelze morfologicky rozlišit (Pouličková et al., 2017). Bohužel, druhové komplexy mohou tvořit většinu společenstva – např.

Achnantheidium minutissimum až 88% (Kollár et al., 2015). Za třetí, mnoho jedinců nelze identifikovat, protože jsou v preparátu poškozeny, leží v pleurální poloze nebo jsou překryty nečistotami. Posledním omezením je fakt, že tyto metody vyžadují vysokou úroveň odborných znalostí, morfometrické charakteristiky se často překrývají a zařazení do druhů je do jisté míry subjektivní, poplatné erudici a dostupné určovací literatuře (Hebert et al., 2003).

Kryptické druhy definujeme jako dva odlišné druhy, které jsou klasifikovány jako jeden taxon (Bickford et al., 2007), druhový komplex či seskupení. Tyto druhy jsou morfologicky velice podobné, ale jsou rozdílné na molekulární úrovni (Pouličková et al., 2017). Jsou známé již stovky let, avšak v poslední době jejich výzkum vzrostl díky sekvenování DNA. Kryptická diverzita je nejen známá u mikrořas a rozsivek, ale i u mnoha dalších skupin organismů (Bickford et al., 2007). Většinu těchto problémů by mohl vyřešit DNA barcoding.

3.2 DNA barcoding

Barcoding byl vyvinut jako soubor technik pro identifikaci více taxonů současně ze vzorku prostředí se standardními genetickými markery (Keck et al., 2017). Analýzy DNA by mohly nahradit morfologické metody k identifikaci jednotlivých druhů. Mnoho biologických výzkumů závisí na druhových diagnózách a taxonomické odbornosti. Výhodiskem pro udržení identifikačních schopností je výstavba systémů, které používají sekvence DNA jako tzv. čárové kódy (angl. barcodes) - ty jsou obsaženy v každé buňce (Hebert et al., 2003).

Molekulární data mikroorganismů jsou stále omezena. Vybavení a provoz molekulárních laboratoří je dosud poměrně drahý, ale s vývojem nových přístupů se stále zlevňuje. Dalším důvodem je problém spojený s izolací DNA, molekulární metody je třeba pro jednotlivé skupiny organismů upravovat, optimalizovat. Některé organismy mají například speciální struktury buněčných stěn (frustuly, slizové obaly), které komplikují izolaci DNA (Pouličková et al., 2017).

3.3 DNA barcoding u rozsivek

Rozsivky díky svému rozšíření hrají klíčovou roli ve všech sladkovodních ekosystémech a jsou dobrými ukazateli pro kvalitu vody (Round, 1981).

V porovnání s jinými skupinami řas (sinice, zelené řasy) je však použití molekulárních metod u rozsivek značně opožděné. Může za to velmi silná morfologická škola Prof. Horsta Lange-Bertalota, která produkuje popisy nových druhů rozsivek bez molekulárních dat. Dalším důvodem je obtížná kultivace rozsivek. Pro izolování DNA potřebujeme klonové kultury o určité biomase. Rozsivky rostou pomalu a některé velké druhy nelze kultivovat vůbec (Pouličková, ústní sdělení). Dlouhodobé udržování kultur je pak prakticky nemožné, protože bez rekonstrukce velikosti pohlavním rozmnožováním kultura nakonec zahyne (viz kapitola 1.3 Rozmnožování). V neposlední řadě jsou problémy i s izolací DNA kvůli odolným frustulám.

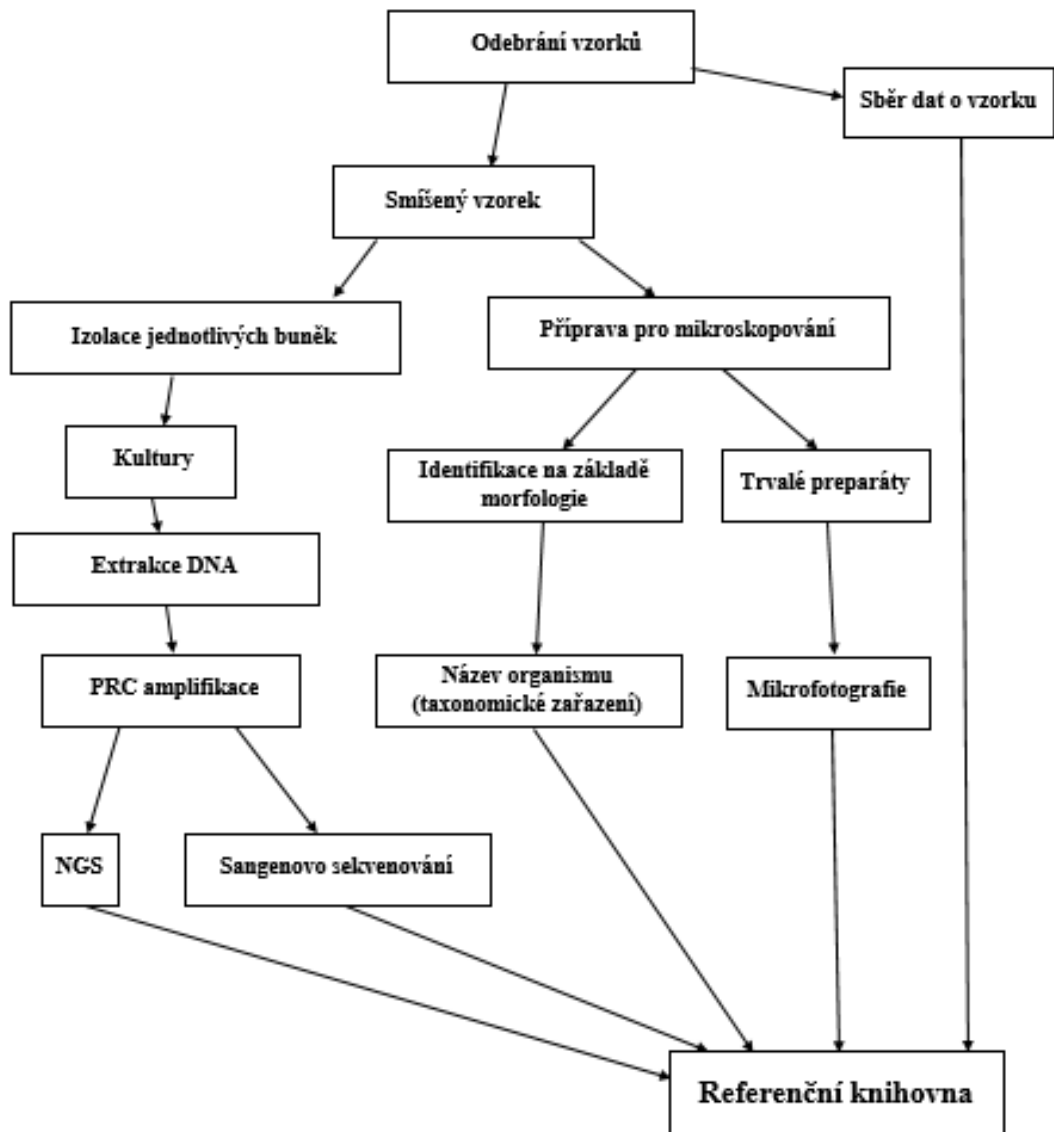
Dosud nebyl nalezen univerzální marker pro barcoding u rozsivek (Guo et al., 2015). Mezi nejčastěji používané markery patří *COI*, *SSU rDNA*, *V4 SSU rDNA*, *LSU rDNA*, *ITS rDNA* a *rbcL* (Pawlowski et al., 2016; Mann, 2010; Zimmermann et al., 2015).

3.4 Princip identifikace pomocí DNA barcodingu

K identifikaci taxonu používá DNA barcoding krátký fragment sekvence DNA = barcode marker. Barcode marker je možné lehce amplifikovat a sekvenovat jedním čtením. Je ohraničen konzervovanými oblastmi, které slouží pro nasednutí primeru (Zimmermann et al., 2011). Jako primer označujeme krátký úsek DNA kompatibilní s patřičným úsekem DNA, který zahajuje replikaci DNA. Získaná cílová sekvence je pak porovnána se sekvencemi uloženými v referenční databázi a následně se přiřadí název organismu. Klíčem úspěšné analýzy je kvalita a množství dat v referenční databázi (Zimmermann et al., 2014).

Několik kroků nutných k provedení DNA barcodingu (obr. 39, upraveno podle Keck et al., 2017):

- 1) Sběr vzorků z určitého prostředí
- 2) Extrakce DNA
- 3) Amplifikace DNA barcodu pomocí polymerázové řetězové reakce (PRC)
- 4) Sekvenování produktů amplifikace
- 5) Taxonomické přiřazení DNA pomocí referenční databáze



Obr. 39: Schematicky znázorněný postup DNA barcodingu a vytvoření referenční knihovny (upraveno podle Zimmermann et al., 2014).

PRAKTICKÁ ČÁST

4 LOKALITY

Jednotlivé vzorky rozsivek jsem postupně sbírala na 12 lokalitách. Jednalo se o oblasti pískoven či štěrkoven. Většina lokalit se nachází na střední Moravě v okolí Olomouce a tři na jižní Moravě blízko města Kroměříž. Na daných místech jsem odebrala část rostliny (list, stonek) ponořené ve vodě a následně jsem v laboratoři ze získaných vzorků rostlin rozsivky seškrábala a dále zpracovala.

4.1 Charakteristika jednotlivých lokalit

Charakteristika jednotlivých lokalit zahrnuje polohu, rozlohu, popis jejího okolí, místo sběru vzorku a název rostliny, ze které byl vzorek odebrán. Ke každé pískovně je přiřazena mapa a fotografie, které jsou přiloženy v příloze této práce.



Obr. 40: Znárodnění všech lokalit na mapě.

- 1 – Šlajza,
 - 2 – Medkovy rybníky,
 - 3 – Hrubý rybník (Hráza),
 - 4 – Krčmaň,
 - 5 – Poděbrady,
 - 6 – Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem,
 - 7 – Hlušovice,
 - 8 – Příkazská štěrkovna,
 - 9 – Náklo, 10 – Kaluhy,
 - 11 – Nemilanská pískovna,
 - 12 – Chomoutovské jezero,
- Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

4.1.1 Šlajza

GPS souřadnice: 49°18'40.122"N, 17°22'51.573"E

Tato bývalá zatopená pískovna se nachází v severozápadní části Kroměříže. Její rozloha je 5 ha. Obklopují ji urbánní biotopy (silnice, pole, zahrádky, dálnice D1) (Krátký, 2010). Vzorek jsem odebrala na severovýchodním okraji. Místo bylo zastíněno z 20 % břehovou vegetací. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: chrastice rákosovitá (*Phalaris arundinacea* L.).

4.1.2 Medkovy rybníky

GPS souřadnice: 49°17'43.768"N, 17°24'43.196"E

Tato lokalita se nachází na okraji města v průmyslové oblasti v severovýchodní části Kroměříže. Jedná se o dvě menší zatopené pískovny, které dosahují rozlohy 2,8 ha. Porosty břehů, které mají relativně přírodní charakter, tvoří zejména staré vrby a hybridní topoly. Na východním území východní pískovny se nachází úzký pás rákosin. (Krátký, 2010). Vzorek jsem odebrala na severní části západní pískovny. Místo bylo zastíněné ze 70 % rostlinnou vegetací. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: pryskyřník lýtý (*Ranunculus sceleratus* L.).

4.1.3 Hrubý rybník (Hráza)

GPS souřadnice: 49°17'37.438"N, 17°23'46.338"E

Hráza je bývalou šterkovnou v jihovýchodní části Kroměříže. Rozprostírá se na území 12 ha. V minulosti proběhly na březích revitalizační práce, které obohatily okolí této pískovny o nové biotopy (listnaté porosty, menší tůňky, litorální zóny). (Krátký, 2010). Vzorek jsem odebrala na severozápadním břehu, kde bylo 90% zastínění. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: kamyšník přímořský (*Bolboschoenus maritimus* L.).

4.1.4 Krčmaň

GPS souřadnice: 49°30'50.886"N, 17°19'20.454"E

Jde o pískovnu, která se nachází 1,5 km západně od obce Krčmaň. Pískovna je stále zčásti využívána na těžení. Její rozloha je 16,5 ha. Kolem ní se nacházejí další dvě pískovny, západní, která je už delší dobu netěžena, a nově vzniklá jižní pískovna, na které se stále těží. Vzorek jsem odebrala na východním břehu největší pískovny na místě s 10%

zastíněním okolního porostu. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: stolístek klasnatý (*Myriophyllum spicatum* L.).

4.1.5 Poděbrady

GPS souřadnice: 49°37'36.608"N, 17°13'31.016"E

Bývalá zatopená štěrkovna, která se nachází mezi Olomoucí a Horkou nad Moravou. Její rozloha dosahuje 28 ha. Zhruba uprostřed pískovny se nachází malý ostrov, kde najdeme významnější porosty. Břehy jsou porostlé úzkou dřevinnou vegetací, zčásti přirozené skladby (*Salix*, *Alnus*, *Fraxinus*) a zčásti s nepůvodními druhy (hybridní *Populus*, *Robinia pseudoacacia* L., *Acer negundo* L., ad.). V menších zátokách se mnohdy vyskytují vodní rostliny (např. *Hydrocharis morsus-ranae* L., *Nuphar lutea* L., *Sparganium erectum* L.). (Krátký, 2010). Vzorky byly odebrány na severovýchodním břehu pískovny, kde je asi 60% zastínění břehovou vegetací. Rostliny, z nichž byly vzorky odebrány: stolístek klasnatý (*Myriophyllum spicatum* L.), zevar vzpřímený (*Sparganium erectum* L.). Na této lokalitě jsem také použila metodu sběru pomocí exponování umělého substrátu - plexiskla, na kterém byly nalepeny krycí sklíčka (více popsáno v kapitole 5 Metodika). Umělý substrát byl umístěn na severovýchodním břehu poblíž porostu orobince širokolistého (*Typha latifolia* L.).

4.1.6 Pískovny mezi Olomoucí a Chomutovem

GPS souřadnice: 49°37'26.553"N, 17°15'2.283"E

Jedná se o drobné zatopené pískovny, které spadají pod obec Černovír. Rozloha dosahuje přibližně velikosti 7,5 ha. Břehy pískoven jsou porostlé zelení, která je obklopena zemědělsky využívanými prostory, jako jsou pole a zahrady (Krátký, 2010). Vzorek jsem odebrala na jihozápadním břehu největší pískovny na skoro 100 % zastíněném místě. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: rukev obojživelná (*Rorippa amphibia* L.).

4.1.7 Hlušovice

GPS souřadnice: 49°38'11.791"N, 17°16'0.515"E

Tato zatopená bývalá pískovna se nachází západně od obce Hlušovice v okrese Olomouc. Rozloha této pískovny činí 3,1 ha. Na jižní a východní straně je zčásti osluněná, ze severní a západní strany je obklopena listnatými lesíky. Tato lokalita je významná

především výskytem vodní rostliny prustky obecné (*Hippuris vulgaris* L.) (Krátký, 2010). Vzorek jsem odebrala ze severní části, která byla z 50 % zastíněná. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: žabník trávolistý (*Alisma gramineum* Lej.).

4.1.8 Příkazská štěrkovna

GPS souřadnice: 49°39'35.446"N, 17°9'54.888"E

V tomto případě jde o bývalou zatopenou štěrkovnu mezi obcemi Příkazy a Hynkov, v okrese Olomouc. Tato štěrkovna má rozlohu 4,1 ha. Na západním a jihozápadním břehu se nachází zachovalý zbytek lužního lesa (Krátký, 2010). Vzorek jsem vzala na severovýchodním břehu, asi z 50 % zastíněného místa. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: vrbina penízková (*Lysimachia nummularia* L.). Na této lokalitě jsem použila i metodu s plexisklem, na kterém byly nalepeny krycí sklička (více popsáno v kapitole 5.1 Terénní práce). Umělý substrát byl umístěn na jihovýchodním břehu, kde byla téměř 100% zastíněnost.

4.1.9 Náklo

GPS souřadnice: 49°40'19.087"N, 17°7'58.714"E

Náklo je stále těžená zatopená štěrkovna mezi obcemi Lhota nad Moravou, Březové a Náklo, v okrese Olomouc. Rozloha této štěrkovny je 101 ha. Tato štěrkovna je hojně využívána v létě k rekreaci. Mezi významný druh rostliny, který zde roste, se řadí přeslička různobarvá (*Equisetum variegatum* Schleich.) (Krátký, 2010). Vzorek jsem odebrala na východním břehu pískovny na téměř nezastíněném místě. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: stolítek klasnatý (*Myriophyllum spicatum* L.).

4.1.10 Kaluhy

GPS souřadnice: 49°31'39.119"N, 17°15'42.534"E

Bývalá pískovna Kaluhy se nachází jihovýchodně od Tážal. Její rozloha je 0,4 ha. Okolí kolem pískovny je tvořeno obdělávanými poli. Vzorek jsem odebrala na východním břehu a toto místo bylo z 20 % zastíněno břehovou vegetací. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: jmelí bílé (*Viscum album* L.).

4.1.11 Nemilanská pískovna

GPS souřadnice: 49°32'34.881"N, 17°15'32.866"E

Bývalá zatopená pískovna se nachází u řeky Moravy mezi obcemi Nemilany a Kožušany-Tážaly v okrese Olomouc. Zaujímá rozlohu 1,6 ha (Krátký, 2010). Vzorek byl odebrán na severním břehu. Místo bylo z 30 % zastíněno březní vegetací. Rostlina, z níž byl vzorek odebrán: ostřice zobánkatá (*Carex rostrata* Stokes).

4.1.12 Chomoutovské jezero

GPS souřadnice: 49°39'12.987"N, 17°14'17.91"E

Jedná se o zatopenou bývalou štěrkovnu, která se nachází severně od obce Chomoutov v okrese Olomouc. Rozloha činí 88 ha. Vzorky jsem odebrala na severozápadním břehu v blízkosti porostu orobince širokolistého (*Typha latifolia* L.). Rostliny, z nichž byly vzorky odebrány: orobinec širokolistý (*Typha latifolia* L.), růžkatec ponořený (*Ceratophyllum demersum* L.), stolítek klasnatý (*Myriophyllum spicatum* L.).

5 METODIKA

5.1 Terénní práce

Terénní práce zahrnovaly sběr vzorků z výše uvedených zatopených pískoven: Šlajza, Medkovy rybníky, Hráza, Krčmaň, Poděbrady, Pískovny mezi Olomoucí a Chomoutovem, Hlušovice, Příkazská šterkovna, Náklo, Kaluhy, Nemilanská pískovna, Chomoutovské jezero. Většina sběrů byla provedena jednorázově. Více sběrů bylo provedeno na Poděbradech a na Příkazské šterkovně. Vzorky jsem odebírala v období od června do října 2018. Jednotlivé vzorky z lokalit byly odebrány dvěma různými způsoby a poté zpracovány v laboratoři.

Prvním způsobem byl sběr vzorků z části rostliny, která byla ponořena ve vodě. U břehu jsem si našla rostlinu, která byla buď úplně, nebo z větší části ponořena. Pomocí nůžek jsem odstrihla určitou část dané rostliny (list, stonek). Odstřiženou část jsem vložila do mikrotenového sáčku, který byl popsán číslem přiřazeným konkrétní lokalitě. Takto nasbírané vzorky byly uchovány v chladu a poté zpracovány v laboratoři.

Druhým způsobem byl sběr vzorků z exponovaných umělých substrátů. Nosičem pro umělé substráty bylo plexisklo, na kterém byla izolepou nalepena krycí sklíčka. Plexisklo mělo rozměr 10 x 13 cm. Krycí sklíčka měla rozměr 2,2 x 2,2 cm. Sklíčka byla nalepena po obvodu izolepou na plexisklo ve dvou řadách po třech (Poděbrady) a ve dvou řadách po dvou (Příkazská šterkovna). Plexisklo jsem nahoře pomocí povoskovaného provázku přichytila na prázdnou PET lahev sloužící jako plovák a dole jsem na provázek jako kotvu připevnila sáček, ve kterém byly kameny (fotografie v příloze č. 13). Zařízení bylo umístěno tak, aby krycí sklíčka visela cca 20 cm pod hladinou. Po čtrnácti dnech jsem plexisklo vyjmula z vody a opatrně jsem odlepila krycí sklíčka. Tyto sklíčka jsem pak vložila do předem připravené nádoby, kde byla voda z dané lokality. Opět jsem tyto vzorky uchovala v chladu a na druhý den zpracovala v laboratoři.

5.2 Laboratorní práce

V laboratoři byla část vzorku použita na přípravu trvalého preparátu, část vzorku sloužila k izolaci klonových kultur pro navazující diplomovou práci. Vzorky a trvalé preparáty byly prohlíženy pod světelným mikroskopem Primostar ZEISS (Německo), objektivy zvětšujícími 40x a 100x (s olejovou imerzí). Mikrofotografie byly pořízeny kamerou ZEISS AxioCam ERc 5s se softwarem ZEISS AxioVision software 4.9.1.

5.2.1 Trvalé preparáty

Pro určování rozsivek do druhů je třeba vzorek zbavit organických látek a z čistých křemičitých frustul se připraví trvalé preparáty zalitím do pryskyřice. Nejdříve jsem z jednotlivé části rostliny seškrábala nános, který jsem umístila do kapky vody na podložní sklíčko. Každé sklíčko jsem popsala číslem dané lokality a následně jsem na něj nalepila štítek, kde bylo napsáno datum, název lokality a název rostliny, ze které byl vzorek odebrán.

Po zaschnutí kapky vody jsem sklíčko umístila na hliníkovou destičku, která byla umístěna na rozeřtém plotýnkovém vařiči, a na místo se vzorkem jsem kápala dvě kapky 30% peroxidu vodíku. Peroxid vodíku se na teple odpařuje a zbavuje vzorek organických součástí. Postup jsem opakovala třikrát – až do vybělení vzorku na sklíčku.

Po odstranění organického materiálu následovalo dokončení trvalého preparátu pomocí pryskyřice. Na krycí sklíčko jsem dala kapku pryskyřice Naphrax a umístila na podložní sklíčko se vzorkem. Celý komplet jsem opět položila na rozeřtávanou destičku. Jakmile pryskyřice přestala pod krycím sklíčkem bublat, odebrala jsem preparát a nechala ho vychladnout. Trvalé preparáty budou dále použity pro identifikaci rozsivek pomocí morfologických znaků.

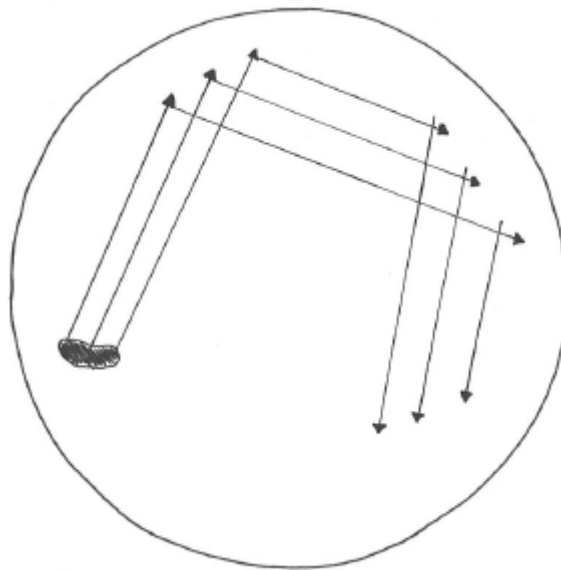
Pozn.: U vzorků z umělých substrátů, které byly na krycím sklíčku vytaženy přímo z lokality, jsem postupovala stejně, pouze s tím rozdílem, že materiál byl na krycím sklíčku a pryskyřice na podložním sklíčku.

5.2.2 Zpracování nativních vzorků

Před izolací klonových kultur bylo třeba připravit 1l kultivačního média pro rozsivky označovaného „WC“ dle návodu v literatuře (Pouličková, 2011). Před sterilizací v autoklávu jsem do dvou půllitrových lahví s modrým uzávěrem (určených do autoklávu) nalila 400 ml WC media a odvážíla agar na výslednou koncentraci 2 %. Po sterilizaci jsem horký viskózní roztok ve flowboxu rozlévala do jednorázových Petriho misek o průměru 10 cm do výšky cca 0,5 cm. Ze 400 ml roztoku lze připravit 19 agarových ploten. Po vychladnutí je možné agarové plotny použít, nebo uchovat zabalené v alobalu v chladničce na pozdější použití.

Všechny práce s nativními vzorky byly prováděny ve sterilním prostření ve flowboxu. Z každé rostliny jsem sterilní očkovací kličkou seškrábala nános a lehce otiskla na agarovou plotnu. Potom jsem provedla bakteriologický roztěr (obr. 41) materiálu po

agarové plotně. Po 5 týdnech jsem pod stereomikroskopem na Petriho miskách pozorovala narostlé kolonie řas. Za použití skleněné Pasteurovy pipety vytažené do kapiláry jsem vybrané kolonie rozsivek izolovala do serologických destiček (25 kultivačních míst) s tekutým WC médiem. Pipetu jsem mezi izolacemi sterilizovala ve vroucí destilované vodě umístěné v kádince na varné desce. Po dvou týdnech je možno kultury zkontrolovat pod inverzním mikroskopem a po několika týdnech, až rozsivky zaplní dno kultivační nádoby, se přeočkují do Petriho misek o průměru 5 cm. V tekutém WC médiu se ponechají růst až do získání dostatečné biomasy pro izolaci DNA.



Obr. 41: Bakteriologický roztěr

6 DIDAKTICKÁ ČÁST

V didaktické části jsem vytvořila praktické cvičení na téma: „Rozsivky v přírodě a pod drobnohledem“. Studenti mají za úkol nasbírat vzorky z lokalit (pískoven), vytvořit preparát, pozorovat jednotlivé rozsivky pod mikroskopem a určit jejich tvar, rod a počet chloroplastů. Rozsivky, co studenti uvidí v mikroskopu, zakreslí měkkou tužkou do nákresu. Na závěr zhodnotí, kolik rodů rozsivek pozorovali.

6.1 Praktické cvičení určené pro studenty SŠ

PRAKTICKÉ CVIČENÍ

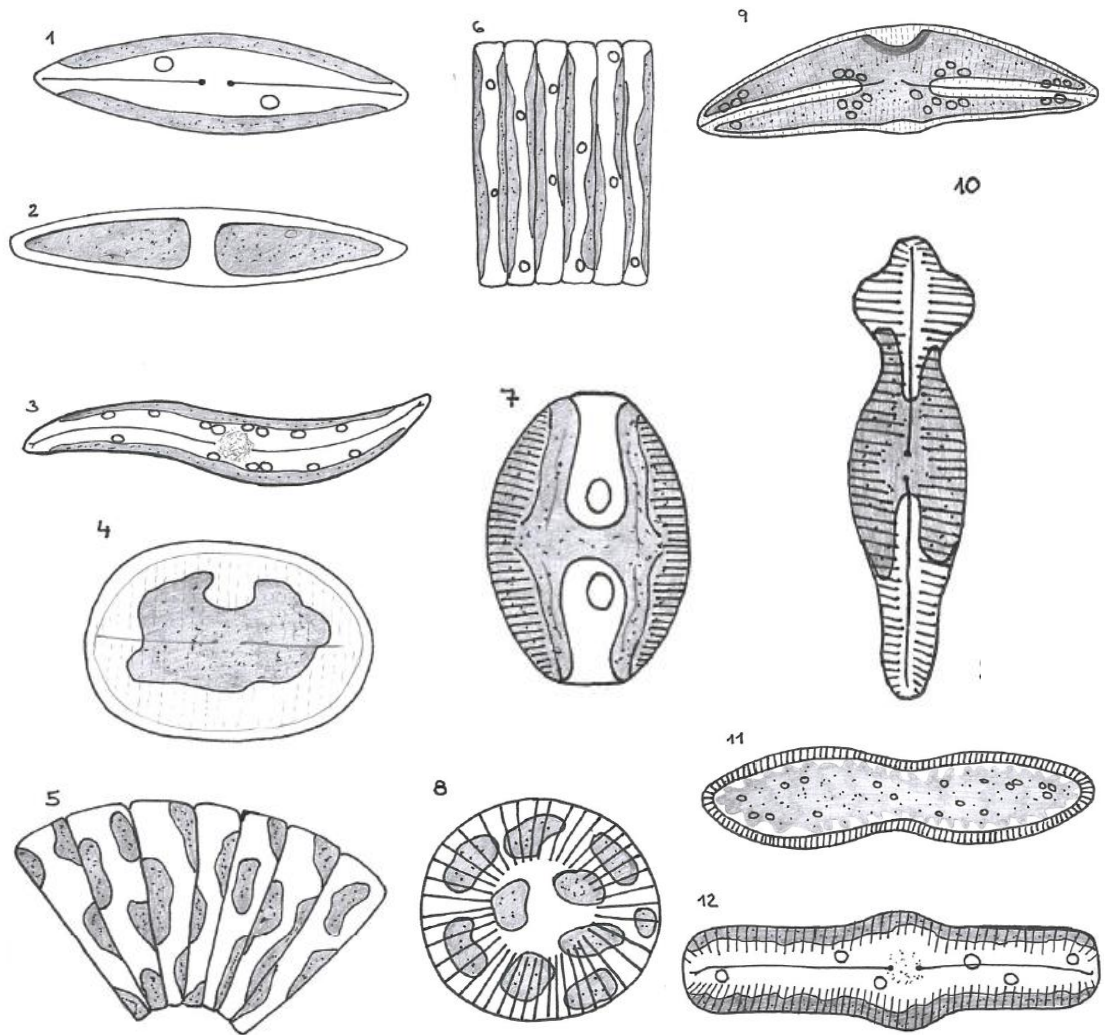
Téma: „Rozsivky v přírodě a pod drobnohledem“

Úkol č. 1: Sběr a pozorování tvaru rozsivek

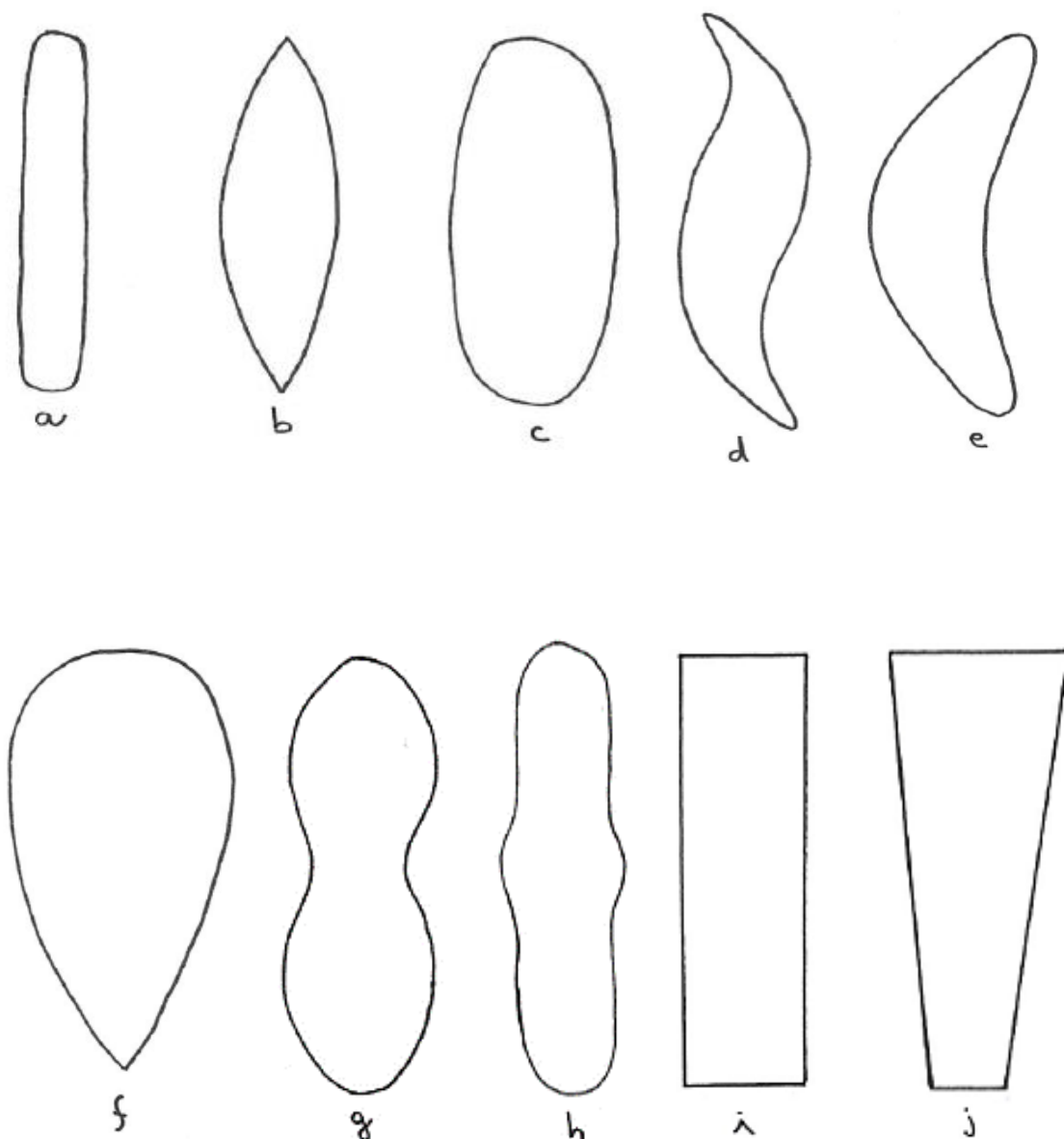
Pomůcky: pipeta, nůžky, preparační jehla/skalpel, mikrotenový sáček, nádobka na vzorky, mikroskop zvětšující minimálně 400x, papírový kapesník, podložní a krycí sklíčko

Teoretická část:

1. Základní charakteristiky rozsivek (viz. Teoretická část bakalářské práce, str. 10)
2. Obrázky nejběžnějších rodů rozsivek v zatopených pískovnách (základní tvary schránek, vyobrazení vybraných rodů, počet a tvar chloroplastů, obr. 42, 43)



Obr. 42: Počet, tvar a uložení chloroplastů u vybraných rodů rozsivek (zjednodušeno):
 1 – *Navicula* (dva podélně uložené chloroplasty), 2 – *Nitzschia* (dva chloroplasty umístěné bipolárně), 3 – *Gyrosigma* (dva podélně uložené chloroplasty), 4 – *Cocconeis* (jeden chloroplast tvaru písmene C), 5 – *Meridion* (mnoho diskovitých chloroplastů), 6 – *Fragilaria* (dva centrální chloroplasty přitisklé k valvám), 7 – *Amphora* (jeden chloroplast ve tvaru písmene H), 8 – *Cyclotella* (mnoho diskovitých chloroplastů), 9 – *Cymbella* (jeden chloroplast ve tvaru písmene H), 10 – *Gomphonema* (jeden chloroplast ve tvaru písmene H), 11 – *Cymatopleura* (jeden chloroplast s 2 laloky umístěnými proti každé z valv), 12 – *Caloneis* (dva podélně uložené chloroplasty) (upraveno podle Fott, 1956)



Obr. 43: Tvary schránek. Valvární pohled: a - lineární, b - kopinatý, c - eliptický, d - esovitý, e - obloukovitý, f - vejčitý, g - tvar "buráku", h - lineární s konkávním středem, pleurální pohled: i - obdélníkovitý, j - klínovitý (upraveno podle Barber & Haworth, 1981; Cox, 1996)

Postup:

Na předem zvolenou zatopenou pískovnu si vezmeme pomůcky k odebrání vzorků. Na bezpečném místě u břehu si najdeme ponořenou rostlinu, ustříhneme list nebo část stonku a vložíme do sáčku (epifyton). Druhou možností, jak odebrat vzorek, je nasátím pomocí pipety. Vodu společně s nánosem na listech nebo dně (pod vodou; epipelon) nasajeme pipetou a přeneseme do připravené nádoby. Rovněž je možno vyjmout z vody kámen a do lahvičky oškrábat starým zubním kartáčkem (epilithon).

V laboratoři si na podložní sklíčko nanese kapku vody, seškrábneme pomocí jehly nános z rostliny, přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme. Případně pipetou kápneme hustý vzorek epipelonu či epilithonu ze dna lahvičky. Jednotlivé přítomné rozsivky zakreslíme a určíme tvar schránek, případně počet chloroplastů podle návodu v teoretické části. Objekty kreslíme velké alespoň 6 cm měkkou tužkou na nelinkovaný papír. Snažíme se vykreslit co nejvíce detailů. U živých rozsivek je vidět zejména hnědý chloroplast, u prázdných schránek velkých rozsivek můžeme pozorovat raphe i žebírka. Pozorované objekty se pokusíme přiřadit k nejběžnějším rodům vyobrazeným v teoretické části. Do závěru napíšeme zástupce rozsivek, které jsme pozorovali v mikroskopu.

Šikovní studenti s velmi dobrým mikroskopem se mohou pokusit určit rozsivku podle Atlasu sinic a řas ČR dostupné na <http://www.sinicearasy.cz/matlas>.

Nákres:**Závěr:****Úkol č. 2:** Opakování na téma rozsivky**Postup:** Dopln chybějící slova

Rosivky jsou mikroskopické jednobuněčné eukaryotické řasy. Mohou žít samostatně anebo vytvářet _____. Samotnou buňku rozsivek chrání křemitá schránka, která se nazývá _____. Tato schránka je složena ze _____ částí. Zásobní látkou rozsivek je _____. Některé rozsivky se pohybují pomocí struktury, která se jmenuje _____. Rosivky se primárně rozmnožují _____ a následuje _____ rozmnožování.

6.2 Praktické cvičení – verze pro učitele SŠ

Úkol č. 2: Opakování na téma rozsivky

Postup: Doplň chybějící slova

Rosivky jsou mikroskopické jednobuněčné eukaryotické řasy. Mohou žít samostatně anebo vytvářet *kolonie*. Samotnou buňku rozsivek chrání křemitá schránka, která se nazývá *frustula*. Tato schránka je složena ze *dvou* částí. Hlavní zásobní látkou rozsivek je *chrysolaminaran*. Některé rozsivky se pohybují pomocí struktury, která se jmenuje *raphe*. Rosivky se primárně rozmnožují *nepohlavně/dělením* a následuje *pohlavní* rozmnožování.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se v rámci literární rešerše k tématu zaměřila na detailní charakteristiku rozsivek a stručné vysvětlení principu využití DNA barcodingu rozsivek v biomonitoringu. Charakteristika rozsivek zahrnuje taxonomické zařazení, systém, stavbu buňky, rozmnožování a jejich ekologii.

V rámci bakalářské práce jsem dále odebrala 25 vzorků z 12 lokalit v okolí Olomouc a Kroměříže. U všech lokalit se jedná o zatopené pískovny či štěrkovny, jejichž charakteristiky, poloha a fotografická dokumentace je v kapitole Lokality. Metody sběru a zpracování vzorků jsou dále uvedeny v kapitole Metody. Při sběru rozsivek jsem využila dvě metody. První metodou byl sběr vzorků odebráním části ponořené rostliny (epifyton) a následné seškrábnutí nánosu na dané části. Druhou metodou byl sběr vzorku z exponovaných umělých substrátů. Celkem jsem připravila 25 trvalých preparátů a z 8 lokalit jsem izolovala 50 kultur rozsivek.

Vytvořené trvalé preparáty využiji v diplomové práci na určení rozsivek z jednotlivých pískoven na základě morfologie. Vyizolované kultury později použiji v navazující diplomové práci pro izolaci DNA a sekvenování.

Ze vzorků jsem vybrala 12 nejčastějších rodů rozsivek a blíže jsem je charakterizovala a dokumentovala vlastními mikrofotografiemi z vybraných lokalit. Tyto rody jsem dále použila do didaktické části.

V didaktické části jsem navrhla pracovní list k praktickému cvičení pro studenty středních škol na téma: „Rozsivky v přírodě a pod drobnohledem“. Praktické cvičení je založeno na sběru vzorků v přírodě, pozorování rozsivek v mikroskopu a zařazení rozsivek podle tvaru frustuly do rodu, případně určení počtu chloroplastů.

REFERENČNÍ SEZNAM

- Adl, S. M., Bass, D., Berney, C., Cárdenas, P., Čepička, I., Dunthorn, M., ... Zlatogursky, V. V. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Barber, H. ., & Haworth, E. . (1981). A guide to the morphology of the diatom frustule. Freshwater Biological Association. *Scientific Publication*, 44.
- Benoiston, A.-S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., & Bowler, C. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372, 1–10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0397>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., ... Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bowler, C., Vardi, A., & Allen, A. E. (2009). Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Annual Review of Marine Science*, 2, 333–365. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081051>
- Chepurnov, V. A., & Mann, D. G. (2004). Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms. *Phycological Research*, 52, 1–12.

- Cox, E. J. (1996). *Identification of freshwater diatom from live material*. London: Chapman and Hall. <https://doi.org/10.1017/S0025315400041023>
- Cox, E. J. (2011). Morphology, cell wall, cytology, ultrastructure and morphogenetic studies. *Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, 19, 21–45. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7>
- Drebes, G. (1977). Cell structure, cell division, and sexual reproduction of *Attheya decora* West (Bacillariophyceae, Biddulphiineae). *Nova Hedwigia Beihefte*, 54, 167–178.
- Fott, B. (1956). *Sinice a řasy*. Praha: Československá akademie věd.
- Geitler, L. (1932). *Der Formwechsel der pennaten Diatomeen*. Jena: Fischer.
- Geitler, L. (1952). Untersuchungen über Kopulation und Auxosporenbildung pennater Diatomeen. III. Gleichartigkeit der Gonenkerne und Verhalten des Heterochromatins bei *Navicula radiosa*. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 99, 469–482.
- Gordon, R., & Tiffany, M. A. (2011). Possible buckling phenomena in diatom morphogenesis. *Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, 19, 245–271. https://doi.org/DOI 10.1007/978-94-007-1327-7_11
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, 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. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000076>

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. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Hendey, N. I. (1964). *An introductory account of the smaller algae of british coastal waters. Part V: Bacillariophyceae, diatoms*. London.

Heteša, J., Marvan, P., Skácelová, O., & Kopp, R. (2012). *Řasy a sinice mokřadů dolního Podvyjí*. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, s.r.o.

Hildebrant, M. (2011). The diatom world. In J. Seckbach & P. Kociolek, J (Eds.), *The Diatom World* (p. vii). San Diego.

Hindák, F., Cyrus, Z., Marvan, P., Javornický, P., Komárek, J., Ettl, H., ... Lhotský, O. (1978). *Sladkovodné riasy*. Bratislava: Pedagogické nakladateľstvo.

Hindák, F., & Hindáková, A. (2002). Cyanobaktérie a riasy štrkoviskových jazier v Rusovciach a Čunove v Bratislave. *Bulletín Slovenskej Botanickej Spoločnosti*, 24, 7–13.

- Hindák, F., & Hindáková, A. (2003). Cyanobaktérie a riasy štrkoviskových jazier Veľký Draždiak a Malý Draždiak v Petržalke (Bratislava, západné Slovensko). *Bulletín Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, 25, 7–15.
- Hindák, F., & Hindáková, A. (2005). Diverzita cyanobaktérií a rias štrkoviskového jazera Štrkovec v Bratislave v r. 1999 – 2004. *Bulletín Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, 27, 23–29.
- Hindáková, A. (1996). Rozsievková flóra štyroch štrkoviskových jazier v Bratislave. *Bulletín Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, 18, 23–27.
- Hindáková, A., & Hindák, F. (2014). Mikroflóra siníc a rias pieskoviskových jazier Mláky pri Sekuliach na Záhorí (západné Slovensko). *Bulletín Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, 36(2), 135–143.
- Hoek van den, C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An introduction to phycology*. New York: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Hofmann, G., Lange-Bertalot, H., & Werum, M. (2013). *Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa: Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis: über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie*. (H. Lange-Bertalot, Ed.). Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Jarman, S. N., & Elliott, N. G. (2000). DNA evidence for morphological and cryptic cenozoic speciations in the Anaspididae, “living fossils” from the triassic. *Journal*

of Evolutionary Biology, 13, 624–633. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00207.x>

John, J. (1993). The use of diatoms in monitoring the development of created wetlands at a sandmining site in Western Australia. *Hydrobiologia*, 269, 427–436. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-3622-0>

Kalina, T., & Váňa, J. (2010). *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum.

Kapusta, M., & Kováčik, Ľ. (2000). Epilitická fykoflóra vybraných antropogenných objektov mesta Bratislavy. *Bulletín Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, 22, 15–22.

Kaštovský, J., Hauer, T., Geriš, R., Chattová, B., Juráň, J., Lepšová-Skácelová, O., ... Mühlsteinová, R. (2018). *Ekologie sinic a řas*. České Budějovice: powerprint, Praha.

Keck, F., Vasselon, V., Tapolczai, K., Rimet, F., & Bouchez, A. (2017). Freshwater biomonitoring in the Information Age. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(5), 266–274. <https://doi.org/10.1002/fee.1490>

Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 189–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.001201>

Kollár, J., Fránková, M., Hašler, P., Letáková, M., & Poulíčková, A. (2015). Epiphytic diatoms in lotic and lentic waters - Diversity and representation of species

complexes. *Fottea*, 15(2), 259–271. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.022>

Krátký, M. (2010). *Sagittaria*. Retrieved from http://www.sagittaria.cz/cs/piskovny_a_sterkovny-stredni-moravy

Locker, F. (1950). Beiträge zur Kenntnis des Formwechsels der Diatomeen an Hand von Kulturversuchen. *Österreichische botanische Zeitschrift*, 97, 322-332.

Macdonald, J. D. (1869). On the structure of the Diatomaceous frustule, and its genetic cycle. *Annals and Magazine of Natural History*, 3(3), 1–8.

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. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2010.405>

Mann, D. G. (2011). Size and sex. *Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, 19, 145–166. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_6

McIntire, C. D., & Moore W. Wendy. (1977). Marine littoral diatoms: ecological considerations. In D. Werner (Ed.), *Biology of diatoms* (pp. 331–371). Oxford: Blackwell.

Mizuno, M., & Okuda, K. (1985). Seasonal change in the distribution of cell size of *Cocconeis scutellum* var. *ornata* (Bacillariophyceae) in relation to growth and sexual reproduction. *Journal of Phycology*, 21, 547–553.

Navrátil, M., & Pouličková, A. (2001). Fytoplankton štěrkořiště Chomoutov u Olomouce. *Czech Phycology*, 1, 53–61.

Oltmanns, F. (1922). *Morphologie und Biologie der Algen* (Vol. 1–3). Jena: Fischer, G.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>

Pfitzner, E. (1869). Ueber den Bau und die Zellteilung der Diatomeen. *Botanische Zeitung*, 27, 774–776.

Pouličková, A. (2011). *Základy ekologie sinic a řas*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.

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*, 599–600, 820–833. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.034>

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, 353–369. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.12.003>

- Roessler, P. G. (1987). UDPglucose pyrophosphorylase activity in the diatom *Cyclotella cryptica*. Pathway of chrysolaminarin biosynthesis. *Journal of Phycology*, 23(3), 8–494.
- Round, F. E. (1981). *The Ecology of Algae*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *The Diatoms, biology and morphology of the genera*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Seibold, E., & Berger, W. H. (1982). *The sea floor*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sims, P. A., Mann, D. G., & Medlin, L. K. (2006). Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia*, 45(4), 361–402.
- Theriot, E. C., Ashworth, M., Ruck, E., Nakov, T., & Jansen, R. K. (2010). A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution*, 143(3), 278–296.
<https://doi.org/10.5091/plecevo.2010.418>
- Valešová, E. (2015). *Biodiverzita sinic a řas zatopených lomů v okolí Stoda*. Západočeská Univerzita v Plzni.
- Zerov, D. K. (1977). *Nástin fylogeneze stélkatách rostlin*. Praha: Academia.

Zimmermann, J., Abarca, N., Enk, N., Skibbe, O., Kusber, W. H., & Jahn, R. (2014).

Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: A best practice example from diatom research. *PLoS ONE*, 9(9), 1–24.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108793>

Zimmermann, J., Glöckner, 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.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>

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 and Evolution, 11, 173–192. [https://doi.org/10.1007/s13127-](https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6)

011-0050-6

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Mapa a fotografie lokality – Šlajza

Příloha 2: Mapa a fotografie lokality – Medkovy rybníky

Příloha 3: Mapa a fotografie lokality – Hrubý rybník (Hráza)

Příloha 4: Mapa a fotografie lokality – Krčmaň

Příloha 5: Mapa a fotografie lokality – Poděbrady

Příloha 6: Mapa a fotografie lokality – Pískovna mezi Olomoucí a Chomoutovem

Příloha 7: Mapa a fotografie lokality – Hlušovice

Příloha 8: Mapa a fotografie lokality – Příkazská štěrkovna

Příloha 9: Mapa a fotografie lokality – Náklo

Příloha 10: Mapa a fotografie lokality – Kaluhy

Příloha 11: Mapa a fotografie lokality – Nemilanská pískovna

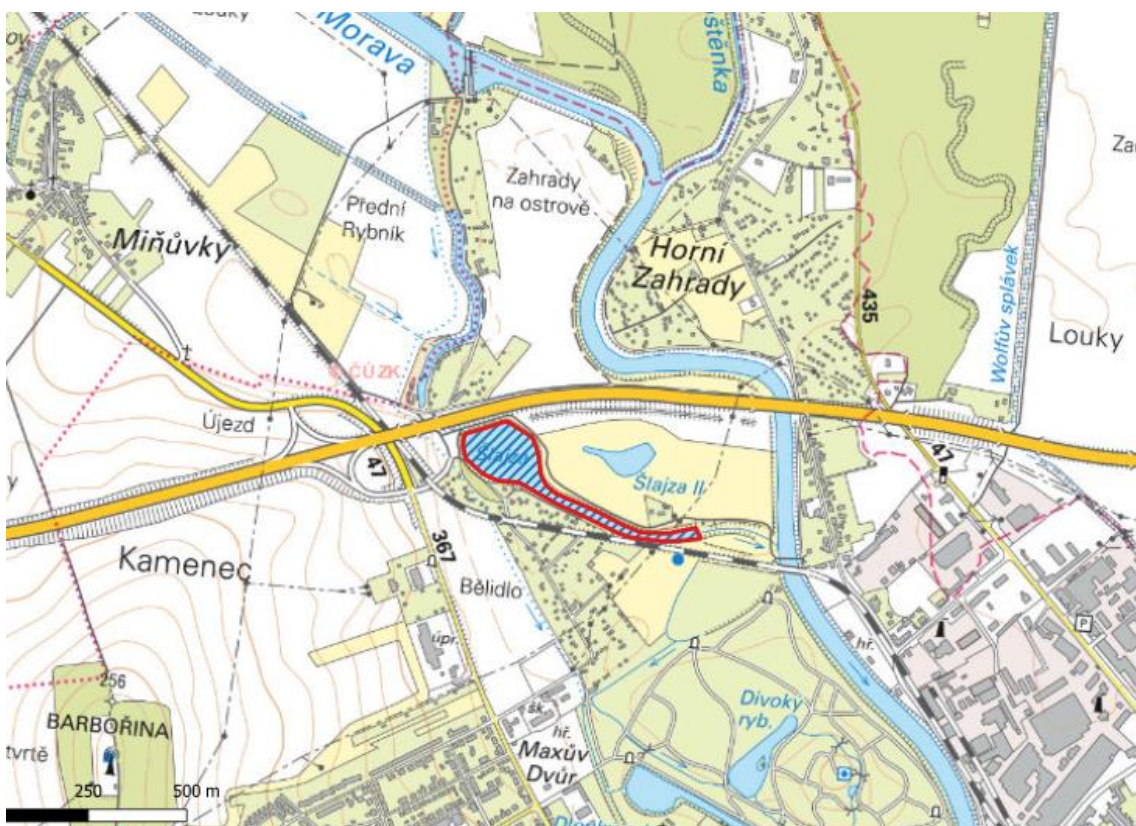
Příloha 12: Mapa a fotografie lokality – Chomoutovské jezero

Příloha 13: Fotografie metody odběru vzorků pomocí plexiskla

Příloha 1: Mapa a fotografie lokality – Šlajza



Foto z 23. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

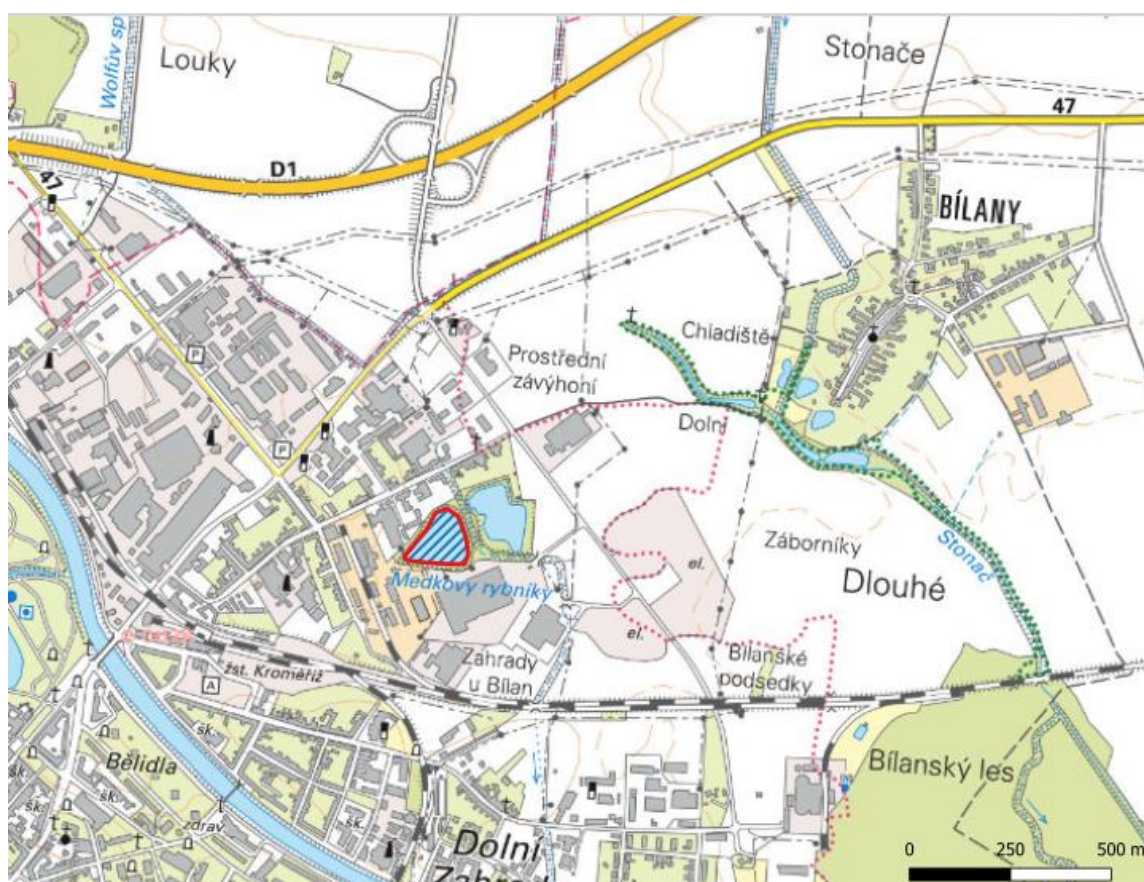


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 2: Mapa a fotografie lokality – Medkovy rybníky



Foto z 23. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

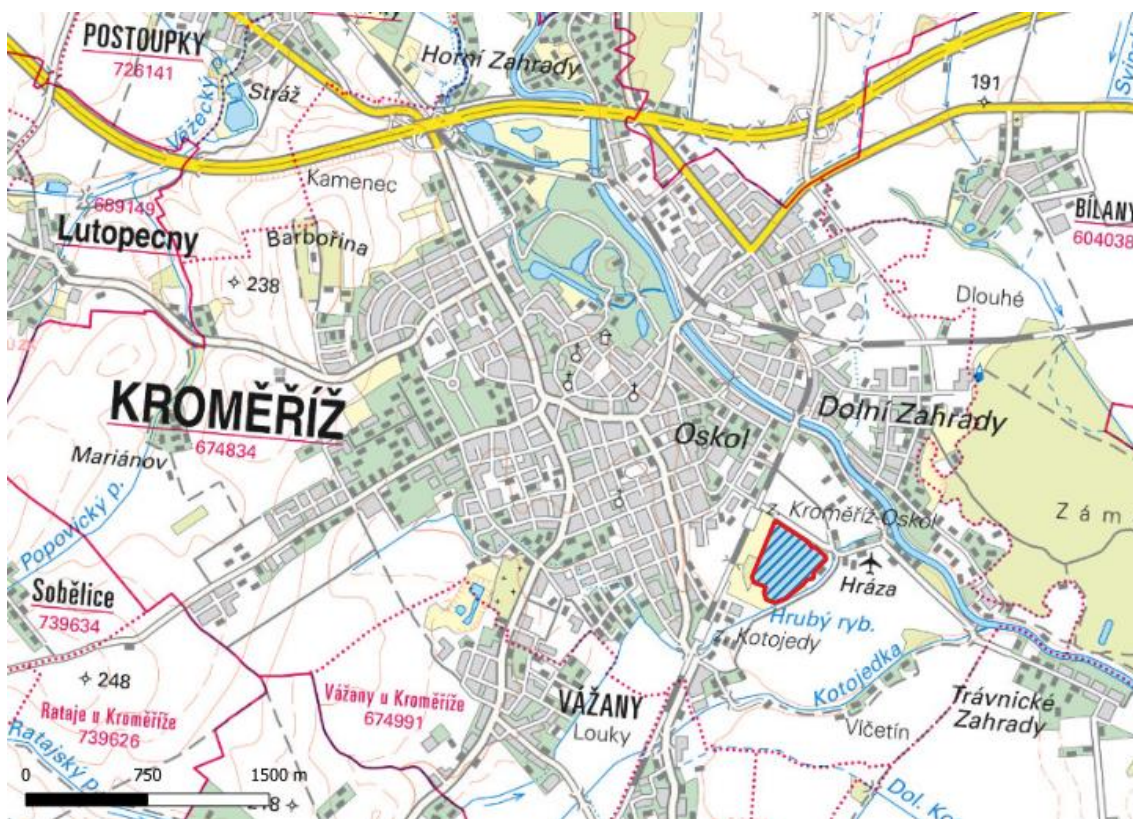


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 3: Mapa a fotografie lokality – Hrubý rybník (Hráza)



Foto z 23. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

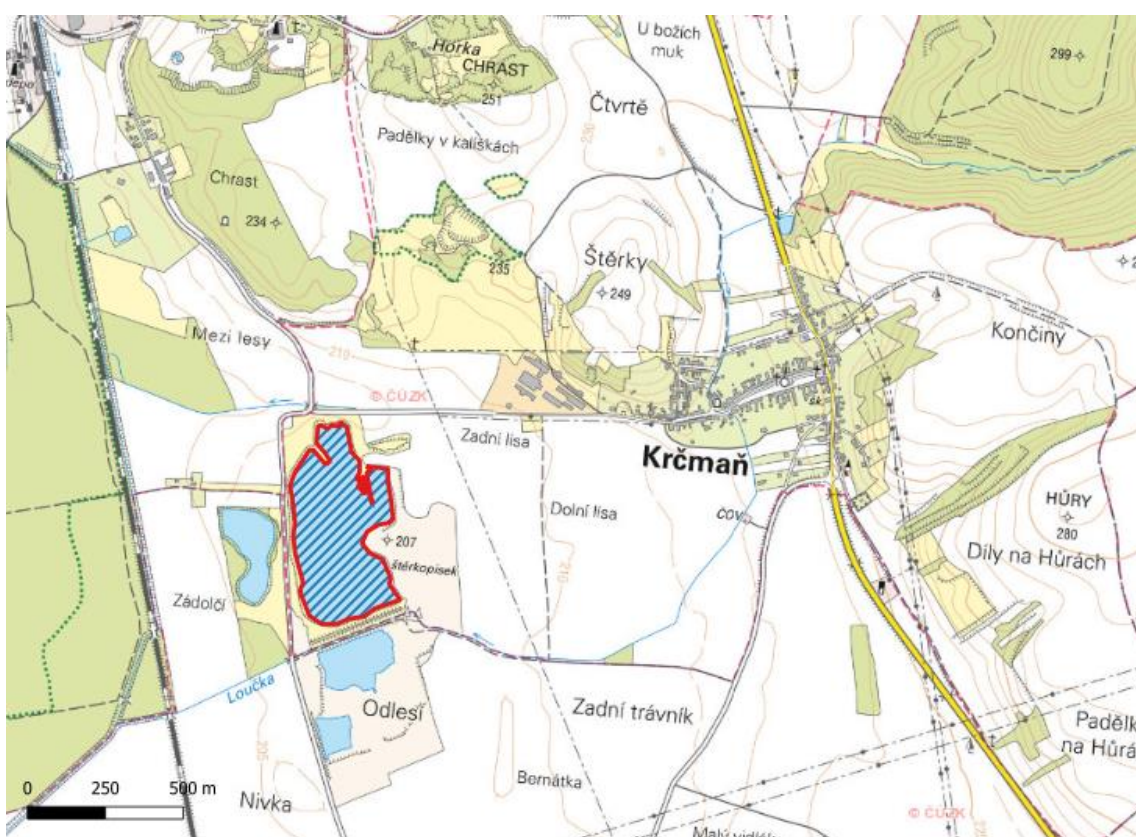


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 4: Mapa a fotografie lokality – Krčmaň



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

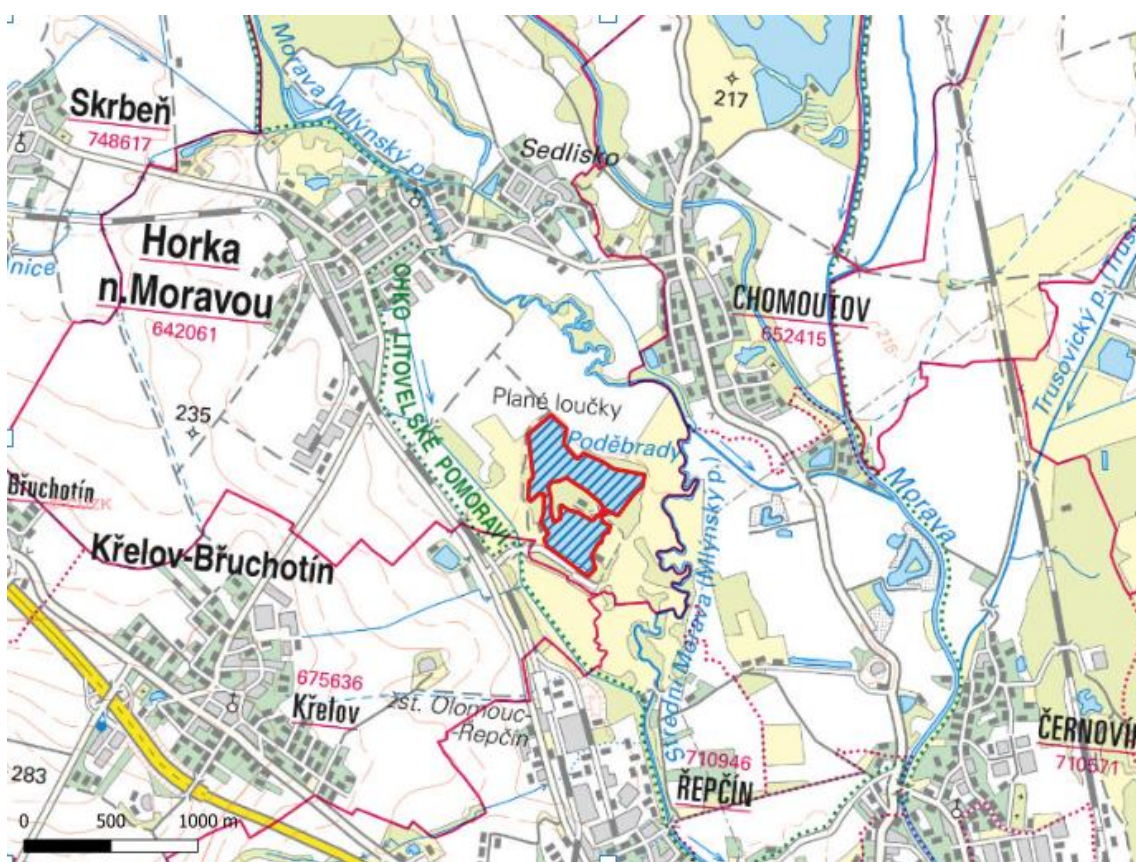


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 5: Mapa a fotografie lokality – Poděbrady



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

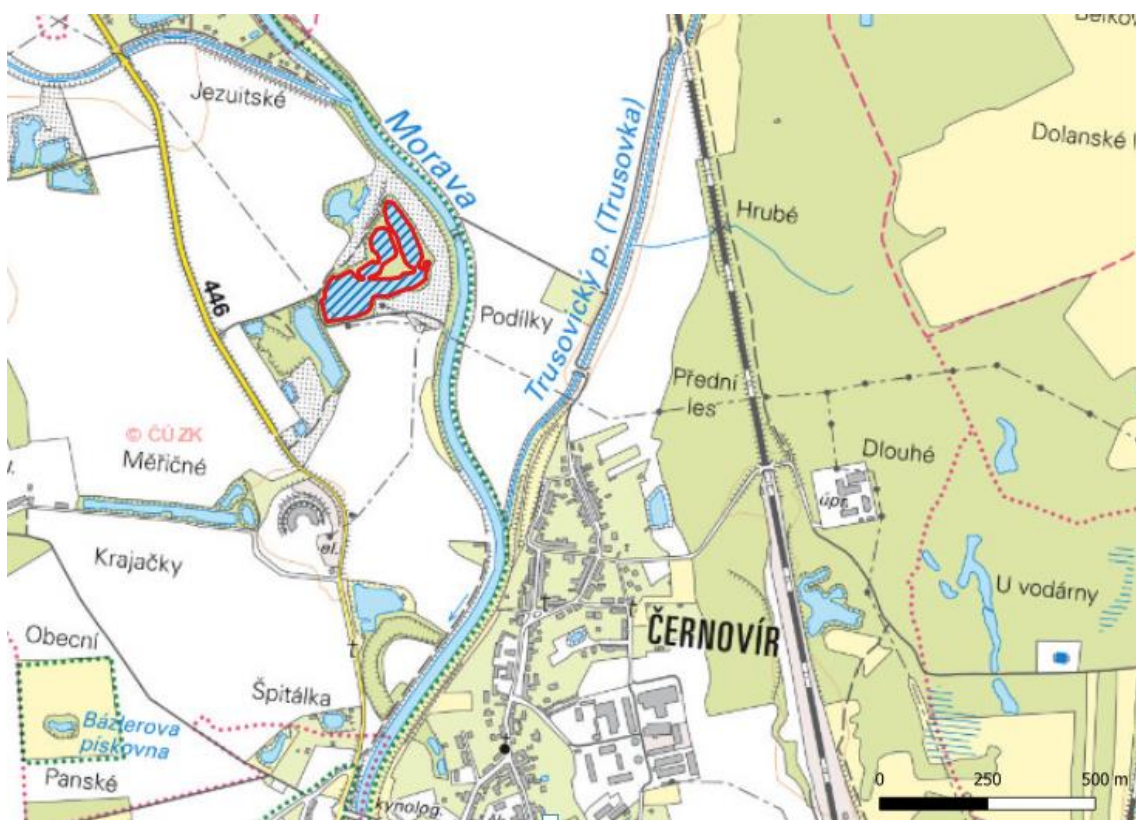


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 6: Mapa a fotografie lokality – Pískovna mezi Olomoucí a Chomoutovem



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová



Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 7: Mapa a fotografie lokality – Hlušovice



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

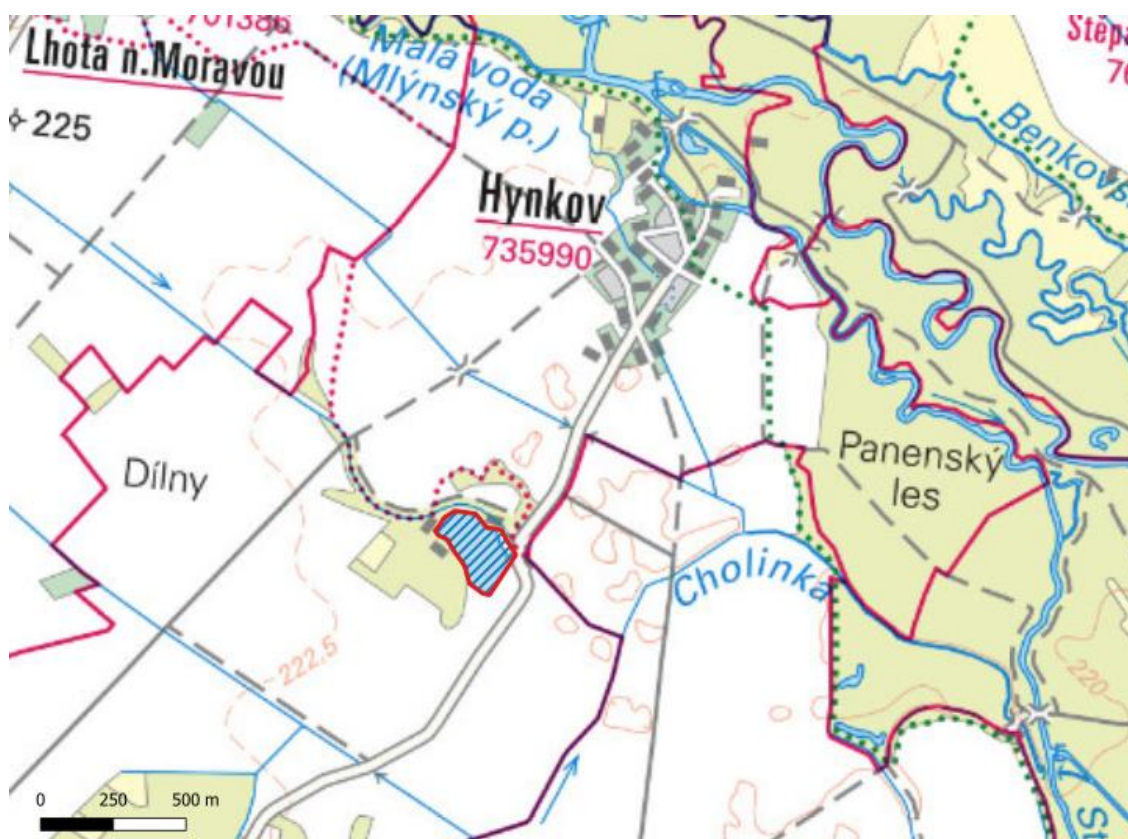


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 8: Mapa a fotografie lokality – Příkazská štěrkovna



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

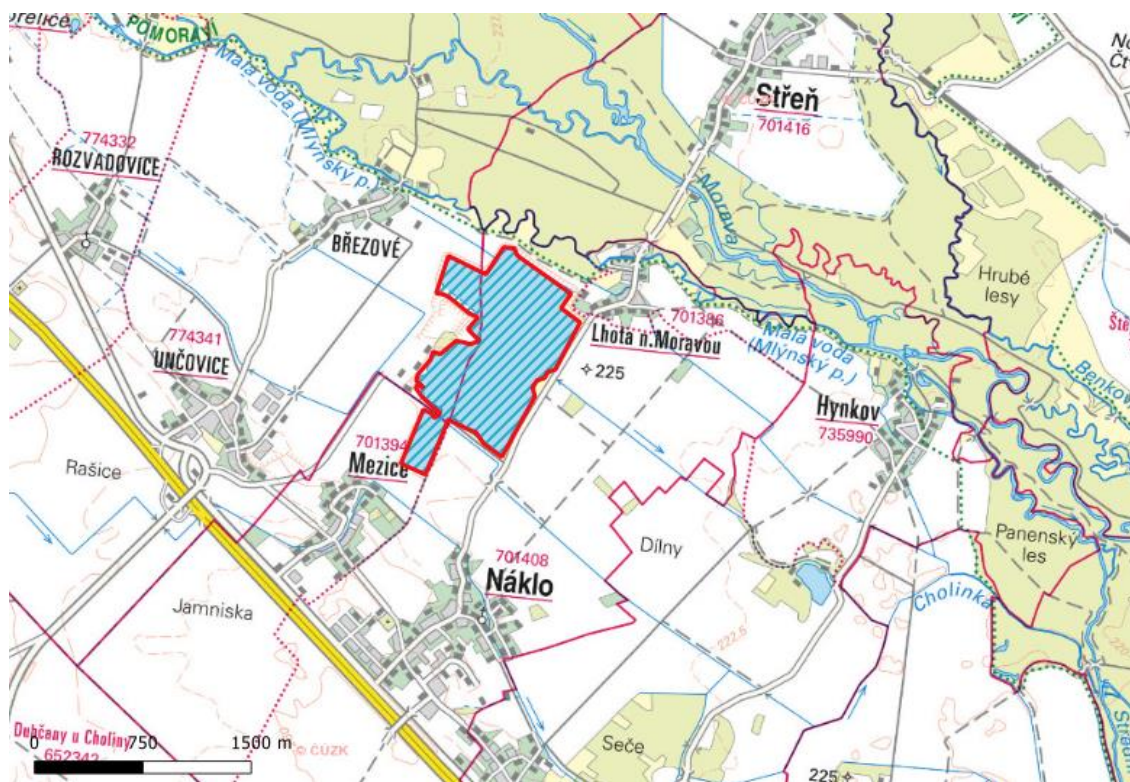


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 9: Mapa a fotografie lokality – Náklo



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

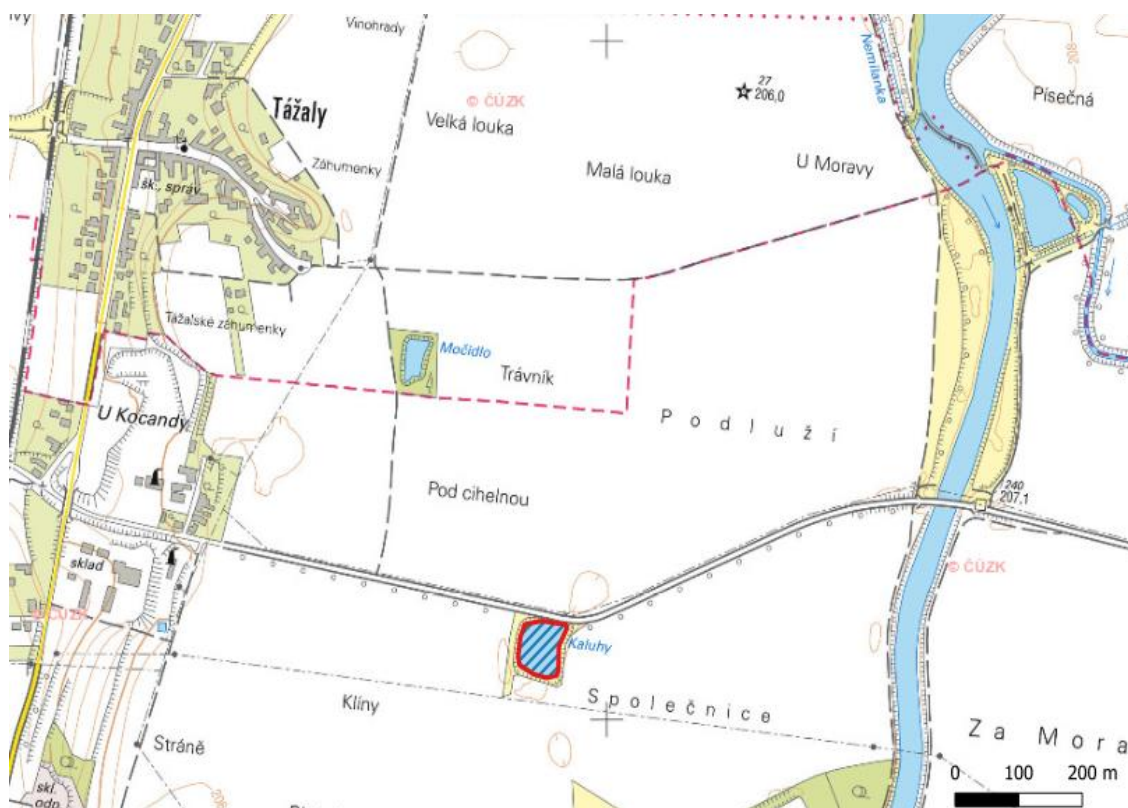


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 10: Mapa a fotografie lokality – Kaluhy



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

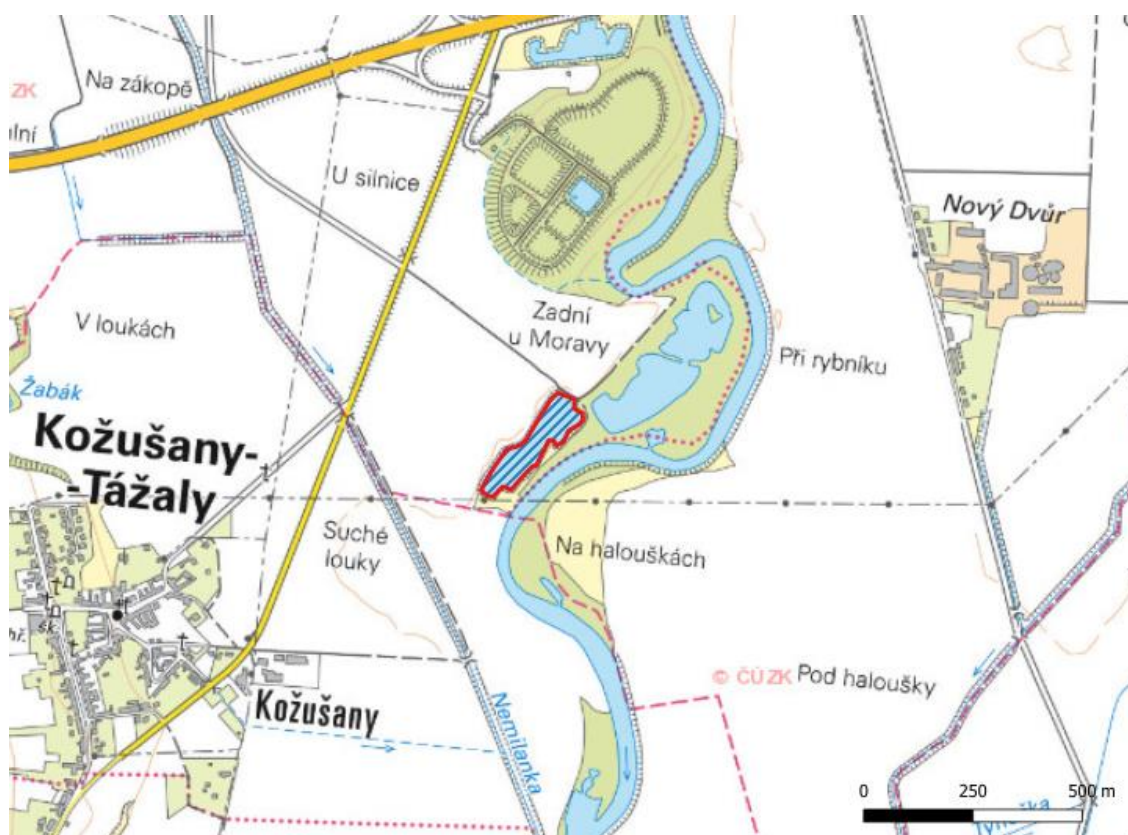


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 11: Mapa a fotografie lokality – Nemilanská pískovna



Foto z 24. 6. 2018, autor Tereza Reimerová

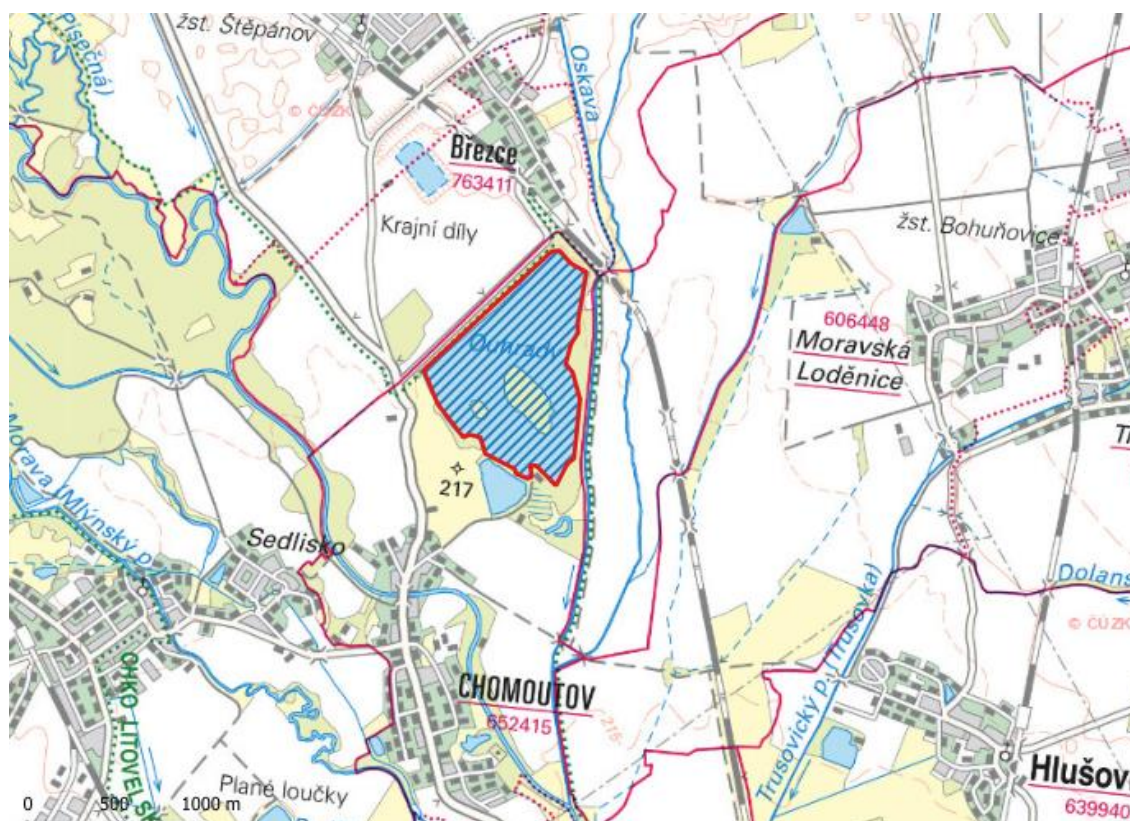


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 12: Mapa a fotografie lokality – Chomoutovské jezero



Foto ze 7. 3. 2019, autor Veronika Izáková

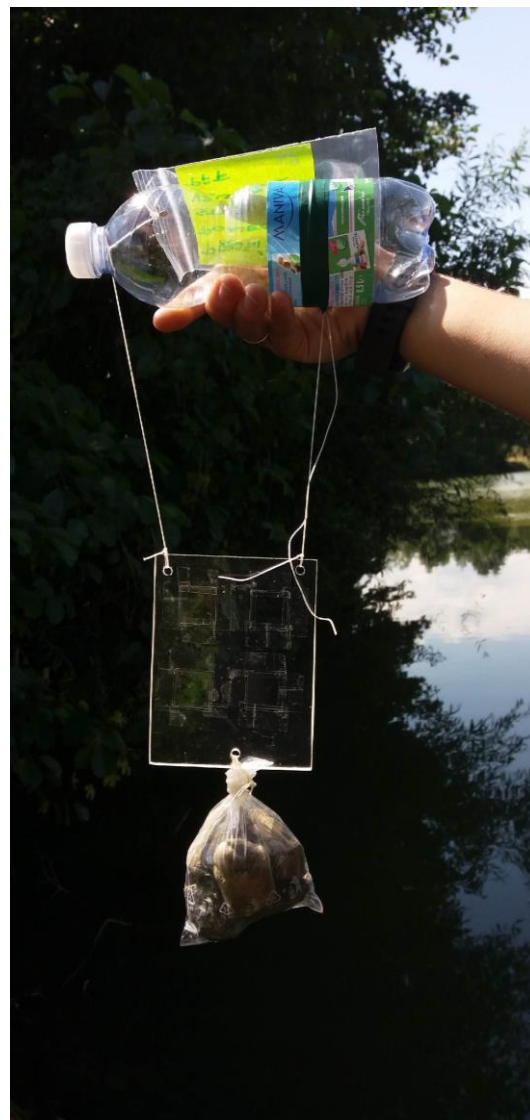


Zdroj: Vlastní zpracování v programu QGIS

Příloha 13: Fotografie metody odběru vzorků pomocí plexiskla



Fotografie ze dne 30. 7. 2018
(Poděbrady), autor Tereza Reimerová



Fotografie ze dne 30. 7. 2018 (Příkazská
štěrkovna), autor Yvona Reimerová