

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* L.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Jan Šínko

Autor diplomové práce: Bc. Vendula Moravcová

České Budějovice, 2015

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vendula MORAVCOVÁ**
Osobní číslo: **Z13747**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* L.**
Zadávací katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod: Cílem práce je vyhodnocení genetického polymorfismu populací invazní bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*; Leidy 1851) na vybraných lokalitách České republiky, pomocí molekulárních markerů.

Cíle práce: Definice hypotéz a cílů práce.

Literární přehled: Taxonomické zařazení a popis *P. magnifica*, charakteristika eukaryotního genomu, přehled molekulárních markerů aplikovatelných ke studiu diverzity organismů s dosud neznámým genomem, hodnocení genetické diverzity a genového toku.

Materiál a metody: Popis a charakteristika studovaných kolonií *P. magnifica*, metodika odběru vzorků, izolace DNA a analýzy molekulárních markerů.

Výsledky: Charakterizace odběrů a odběrových lokalit, vyhodnocení technik izolace DNA, výsledky analýz molekulárních markerů, vyhodnocení elektroforetických dat, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.

Diskuze: Porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: 2 tabulky, 1 graf, 3 obrázky
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

- Balounová Z., Rajchard J., Švehla J., Šmahel L. 2011. The onset of invasion of bryozoan *Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech Republic). *Biologia*. 66: 1091-1096.
- Desser S.S., Koehler A., Barta J.R., Kamyab J., Ringuette M.J. 2004. *Trichonosema algonquinensis* n. sp (Phylum microsporidia) in *Pectinatella magnifica* (Bryozoa : Phylactolaemata) from Algonquin Park, Ontario, Canada. *Journal of eukaryotic microbiology*. 51: 389-393.
- Ingold J.L., Mundahl N.D., Weigt L.A., Guttman S. 1984. Ecology and population-genetics of the fresh-water bryozoan, *Pectinatella magnifica* Leidy. *Journal of freshwater ecology*. 2: 499-508.
- Ishii T., Kurita M. 2006. A study of clone of *Pectinatella magnifica* (freshwater bryozoan) used by RAPD analysis. *Zoological science*. 23: 1152-1152.
- Šetlíková I., Skácelová O., Šinko J., Rajchard J., Balounová Z. 2013. Ecology of *Pectinatella magnifica* and associated algae and cyanobacteria. *Biologia*. 68: 1136-1141.

Projekt: GAČR P503/12/0337: Invazní mechovka *Pectinatella magnifica* v České republice: její biologie a sekundární metabolity


Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Konzultant diplomové práce: Ing. Jan Šinko
Katedra biologických disciplin

Datum zadání diplomové práce: 14. května 2014
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2015


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDEJOVICÍCH
ZEMĚLSKÁ FAKULTA
stupeň oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. května 2014

Prohlášení

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

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 24. dubna 2015

.....

bc. Vendula Moravcová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce, Ing. Lence Havlíčkové, Ph.D., za vedení a vstřícný přístup i přes často obtížné podmínky. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Ing. Janu Šinkovi a panu docentu Rajchardovi za cenné rady. Další komu bych ráda poděkovala, je pan profesor Vladislav Čurn za umožnění využití laboratoří a jejich vybavení a zároveň bych ráda poděkovala zaměstnancům katedry Speciální produkce rostlinné za vydatnou a cenou pomoc při zpracovávání mé práce. Jmenovitě bych chtěla poděkovat paní doktorce Barboře Kubátové za pomoc při vyhodnocování zpracovaných výsledků a paní inženýrce Evě Jozové za pomoc při práci v laboratoři. Nakonec bych ráda poděkovala všem členům své rodiny a svým přátelům za podporu a vytváření dobré atmosféry při zpracovávání této práce.

Abstrakt

Pectinatella magnifica je sladkovodním organismem žijícím v koloniích, které lze často nalézt přisedlé na ponořených částech/větvích příbřežních rostlin, ale také kamenech, samotném dně či volně ve vodě. Obývá především oligotrofní až mezotrofní vody, ve kterých teplota během roku dosahuje 20°C. Poprvé byla nalezena a popsána v oblasti Filadelfie roku 1851 Josephem Leidyem. Ačkoliv je původním místem výskytu Severní Amerika, v současné době je známá jako invazní organismus i na dalších kontinentech. V Evropě byl první výskyt zaznamenán již v 80. letech 19. století v okolí Hamburku, kam byla dopravena pravděpodobně na trupech lodí. V České republice se první zaznamenaný výskyt datuje v první polovině 20. století a to v povodí Vltavy a Labe. Nejčastější způsob šíření je umožněn především pomocí vnitřních pupenů, tzv. statoblastů, opatřených háčky, díky kterým se mohou přichytit na jakýkoliv podklad, což umožňuje snadnou distribuci i na velké vzdálenosti skrze jinak obtížný terén. Tato práce využívá techniky AFLP k vyhodnocení genetické diverzity kolonií odebraných na území CHKO a BR Třeboňsko a to na vodních nádržích Veselí I, Staňkovský, Nový Kanclíř, Cep, Vlkov a Nový Lipnický z pohledu let i geografie.

Klíčová slova: *Pectinatella magnifica*; statoblasty; zooidy; DNA; analýza AFLP

Abstract

Pectinatella magnifica is a colony of freshwater organisms, which are most often found on the submerged parts/branches of coastal plants, but also fixed to stones, growing at the bottom of ponds, or free - floating. These organisms can be found mostly in oligotrophic to mesotrophic waters, and appear to thrive in temperatures that reach 20°C during colonisation. They were first found and described in Philadelphia in 1851, by Joseph Leidy. Although *Pectinatella magnifica* originates from North America, it has now become an invasive species on the other continents. The first recorded occurrence in Europe was during the 1980s in Hamburg, where it was probably transported on ships' hulls. In the Czech Republic it was recorded for the first time in rivers Vltava and Labe in the first half of the 20 th century. The most common method of its propagation is through internal buds, called statoblasts, fitted with hooks that make it able to cling to any surface, and allow easy distribution over long distances and otherwise impossible terrain. This study uses AFLP analysis of statoblast DNA to analyse the genetic diversity within *P. magnifica* colonies themselves, changes over time, and between different sites within the Protected Landscape Area (PLA) and a Biosphere Reserve (BR) of Třeboňsko, namely ponds Veseli I, Staňkovský, Nový Kanclíř, Cep, Vlkov and Nový Lipnický.

Key words: *Pectinatella magnifica*; statoblasts; zooids; DNA; AFLP analysis

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD..... | 10 |
| 2. LITERÁRNÍ REŠERŠE | 10 |
| 2.1. Taxonomie druhu <i>Pectinatella magnifica</i> | 10 |
| 2.2. Utváření těla jedinců <i>Pectinatella magnifica</i> (třída <i>Phylactolaemata</i>) | 12 |
| 2.3. Reprodukční systém <i>Pectinatella magnifica</i> (třída <i>Phylactolaemata</i>)..... | 14 |
| 2.4. Potravní preference druhu <i>Pectinatella magnifica</i> | 16 |
| 2.5. Soužití <i>Pectinatella magnifica</i> s dalšími organismy | 16 |
| 2.6. Vliv charakteristik vodní komponenty na život kolonií <i>Pectinatella</i> | 18 |
| 2.6.1. Teplota vody | 18 |
| 2.6.2. Složení vody..... | 19 |
| 2.7. Vliv substrátu na růst kolonií <i>Pectinatella</i> | 20 |
| 2.8. Rozšíření <i>Pectinatella magnifica</i> ve světě | 21 |
| 2.9. Rozšíření <i>Pectinatella magnifica</i> v rámci České republiky | 24 |
| 2.10. Eukaryotní genom | 25 |
| 2.10.1. Velikost | 26 |
| 2.10.2. Struktura genu | 27 |
| 2.11. Molekulární markery..... | 29 |
| 2.12. Hodnocení genetické diverzity a genového toku | 30 |
| 2.13. Charakteristika a hodnocení genetické diverzity | 31 |
| 2.14. Charakteristika genového toku..... | 32 |
| 3. Cíl práce..... | 33 |
| 4. Metodika | 33 |
| 4.1. Popis území..... | 34 |
| 4.1.1. Klima..... | 34 |
| 4.1.2. Geologie..... | 35 |
| 4.1.3. Geomorfologie | 35 |
| 4.1.4. Pedologie..... | 36 |
| 4.1.5. Hydrologie | 36 |
| 4.1.6. Flora a fauna | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.1.7. | Zemědělství | 38 |
| 4.1.8. | Hospodářství | 39 |
| 4.1.9. | Ochrana území | 39 |
| 4.2. | Materiál | 41 |
| 4.3. | Metody | 44 |
| 4.3.1. | Metoda odběru <i>Pectinatella magnifica</i> | 44 |
| 4.3.2. | Zpracování vzorků | 45 |
| 4.3.3. | Optimalizace techniky izolace DNA..... | 47 |
| 4.3.4. | Analýza izolované DNA | 48 |
| 4.3.5. | Analýza AFLP | 49 |
| 4.3.6. | Fragmentační analýza vzorků | 52 |
| 4.3.7. | Vyhodnocení dat po fragmentační analýze | 53 |
| 5. | Výsledky a diskuze | 53 |
| 5.1. | Výsledky izolace DNA | 53 |
| 5.2. | Výsledky analýzy AFLP | 59 |
| 5.2.1. | Výsledky AFLP..... | 60 |
| 5.2.2. | Analýza AFLP profilu..... | 61 |
| 6. | Závěr | 65 |
| 7. | Literatura..... | 66 |
| 8. | Seznam grafů | 78 |
| 9. | Seznam obrázků..... | 79 |
| 10. | Seznam tabulek | 80 |
| 11. | Seznam zkratk | 80 |
| 12. | Přílohy..... | 81 |

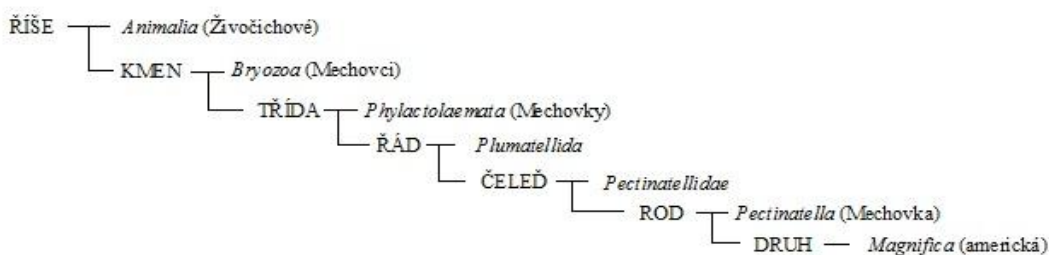
1. ÚVOD

Pectinatella magnifica Leidy (1851) je sladkovodním druhem pocházejícím původně ze Severní Ameriky. V současné době je známá jako invazní organismus obývající teplé čisté vody nejen na území Ameriky, ale i v Evropě a Asii. Její snadné šíření je umožněné nejen vysokou produkcí vnitřních pupenů (=statoblasty), schopných bez problémů vydržet podmínky, které jsou pro kolonie zooidů extrémní, ale i snadné přichycení k jakémukoliv podkladu pomocí háčků, kterými jsou statoblasty opatřeny. Ačkoliv je studium její ekologie předmětem zájmu u mnoha badatelů, z genetického hlediska je stále ještě poměrně málo prostudována.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1. Taxonomie druhu *Pectinatella magnifica*

Bochnatka americká *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851), jinak také mechovka americká, je zástupcem kmene Mechovci (*Bryozoa*). Jedná se o starobylou skupinu vodních organismů, která je převážně tvořena mořskými živočichy. Kromě mořských je zde i významná skupina sladkovodních druhů (Wood, 2010).



Obr. 1 Systematické zařazení *Pectinatella magnifica* (Lacourt, 1968)

Původně skupina Mechovci zahrnovala dva kmene *Entoprocta* a *Ectoprocta* (Wood, 2010). Původní zařazení do společné skupiny mělo pravděpodobný základ v podobné morfologii zástupců obou skupin, později bylo ale zjištěno, že se jedná o dvě nepřibuzné a vzdálené skupiny. V současné době jsou rozděleny do dvou samostatných kmenů (Lacourt, 1968). Kmen *Entoprocta*, jinak *Kamptozoa* nebo také

Mechovnatci, a kmen *Ectoprocta* s jiným, již zmíněným, označením *Bryozoa*, česky Mechovci. Kmen *Bryozoa* je dále dělen do tří tříd. Jedná se o třídy *Stenolaemata*, *Gymnolaemata* a *Phyllactolaemata* (Fuchs, et al., 2009).

Celkem je v rámci kmene *Bryozoa* popsáno téměř 8 000 různých druhů, z nichž naprostá většina jsou zástupci mořského prostředí (D'hondt, 2005). Pouze několik málo druhů je schopno obývat pevninské sladké vody (Massard, et al., 1992). Tito sladkovodní jedinci patří stejně jako *Pectinatella magnifica* do třídy *Phyllactolaemata* a pouze několik druhů je zařazeno do třídy *Gymnolaemata* (Wood, 2010).

Třída *Stenolaemata* je skupina mořských organismů vytvářejících kolonie o nízké úrovni polymorfismu se schránkou tvořenou uhličitánem vápenatým. Většina zástupců této třídy je již vyhynulá, známá žijící je pouze jedna čeleď (Fuchs, et al., 2009).

Třída *Gymnolaemata* je převážně tvořena zástupci mořských organismů, ale vyskytují se zde i zástupci žijící v brakických vodách, např. *Plumatella repens*, *Plumatella fungosa* atd. nebo dokonce i sladkovodní druhy. Zástupci *Gymnolaemata* žijí ve značně polymorfních koloniích, které mohou mít vápenatou schránku. Tato schránka se ale nevyskytuje u všech druhů (Massard a Geimer, 2008a). Zahrnuje dva řády, *Ctenostomata* se schránkami bez uhličitanu vápenatého a *Cheilostomata* s vápenatou schránkou (Barnes a Golding, 2009). Tato třída je také typická tím, že neprodukuje žádné statoblasty.

Třetí skupinou kmene *Ectoprocta* je třída *Phyllactolaemata* (mechovky). Tato skupina je tvořena výhradně sladkovodními druhy s monomorfními koloniemi (Massard a Geimer, 2005). V dnešní době je v této třídě popsáno celkem 94 různých sladkovodních druhů mechovek. Zástupce této třídy lze nalézt v tekoucí i stojaté vodě všech světových kontinentů s výjimkou Antarktidy (Wood, 2001b).

2.2. Utváření těla jedinců *Pectinatella magnifica* (třída *Phylactolaemata*)

Pectinatella magnifica je organismus tvořený gelovou hmotou žluté až žlutohnědé barvy (Brandwein, 1938).

Pectinatella magnifica byla poprvé popsána Josephem Leidyem v Americké Philadelphii v roce 1851 pod názvem *Cristatella magnifica*. Téměř okamžitě však sám zaznamenal její nespojitost s rodem *Cristatella* a již v dalším čísle „Proceedings“ publikovaném v tomtéž roce navrhl nový rod „*Pectinatella*“ (Leidy, 1851).

Jedná se o organismus vyskytující se ve formě kulovitých kolonií. Jednotlivé kolonie dorůstají velikosti v průměru 0,6 m a jejich hmotnost se pohybuje od 0,25 do 70 kg (Balounová, et al., 2007). Kromě této formy se *Pectinatella magnifica* může vyskytovat i v podobě povlaků na různých substrátech, kdy kolonie mohou dorůstat několika metrů (Šetlíková, et al., 2005).

Jednotlivé kolonie jsou složeny až z několika tisíc zooidů. Tito zooidi jsou pak lokalizováni na povrchu gelové hmoty (Rodriguez a Vergon, 2002). Povrch *Pectinatella magnifica* je rozdělen do jednotek nazvaných rozety, kdy jednu rozetu utváří přibližně 12 až 18 zooidů (Morse, 1930).

Každý zooid se skládá z části tělní stěny (cystid) a z vnitřních orgánů uložených v polypidu, který může částečně vyčnívat. Zooidi jsou blízkosti ústního otvoru zbarveni červenohnědě a v blízkosti lofoforu vytváří bílošedá místa (Wood, 2010). Jednotliví zooidi jsou vzájemně propojeny v rámci kolonie tělními dutinami a dohromady jsou obaleni vnější vrstvou cystidu. Cystid obaluje celý polypid a odděluje vnitřní prostředí kolonie od okolní vody. Jednotlivé části jsou vzájemně propojeny v různých místech třemi různými způsoby, a to pláštěm s chapadly, stahujícími se svaly a štíhlým funikulem vedoucím od střeva k vnitřní straně tělní stěny (Dendy, 1963). Polypid je dále nositelem lofoforu složeného z obrvených chapadel umístěných okolo centrálních úst. U většiny *Phylactolaemat* je uložen lofofor dorzálně v podobě dvou větví vytvarovaných do tvaru písmene U s vnější řadou dlouhých chapadel a vnitřní řadou kratších (Wood, 2010). Téměř u všech druhů je na každém chapadle umístěna jedna mediální a dvě laterální plochy brv, které se pohybují v metachronálních vlnách. Na své bázi jsou chapadla spojena intertentakulární membránou, která formuje rýhu mezi oběma řadami chapadel.

Obústí neboli peristom je uzavíratelný malým silně obrveným lalokem epistomem, který slouží při výběru potravy (Mukai, 1999).

Většina zástupců kmene *Bryozoa* má prostorný coelom, který je sdílený všemi zooidy. Hlavní coelom komunikuje s coelomem lofoforu, který zasahuje do každého z chapadel, přes částečně propustnou membránu. Čirá coelomatická tekutina cirkuluje k peritoneu pomocí řas. Celá trávicí soustava je potom ektodermálního původu a má tvar písmene U. Rozděluje se na hltan, žaludek a konečník. Ústní otvor se nachází uvnitř lofoforu a řitní otvor vyústuje vně. Hltan nálevkovitě vybíhá do žaludku přichycený k cystidu funikulem (Wood, 2010).

Na diaphragmě na základně epistomu mezi ústním a řitním otvorem se nachází malý nervový ganglion. Do každého z párových ramen lofoforu směřuje jedno z nervových vláken a rozvětňuje se do každého z chapadel. Další nervy směřují z ganglia do epistomu, obrveného pláště a do trávicího traktu. Mezi jednotlivými zooidy ale nedochází k žádné nervové komunikaci (Waeschenbach, et al., 2012).

Tělní stěna je složena z živých tkání nazvaných endocyst a z neživého endocystu. Hlavní coelom je obklopen peritoneem nesoucím obrvené plošky. Pod peritoneem leží tenká vrstva podélné svaloviny a bazální membrána. Tuto část překrývá kruhová svalovina a tenká vrstva epidermis (Dendy, 1963). U apexu zooidu je endocyst vchlýpen dovnitř a tvoří plochou kapsu, která se postupně připojuje k lofoforu. Na rozdíl od endocystu je uspořádání ectocystu velmi proměnlivé mezi jednotlivými druhy. U tubulárních kolonií se jedná o zerotizovanou schránku, která zůstává stálá i po odumření živých částí (Mukai, 1999). Minimálně u dvou druhů je ectocyst složen z náhodně uspořádaných chitinových mikrovláken. U netubulárních *Phylactolaemat* je ectocyst gelový a často lokalizovaný jen na některých částech kolonie (Morse, 1930).

U druhu *Pectinatella magnifica* je masivní želatinová vrstva tvořena většinou minimálně 99% vody a krom toho obsahuje částečně denaturované bílkoviny společně s chitinem, vápníkem a chloridem sodným (Šetlíková, et al., 2013). Množství sušiny v jedné kolonii jak je popsáno jednotlivými autory je vždy odvislé od stupně kolonizace řasami a cyanobakteriemi a pohybuje se od 0,4% do 2,25% (Morse, 1930).

Kolonie rodu *Pectinatella* jsou schopny prokazatelně ve svých tělech kumulovat některé látky obsažené ve vodě, ve které žijí. Především se jedná o různé formy dusíku a fosforu. Krom toho mají tyto kolonie také sklon k akumulaci jiných makrokomponent vody jako je hořčík, ale také celé řady mikrokomponent a stopových prvků jako jsou hliník, chrom, měď, kobalt, nikl, zinek, selen, kadmium nebo arzén (Balounová, et al., 2011). I přes tuto akumulaci prvků v koloniích *Pectinatella* není možné prokázat jejich filtrační a čistící schopnost, protože po odumření kolonií se látky uvolňují zpět do vody. Zároveň ale někteří autoři považují rod *Pectinatella* za bioindikátor čistoty vodních zdrojů, protože bylo prokázáno, že na zvýšený výskyt některých prvků jako je měď, zinek nebo chrom, je tento organismus citlivější než mnozí obratlovci i bezobratlé druhy živočichů (Pardue a Wood, 1980).

2.3. Reprodukční systém *Pectinatella magnifica* (třída *Phylactolaemata*)

V mírném klimatickém pásu jsou organismy z třídy *Phylactolaemata* sexuálně aktivní v jediném krátkém období roku. Pohlavní rozmnožování probíhá zpravidla v období od června do září (Wood, 2010).

Sperma se vyvíjí v nápadných celcích ve funikulu jednotlivých zooidů, ze kterých se dále pasivně šíří coelomem kolonie. Vajíčka se vyvíjí na břišní straně peritonea uvnitř zooidu. Předpokládá se, že k oplodnění dochází uvnitř coelomu. Z oplozeného vajíčka vzniká pupen oecium z něž se vytváří zygota a migruje do speciálního vaku vrstlého do tělní stěny nazvaného ovicele (Wood, 2001a). Embryo se postupně vyvíjí až do formy volně plovoucí struktury označené jako larva trochoforového typu, přestože se, technicky vzato, jedná o pohyblivou kolonii. Samotná bilaterálně souměrná larva je tvořena silně obrveným obalem a vnitřní hruškovitě tvarovanou hmotou (Wood a Wood, 2000). Vnitřní část rovněž zahrnuje plně vyvinuté polypidy společně s jejich funikuly a svalovinou. Larvy vytváří zpravidla více polypidů, kteří se po odumření mění v tzv. hnědé těleso. Po té co se larva zpravidla po setmění uvolní z kolonie, plave kupředu pólem obsahujícím speciální žláznaté buňky a nervové centrum (Wilcox, 1906). Obvykle během hodiny dojde k usazení jednotlivých larev. Po přisednutí se larva celá pokryje ektodermální tkání a následně dojde k jejímu zploštění. Tkáň lary podlehnou rozkladu a larva

ztratí brvy. Vytvoří se prvotní schránka protoecium a vznikne první jedinec kolonie. Okolo sebe vylučuje zooecium, které je označeno jako ancestroecium. Tímto je vytvořen primární zooid *Phylactolaemata* (Joo, et al., 1992).

Krom pohlavního rozmnožování mají všichni zooidi z kmene *Bryozoa* schopnost nepohlavního rozmnožování ve formě tvorby pupenů. Zvláštním rysem *Phylactolaemat* je nepohlavní produkce zapouzdřených spících pupenů nazvaných statoblasty (Wood, 2001a). Většina druhů produkuje statoblasty, které se uvolňují z kolonie. Každý statoblast je opatřen obalem ze sklerotizovaných komůrek vyplněných plynem, kvůli vztlaku a nadnášení. Mnoho druhů, které produkují statoblasty s funkcí nadnášení, nazvaných floatoblasty, produkují také specializované stálé mnohem větší statoblasty tzv. sessoblasty (Wood, 2010). Tyto statoblasty nemají prstenec pro vznášení ve vodě, jsou obaleny silnou chitinovou blánou a jejich úkolem je přichytit se k substrátu. Na těchto základech je potom umožněn růst nové kolonie (Šetlíková, et al., 2013).

Všechny statoblasty se skládají ze dvou chlopní spojených dohromady na ekvatoriální rovině. U většiny vznášejících se statoblastů je floatoblast tvořen dvěma strukturálními úrovněmi. Vnitřní část tzv. kapsule obsahuje germinální tkáň a zásoby potravy. Vnější periplast obklopuje celou kapsuli. Je tvořen obvodovým prstencem a centrálním otvorem. U většiny druhů má dorsální neboli cystigenická chlopeň menší otvor a tím také větší prstenec než ventrální deutoplasmická chlopeň (Wood, 2010).

U třídy *Phylactolaemata* vznikají pupeny na specifickém místě uprostřed ventrální části tělní stěny rodičovských zooidů. Vznik nového pupenu je doprovázen vytvořením nového zárodku pupenu, který se může, ale také nemusí dále vyvíjet. Každý zooid nese dva zárodky nových pupenů: hlavní pupen, který vytváří první dceřiný zooid a tzv. vedlejší náhodný pupen, ze kterého vzniká druhý dceřiný zooid. Nadto má každý hlavní pupen svůj menší duplikát na své ventrální straně. V průběhu pučení se z tzv. vedlejšího náhodného pupenu a duplikátu stanou hlavní pupeny a vytvoří se nový náhradní pupen a jeho duplikát (Dendy, 1963).

Statoblasty druhu *Pectinatella magnifica* jsou prohnuté, kruhového tvaru o průměru přibližně 1 mm (Jones, et al., 2000). Statoblasty jsou opatřeny marginálními ostny v počtu 11 – 22 a jejich počet se odvíjí od aktuálních podmínek stanoviště i kolonie samotné. Každý z ostnů nese pár distálních háčků umístěných na ventrální

nebo dorsální straně statoblastu (Oda a Mukai, 1985). Asexuální produkce dormantních statoblastů umožňuje pasivní disperzi několika různými způsoby. Jedná se buď o individuální šíření vodními proudy, prostřednictvím vegetace nebo živočichů (Massard, et al., 1992). Byl potvrzen zejména přenos statoblastů prostřednictvím migrujících vodních ptáků jako např. *Calidris alba*, *Gavia adamsii* nebo *Pluvialis squatarola*. K rozšiřování statoblastů přispívá i člověk svými aktivitami jako je např. lodní doprava (Bilton, et al., 2001).

Vedle tohoto typu nepohlavního rozmnožování je u některých rodů třídy *Phylactolaemata* včetně kolonií rodu *Pectinatella* možnost významného rozšíření jejich počtu aktivním štěpením kolonie. Produkt tohoto štěpení se zvolna pohybuje po substrátu díky silám vyvinutým brvami lofoforu a také za přispění vyměšování polotekutého gelového sekretu. Schopnost pohybovat se u takto vzniklé nové kolonie klesá úměrně s tím, jak kolonie roste. Kolonie se díky postupnému zpevňování styčné vrstvy se substrátem stává následně imobilní (Massard a Geimer, 2008b).

2.4. Potravní preference druhu *Pectinatella magnifica*

Pectinatella magnifica se řadí společně s dalšími sladkovodními a brakickými zástupci kmene *Bryozoa* mezi tzv. filtrátory. Znamená to, že se jedinci živí filtrací vody obsahující plankton (prvoci, sinice a řasy). Nejvýznamnější složkou potravy jsou rozsivky, ale živí se rovněž členovci a detritem (Balounová, et al., 2007).

U kolonií bylo zaznamenáno přibližně po 3 až 4 týdnech po pevném uchycení kolonie k substrátu naprosté vyhladovění, a to i přes fakt, že organismus obsahuje v trávicím traktu jednobuněčné řasy. Proces hladovění probíhá postupně tak, že jednotlivé polypidy jsou redukovány, až do okamžiku kdy poslední z nich stráví veškeré ostatní tkáň jedinců v kolonii a sám uhyne (Williams, 1921).

2.5. Soužití *Pectinatella magnifica* s dalšími organismy

Kolonie druhu *Pectinatella magnifica* nejsou z hlediska soužití s dalšími organismy tak aktivní jako některé další druhy ze stejné třídy (Kent, et al., 2000). Přesto ale k různým asociacím dochází. Příkladem může být hostitelství pro jedince *Microsporidia* a *Myxozoa* (Canning, et al., 2002). Rovněž parazitické druhy rodů

Trichonosema a *Tetracapsula* jsou vázány na kolonie *Pectinatella*, v jejichž coelomu dochází k jejich sexuálnímu vývoji (Okamura a Wood, 2002). Tyto parazitické druhy způsobují závažná onemocnění ledvin lososovitých ryb (Anderson, et al., 1999).

Důležité je také ovlivnění skladby řas v prostředí přítomností kolonií rodu *Pectinatella*. Tam kde se kolonie vyskytovaly, jsou dominantním druhem sinice (90%) a naopak v nepřítomnosti jedinců z kmene *Bryozoa* byly jako dominantní druh nacházeny rozsivky (78%). Výskyt řas a sinic je zaznamenán také uvnitř a na povrchu kolonií *Pectinatella magnifica*. Na povrchu se jedná především o řasy rodu *Navicula*, zatímco uvnitř kolonie je nejhojnější výskyt kolonií sinic rodů *Pseudoanabena* nebo *Aphanotece*, případně řas rodů *Scenedesmus* a *Coenocysis* (Joo, et al., 1992). Některé druhy řas a sinic, které jsou součástí planktonu v oblasti štěrkopísků, byly zaznamenány jak vně tak uvnitř kolonií *Pectinatella*. Jedná se například o rody *Coenococcus*, *Cymbella*, *Eunotia*, *Microchaete*, *Oscillatoria* atd. Podle Šetlíkové, et al. (2013) byly uvnitř matrix nalezeny převážně řasy rodů *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Monoraphidium*, a také *Coenococcus* a *Eustigmatos*. V povrchové vrstvě kolonií byly nalezeny řasy rodů *Bulbochaete* a *Tetraspora*, a sinice rodů *Aphanothece*, *Cylindrospermum*, *Tolypothrix* a *Merismopedia*. Na vodních plochách, kde se vyskytují kolonie *Pectinatella magnifica*, došlo k prokazatelnému snížení rozvoje řas a sinic. Jejich rozvoj byl posunut následně až na období rozpadu kolonií *Pectinatella* (Frost a Williamson, 1980).

Kolonie *Pectinatella* poskytují také úkrytové možnosti některým skupinám živočichů. Jedná se především o drobné druhy plžů a korýšů (Balounová, et al., 2007).

Častým jevem je výskyt larev rodu *Chyromiidae*, které vytváří v gelové hmotě kolonií kanálky. Tyto kanálky bývají červeně zbarvené, pravděpodobně díky výskytu bakterií. Tyto kanálky pak mohou být i v hlubších vrstvách gelové struktury, pravděpodobně z doby růstu kolonie (Dendy, 1963).

Výskyt rodu *Pectinatella* bývá velmi často doprovázen výskytem sladkovodních druhů hub, zejména druhu *Ephydatia fluviatilis* (Hand, 1991).

Kolonie *Pectinatella* slouží rovněž jako prostor pro kladení vajíček ploštěnek, třída *Turbellaria* (Šetlíková, et al., 2005).

Doposud nebyl prokázán výskyt žádného z živočichů, který by byl přímým potravním specialistou právě na tento konkrétní druh *Bryozoa*. Neznamená to ale, že by tento druh nesloužil jako potrava. Bylo doloženo, že pro některé jedince třídy *Turbellaria*, drobné plže, larvy rodu *Cryptobironomus* nebo *Trichoptera* slouží kolonie jako jeden z možných zdrojů potravy. Stejný jev byl pozorován i u mladých jedinců kachny *Csirrina maschata domestica* nebo *Somateria spectabilis* (Balounová, et al., 2011).

Pozitivním faktem je že jedinci *Pectinatella magnifica* nevytváří konkurenční tlak na původní obyvatele lokalit, kde se vyskytují. Pravděpodobně tak obývají volné ekologické niky (Gugel, 2001).

2.6. Vliv charakteristik vodní komponenty na život kolonií *Pectinatella*

2.6.1. Teplota vody

Druh *Pectinatella magnifica* je obecně stejně jako další zástupci kmene *Bryozoa* považován za termofilní druh, vyžadující pro svůj život vyšší teplotu vody, zpravidla v rozpětí 15 – 28°C. Za kritickou teplotu vody pro konkrétní druh *Pectinatella magnifica* je považována hranice 20°C. Růst kolonií začíná, až v době kdy alespoň po dobu tří dnů stoupne teplota vody nad tuto stanovenou hranici a jakýkoliv byt i krátkodobý výkyv pod tuto mez vede k zastavení růstu (Balounová, et al., 2007). Déletrvajícím pokles teplot potom má za následek úhyn a rozpad kolonií a uvolnění statoblastů. V podmínkách střední a západní Evropy, a tedy i České republiky, dochází k prvnímu nárůstu kolonií a jejich rozvoji většinou v průběhu června a července (Wood, et al., 2006; Balounová, et al., 2011). Výskyt kolonií pak bývá zaznamenáván až do září a ojediněle až do konce října, v závislosti na průběhu teplot (Williams, 1921). Častým jevem zejména v posledních letech je prudké ochlazení v průběhu srpna, což vede k úhynu kolonií a jejich následnému rozpadu (Balounová, et al., 2011). Zajímavostí je nález kolonií *Pectinatella* i při výrazně nižší teplotě vody a to konkrétně 13,8°C na rybníku Podřezaný v roce 2010 a opakované nálezy sice mrtvých, ale nerozpadlých kolonií z let 2008 až 2010 pod ledem na Veselských pískovnách (Šetlíková, et al., 2013). Rosolovitá hmota zde potom byla následně nalezena i po roztání ledu. Při výrazném prudkém nárůstu teplot po

předcházející dlouhé periodě chladnějšího období byly zaznamenány větší rozměry kolonií a jejich rychlejší nárůst (Balounová, et al., 2007).

2.6.2. Složení vody

Kolonie rodu *Pectinatella* jsou pravděpodobně euryvalentním druhem, který nemá jasnou preferenci „čisté“ vody a i ke znečištěným vodním plochám je poměrně tolerantní (Wood, 2001b). Některé studie však poukazují na to, že tento organismus jednoznačně preferuje alespoň v počátku svého šíření na daném místě oligotrofní až mezotrofní vodu, jak bylo dokázáno při šíření v oblasti Jižních Čech (Balounová, et al., 2013). Na základě tohoto výzkumu se pro kolonie *Pectinatella magnifica* zdá být faktor trofie vody poměrně významný pro jejich růst. S tím je spojený rovněž fakt, že byl výskyt tohoto druhu na území Čech zaznamenán pouze na jediné intenzivně využívané rybochovné nádrži eutrofního až hypertrofního typu (Balounová, et al., 2007).

Zajímavým příkladem ovlivnění života kolonií rodu *Pectinatella* kvalitou vody je vodivost neboli konduktivita (Ricciardi a Reiswig, 1994). Výskyt kolonií je nejvíce zaznamenán na lokalitách s vodivostí nižší než $200 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Tam, kde jsou zaznamenány vyšší hodnoty vodivosti, je počet i velikost kolonií výrazně nižší. Možné je ale i naprosto obrácené vysvětlení celé situace, kdy je možné ovlivnění vodivosti a jejího snížení, kumulací biogenních látek v tělech a vnitřních tělních tekutinách jedinců *Pectinatella magnifica* (Balounová, et al., 2011).

Jedním z limitujících faktorů je podle Marcus (1925) rovněž průhlednost vody. I zde ale platí, že nejenom průhlednost ovlivní růst kolonií, ale i přítomnost kolonie pozitivně přispěje ke zlepšení průhlednosti vodní masy, a to díky filtrování potravy. Podle některých autorů je rovněž tento druh velmi náročný na okysličení vody díky vysoké intenzitě respirace, a tím zvýšené konzumaci kyslíku (Ricciardi a Lewis, 1991).

Velikost a počet kolonií na daném místě je velmi silně ovlivněn fertilitou vody. Ve vodních nádržích s nižším obsahem biogenních prvků jako je dusík, fosfor nebo draslík byl nalezen vždy jen nižší počet kolonií menších rozměrů a hmotnosti. Obecně lze ale konstatovat, že než samotné složení vody a její kvalitativní

charakteristiky je pro zdárný růst kolonií *Pectinatella* důležitá přítomnost vhodného substrátu (Balounová, et al., 2011).

2.7. Vliv substrátu na růst kolonií *Pectinatella*

Přestože je substrát významným faktorem, který promlouvá do růstu kolonií *Pectinatella*, není možné jednoznačně určit preferovaný typ substrátu. Při opakovaném pozorování na jednotlivých vodních nádržích byly zaznamenány různé preference substrátu v rámci jedné nádrže a i v průběhu jednotlivých sezón (Balounová, et al., 2007).

Kolonie studovaného druhu jsou nejčastěji nalézány na ponořených částech větví *Salix*, *Betula*, *Alnus* nebo *Pinus*, včetně ponořených kmenů těchto a dalších druhů dřevin. Nálezy byly zaznamenány rovněž na částech vyšších rostlin *Typha latifolia*, rodů *Nymphaea*, *Potamogeton*, *Alisma*, *Elodea*, *Lemna* nebo *Acorus* atd. (Šetlíková, et al., 2005). Kellicott (1882) zaznamenal rovněž výskyt na částech rostliny *Vallisneria spiralis*. Běžný je rovněž výskyt na povrchu kamenů i umělých materiálů např. sloupů, betonových prvků, plastových lahví a dalších odpadků ve vodě (Šinko, 2014). Na hlubších přehradních nádržích byl zaznamenán výskyt kolonií i ve větších hloubkách kolem 3 metrů na povrchu skalního podkladu (Balounová, et al., 2011).

Podle výsledků monitoringu z jednotlivých let lze předpokládat, že kolonie jako substrát preferují organické látky, jako jsou ponořené větve a kmeny stromů, a pouze v letech s vysokou produkcí biomasy dochází k preferenci neživých částí, jako jsou ponořené kameny (Šetlíková, et al., 2013).

V rámci výzkumů v minulém století byl studován rovněž vliv chemorecepce mladých kolonií při jejich usazování (Hubschman, 1970). Podle výsledků studie Joo, et al. (1992), kolonie *Pectinatella magnifica* preferují spíše organický materiál před anorganickým a dále vykazují preference větších částic substrátu před menšími. Jako velmi špatný substrát byl označen písek, což logicky vede k úvahám, že kolonie nalezené na tomto materiálu jsou spíše odtrženými částmi kolonií z jiného typu substrátu než samostatně narostlými přímo na písčném podkladě (Hubschman, 1970).

Preferování jednotlivých typů substrátu ať už z pohledu velikosti nebo původu je do značné míry ovlivněno pestrostí nabídky v daném prostředí (Balounová, et al., 2007).

2.8. Rozšíření *Pectinatella magnifica* ve světě

Pectinatella magnifica byla poprvé objevena, jak již bylo výše popsáno, Josephem Leidyem na území Spojených států Amerických v regionu Philadelphia v roce 1851 (Leidy, 1851). V této době byla považována za čistě americký druh, který v žádné jiné části světa nebyl popsán. Po dalších 30 letech byl druh popsán na potoce Rattlesnake creek nedaleko Buffala (Kellicott, 1882) v roce 1882 a na řece Mississippi v roce 1885 (Jullien, 1885). Stále se však jednalo o popsáný výskyt pouze na území Severní Ameriky a vědci předpokládali šíření pouze prostřednictvím místních živočichů jako např. vodních ptáků (Kellicott, 1882).

V této době se však tento druh začal objevovat i v jiných částech světa, a to především v Evropě. Poprvé na Evropském kontinentu byla *Pectinatella magnifica* popsána na Labi v Hamburku (Kraepelin, 1887). Již od začátku panovalo přesvědčení, že se jedná o nearktický americký druh zavlečený do Evropských řek pravděpodobně prostřednictvím lodní dopravy na trupech nákladních lodí (Kafka, 1887). Někteří autoři jako například Jullien (1885) považovali ale výskyt v Německu za náhodný a dále druh považovali za druh vyskytující se pouze na Americkém kontinentě, jiní se teritoriem výskytu vůbec nezabývají jako např. Loppens (1908). Názor o náhodném zavlečení byl v následujících letech podpořen dalším výskytem popsáným v Severní Americe, a to tentokrát i v netekoucí vodě, konkrétně v jezerech poblíž Coldspring Harbour ve státě New York a v Michiganském jezeře (Davenport, 1900).

Od počátku, kdy byl zaznamenán výskyt tohoto druhu na více místech, bylo řešeno především lokální šíření jedinců. Jedním ze způsobů jak se *Pectintella* rozšiřuje je periodické zaplavování inundačních území řek, potoků ale i vodních nádrží (Schachanowskaja, 1929). Za nejčastější způsob disperze je však považováno šíření prostřednictvím živočichů, a to především ptáků a ryb. Tento způsob je možný v zásadě dvěma variantami, a to přichycením statoblastů na peří zejména vodních

ptáků prostřednictvím háčků, nebo ve výkalech po zkonsumování části *Pectinatella* (Massard a Geimer, 2008b).

Osburn (1921) popsal přítomnost statoblastů v obsahu žaludku různých druhů ryb demonstrovanou např. *Micropterus salmoides*, *Pomoxis annularis* nebo *Dorosoma cepedianum*. Tím, jak dochází k zvyšování rybí obsádky vodních nádrží, dochází tak i k šíření statoblastů druhu *Pectinatella magnifica* (Notteghem, 1999).

S dalšími výzkumy a zaměřením pozornosti vědecké komunity na tento konkrétní druh dochází k postupnému objevování a popisu nálezů nejen opět v severní Americe, ale také v Evropě (Balounová, et al., 2013) a také v Asii (Oda, 1974). Zajímavostí je, že doposud nebyl zaznamenán žádný výskyt druhu *Pectinatella magnifica* v tropických oblastech Afriky, jižní Asie, Austrálie nebo Oceánie.

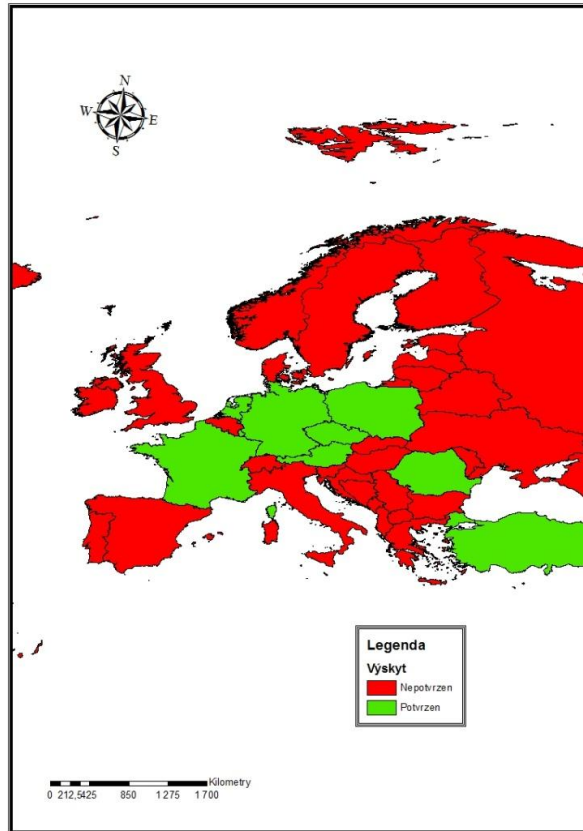
V místě původního výskytu v severní Americe je zaznamenán v posledním století masivní výskyt zejména ve vodních nádržích a řekách v Alabamě (Dendy, 1963), Ohio (Wood, 1989), Louisianě (Everitt, 1975), Texasu (Neck a Fullington, 1983), Indianě (Barnes a Lauer, 2003) nebo Michiganu (Bushnell, 1965). K šíření docházelo pravděpodobně jak výše zmíněným přenosem na tělech nebo v trávicím traktu zvířat, ale také rozsáhlou výstavbou hydrologických staveb a dalším šířením druhu v nově vzniklých umělých vodotečích (Neck a Fullington, 1983). V současnosti se tento druh podle Opravilové (2005) vyskytuje po celém území Spojených států amerických a Kanady, s výjimkou velmi chladných arktických oblastí (Everitt, 1975). Nejjižnější výskyt na území severoamerického kontinentu byl potom zaznamenán na území Floridy (Davenport, 1904) a Guatemaly (Lacourt, 1968).

V oblasti Asie byl první dokumentovaný výskyt potvrzen v Japonsku a to v roce 1974 v jezeře Shoji (Oda, 1974) a také v Koreji (Rodriguez a Vergon, 2002).

V Evropě byl, jak již bylo řečeno, první výskyt zaznamenán na lokalitě Bille poblíž v Hamburku v roce 1887 (Kraepelin, 1887). Od té doby došlo k rozšíření *Pectinatella magnifica* prakticky po celém kontinentu. Nejprve došlo k disperzi na přilehlá místa k původní lokalitě výskytu, a to v povodí řeky Labe. Konkrétně se jednalo o lokalitu Havel u Spandau a na vodní ploše Tegeler See u Berlína. Zároveň s rozšířením do těchto míst v povodí řeky Labe byl zaznamenán i výskyt v povodí

další velké Evropské řeky, a to Odry. Jednalo se o kolonie ve vodních nádržích poblíž města Wroclaw v Polsku (Hrabě, 1935).

Jeden z hlavních směrů šíření od původního místa výskytu byla severo - jižní osa, tedy dále po velkých řekách a jejich propojení. Jedná se zejména o další expanzi do Německa a Francie prostřednictvím umělého vodního kanálu spojujícího řeky Labe, Wesser, Ems a Rýn (Massard a Geimer, 2005). V roce 1994 tak byl poprvé doložen výskyt *Pectinatella magnifica* na území Francie v Canal de l'Est (Territoire de Belfort). Jedná se o spojnici kanálu Rhona – Rýn a Labe (D'hondt, 2005). Výskyt byl potvrzen v témže roce také v Haute – Saone Canal (Territoire de Belfort) a na území regionu Franche - Comté a okolních okrsků (Notteghem, 1999). O rok později se druh rozšířil do dalších lokalit zejména v údolí řeky Mosely, nejprve do vodní nádrže a poté i do pomalu tekoucích částí samotné řeky v blízkosti Nomexy a Chatel – sur – Moselle (Massard a Geimer, 2008a). Odtud pak došlo k dalšímu rozšíření do Lucemburska a dalších částí Beneluxu. V letech 1997 až 1999 byly opakovaně zaznamenány další kolonie ve vodních nádržích v blízkosti řeky Mortagne konkrétně přítoku Monseigneur, a v jezeře Sorme v Burgundsku. Na konci zmíněného období se *Pectinatella* již vyskytovala v povodích čtyř velkých Francouzských řek, a to Rhony, Saony, Loiry a Seiny (D'hondt, 2005). Zajímavostí je, že i přes poměrně rychlé šíření po velkých řekách směrem k zemím Beneluxu, první výskyt na území Nizozemí byl zaznamenán až v roce 2003 (Massard a Geimer, 2008b). V posledních letech byly kolonie potvrzeny na dalších místech v Evropě, jako jsou Vogézy v severo - východní Francii (Rodriguez a Vergon, 2002), v písčokvách na území Badenska Würtensberska (Německo), (Balounová, et al., 2013), v Rakousku (Bauer, et al., 2010), Polsku (Kraepelin, 1887), České republice (Balounová, et al., 2011; Balounová, et al., 2007), ale také ve vzdálenějších částech jižní, jihovýchodní a východní Evropy jako je Korsika (Notteghem, 1999), Rumunsko (Lacourt, 1968) nebo Turecko (Balounová, et al., 2013; Lacourt, 1968), (Obr. 2).



Obr. 2. Mapa výskytu *Pectinatella magnifica* v rámci Evropy

2.9. Rozšíření *Pectinatella magnifica* v rámci České republiky

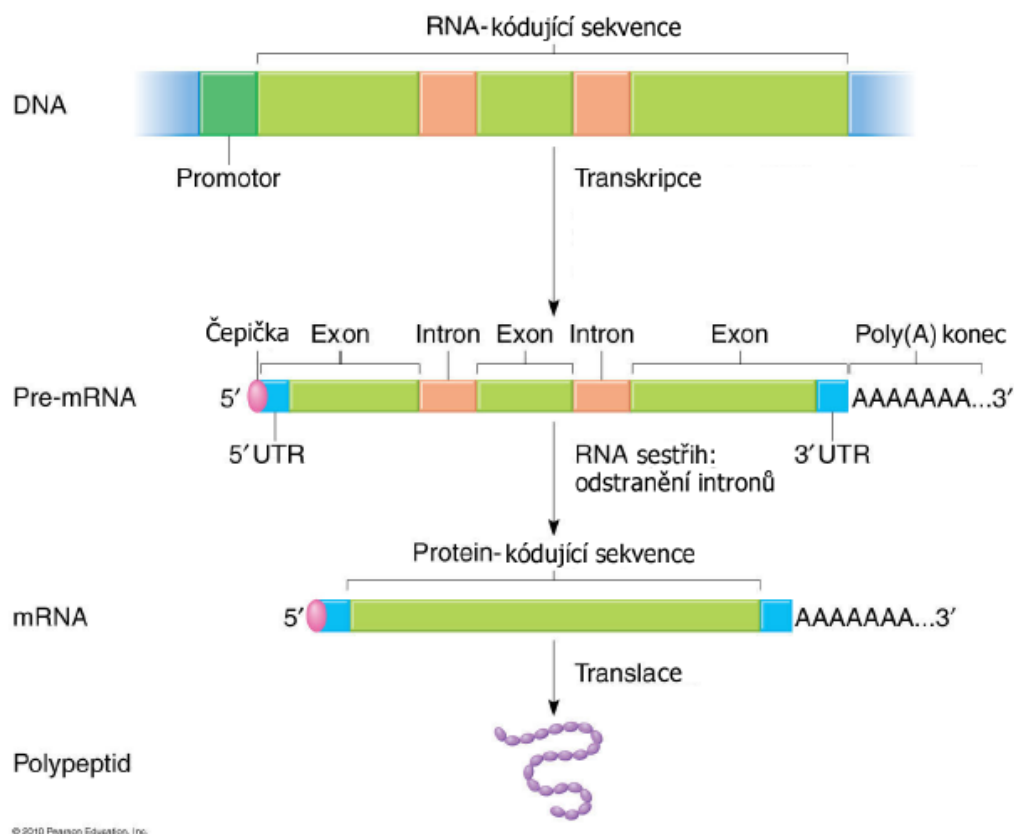
V České republice byl výskyt *Pectinatella magnifica* poprvé doložen v první polovině 20. století na několika lokalitách povodí Vltavy a Labe, přesněji v roce 1922 u Litoměřic (Schachanowskaja, 1929). Výskyt byl opakovaně potvrzován v průběhu první poloviny minulého století na různých místech zmíněných povodí (Hejsková, 1953). Na začátku 50. let 20. století byla poprvé zaznamenána na Moravě u Brna, a to na Knínečské přehradě, což znamenalo vůbec první výskyt v povodí Černého moře (Opravilová, 2005). Po tomto objevu nebyl dlouhou dobu žádný další záznam o rozšíření do nové lokality, až do 70. let 20. století, kdy byl popsán objev kolonie v nádrži Slapy a na vodní nádrži v blízkosti Jistebnice u Tábora (Šetlíková, et al., 2005). Další výskyt byl zaznamenán až v letech 2003 a 2004, kdy byla objevena v pískovných biosférické rezervace a chráněné krajinné oblasti Třeboňsko a v nádrži Želivka (Opravilová, 2005).

Významnější zprávy o nových výskytech *Pectinatella magnifica* se objevily až po roce 2003, kdy byly kolonie doloženy na pískovně Cep v blízkosti Lužnice a

hned v následujícím roce na sousední pískovně Cep II (Šetlíková, et al., 2005). Od té doby dochází k pravidelnému rozšiřování v průběhu jednotlivých let na další nádrže, jako je v roce 2005 rybník Podřezaný, 2006 rybník Hejtman a přehradní nádrže Hněvkovice a Orlík. V roce 2007 byly nové výskyty zaznamenány také na rybníku Nový Kanclíř a pískovnách Vlkov a Veselí (Balounová, et al., 2011). Krom výskytu na soustavě vodních nádrží v rámci jižních Čech, kde je šíření poměrně jednoduše vysvětlitelné díky propojení rybníčních soustav vodními cestami a také rozsáhlou těžbou písku (Balounová, et al., 2007), byl nezávisle výskyt zaznamenán u Mělníka na řece Labi a také na vodní nádrži Želivka (Šetlíková, et al., 2013).

2.10. Eukaryotní genom

Deoxyribonukleová kyselina je chemická podstata buněčné paměti a dědičnosti. Nukleové kyseliny jsou nositeli potřebných informací o struktuře, funkci a reprodukci buněk. Gen je definován jako úsek polynukleotidového řetězce, který nese informaci pro strukturu translačního produktu (strukturní gen) nebo informaci pro strukturu RNA, která translaci dále nepodléhá (Baxevanis a Ouellette, 2004). Definice genu se liší podle toho, pro jaký typ organismu je definován. U virů se jedná o úsek molekuly RNA, který nese informaci ohledně struktury polypeptidu a u eukaryot a prokaryot se jedná o úsek polynukleotidového řetězce DNA, který nese genetickou informaci pro RNA, který nepodléhá translaci (Campbell a Markl, 1997). Základní schéma přepisu DNA eukaryot je nazývána jako Centrální dogma molekulární biologie (Obr. 3).



Obr. 3 Centrální dogma molekulární biologie (Nečas, et al., 2000)

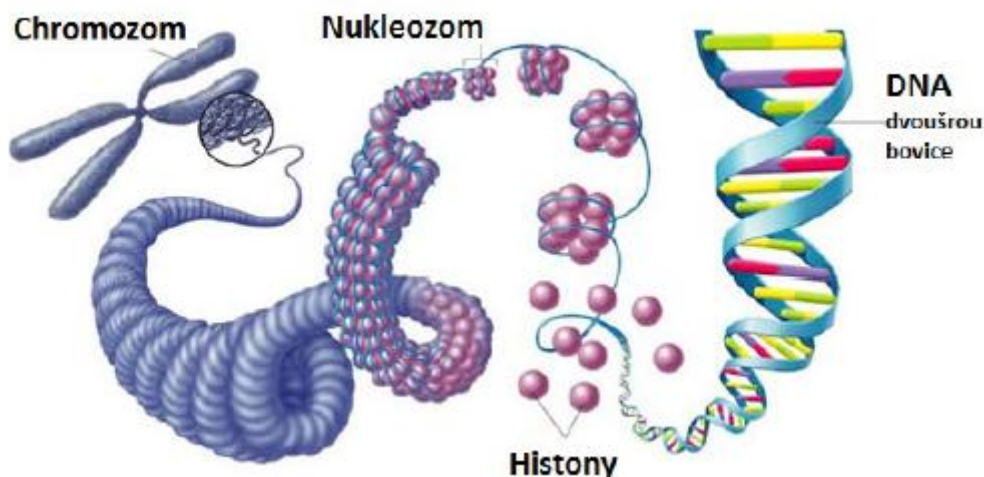
2.10.1. Velikost

Kompletní genetická informace nebo celá sekvence DNA konkrétního organismu se nazývá genom. (Peng, et al., 1994). Složitost genomu lze celkem snadno vyčíslit jakožto součet délek všech jedinečných nukleotidových sekvencí, často vyjadřovaný hodnotou velikosti haploidní sady chromozómů (Frankham, et al., 2002). Podle samotné délky/ velikosti genu v porovnání k celkové velikosti genomu je možné geny zařadit do následujících skupin (Sršeň a Sršňová, 2000):

- Malé (<10 kb)
- Středně velké (<50 kb)
- Velké (<100 kb)
- Obrovské (<2000 kb)
- Mamutí geny (>2000 kb)

Organismy jsou nositeli hned tří různých genetických výbav – jaderné (nDNA), mitochondriální (mtDNA) a chloroplastové (cpDNA), která je typická pro

rostliny (O'malley a Whetten, 1997). Nukleotidové sekvence obsahují fylogenetické a frekvenční informace a jsou tedy neobyčejně důležitými markery pro ekologické a evoluční studie (Osborn a Smith, 2005).



Obr. 4 Uspořádání eukaryotního chromozomu (Goldie's Room, 2013)

Bylo zjištěno, že genom u rostlin je vždy větší než u živočichů. Genom savců má velikost zhruba 3×10^9 párů bází, kde je zakódováno okolo 25 000 genů (Alberts, et al., 2005). Pro příklad lidský genom je tvořen 3.3 miliardami nukleotidů (Claverie, 2001). Bylo zjištěno, že vzájemně podobné organismy mohou mít vzájemně velmi nepodobné genomy. Příkladem může být genom mouchy domácí, která má 5x větší genom než octomilka (Boore, 1999).

2.10.2. Struktura genu

Genom není tvořen jednou molekulou DNA, ale je rozdělen do tzv. chromozomů (Obr. 4). Chromozom je struktura v eukaryotickém jádru buňky. Počet chromozomů je charakteristická vlastnost každého organismu. Každý z chromozomů je rozdělen do úseků DNA nazvaných geny (Gilbert a Feigon, 1999).

Genom nemůžeme chápat pouze jako kontinuální sekvenci sériového kódu pro produkci proteinu. V genomu je velké množství sekvencí, které nejsou geny, a proto nekódují proteiny. Geny v genomu připomínají jednotlivé „uzly“ s nepravidelnými intervaly různých mezer (Church a Gilbert, 1984).

U prokaryot slouží většina DNA ke genové expresi, u eukaryot má většina DNA negenovou funkci. Negenová DNA obsahuje náhodně opakující se sekvence, které mohou posloužit k identifikaci nositele (Campbell a Markl, 1997). Ani genová část DNA není úplně spojitě kódující, ale obsahuje tzv. introny. Jedná se o části, které se na genové funkci nepodílí. Kódující sekvence jsou potom označeny jako exony. Struktura nesoucí genetickou informaci v buňce je označena jako genofor. U prokaryot se jedná o jeden chromosom a plazmidy, u eukaryot se jedná o jaderné chromosomy, mimojaderné chromosomy (mitochondrie, chloroplasty) a zřídka také plazmidy (Kapitonov a Jurka, 2006).

Jaderné chromosomy jsou označeny jako jaderný genom, mimojaderné genofory jako plazmon nebo také mimojaderný (cytoplazmatický) genom. Eukaryotní chromosom je tvořen DNA navázanou na histony. Chromosom má složitou několikaúrovňovou strukturu, začínající DNA omotanou okolo diskovitých nukleosomů, jejichž řetízky tvoří chromatinová vlákna (Malone, et al., 2009). Ve vyšší struktuře vytváří smyčky, ze kterých je utvořen chromosom. Gen, který kóduje daný protein nebo RNA je umístěn na určitém chromosomu a na svém stálém místě – lokusu. Identifikací lokusů lze vytvořit chromosomovou mapu, která je u eukaryot lineární a u prokaryot kruhová (De - Vetten, et al., 1997).

Cesta od genu ke znaku je složitá. Procesy naprogramované při expresi genomu mohou být v nejrůznějších stádiích ovlivněny vnějšími faktory. Vztah mezi fenotypem a genotypem je z tohoto důvodu velmi složitý. Některé znaky jsou podmíněny pouze jediným genovým lokusem, jiné několika nebo i mnoha (Rutherford, 2003).

Při působení epistáze (funkční nadřazenosti určitých genů nad jinými), inhibice, kompenzace a dalších projevů genových interakcí se fenotypové štěpné poměry v potomstvu mění (Cordell, 2002).

Dědičná podstata jiných znaků je složitá a na jejich projevu se podílí velký počet jednotlivých genů. Takové znaky jsou označeny jako polygenní. Kvantitativní znaky mají zpravidla polygenní dědičnost. Opakem genových interakcí je pleiotropie, při které se účinky působení jednoho genu projevují v utváření dvou nebo více různých fenotypových znaků (Hentrich, 1979).

2.11. Molekulární markery

Pro zjišťování diverzity a pro identifikaci polymorfismu nukleových kyselin (zejména DNA) byla vyvinuta celá řada molekulárních technik. Většinu tzv. molekulárních markerů je možné zařadit do jedné ze tří kategorií (Awise, 1994):

a) techniky založené na hybridizaci bez PCR reakce

Jedná se o techniky představující nejstarší skupinu molekulárních markerů. Tato technika byla používána již v počátcích molekulární biologie, a to v 70. letech 20. století (Grant a Shoemaker, 1997). Dnes jsou tyto techniky nahrazovány metodami odvozenými od PCR (Gosden a Hanratty, 1993).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP analýza) je postup založený na restričním štěpení DNA, elektroforetické separaci fragmentů DNA a hybridizaci se specifickou sondou (Southernův přenos), (Awise, 1994).

b) techniky založené na PCR reakci

Tyto amplifikační metody zahrnují všechny PCR techniky, které k amplifikaci DNA produktů používají náhodné primery (Karp a Edwards, 1997). Pro všechny tyto metody není nutné znát cílové sekvence DNA fragmentů. Odlišnost jednotlivých metody je v délce a sekvenci použitých primerů, přísnosti PCR podmínek a detekcí fragmentů (Higuchi, et al., 1993).

Mezi tyto metody zařazujeme především Random Amplified Polymorphic DNA analýzu (RAPD), (Powell, et al., 1996). Technika RAPD je založena na použití primeru v podobě krátkého náhodného hexameru až dekameru a amplifikované produkty jsou separovány na agarózovém gelu a vizualizovány pod UV světlem (Lynch a Milligan, 1994). Podobnou metodou je Arbitrarily Primed PCR (AP - PCR), (Welsh, et al., 1991) nebo DNA Amplification Fingerprinting (DAF), (Chen a Rajewsky, 2006). Při těchto postupech jsou k separaci amplifikovaných produktů používány polyakrylamidové gely (Powell, et al., 1996).

Vedle RAPD analýzy existuje i druhá skupina metod, a to tzv. semiarbitrary primery (Caetano - Anollés, et al., 1991). Ty jsou komplementární k sekvencím rozpoznávaným restričními enzymy (Rademaker, et al., 1997). Primery využívající sekvence rozpoznávané restričními endonukleázami tvoří základ techniky Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), jejíž podstatou je rozštěpení

studované DNA dvěma restrikčními enzymy (Vos, et al., 1995), naligování adaptorů k odpovídajícím koncům a provedení PCR reakce s primery, které mají sekvenci komplementární k adaptoru a navíc obsahují selektivní báze (Mueller a Wolfenbarger, 1999; Powell, et al., 1996).

c) Amplifikace cílových sekvencí

U těchto metod není dostatečně znám charakter markerů z hlediska dominance a převodu alel do lokusu. Problémy jsou překonány pomocí PCR zaměřené na specifické single - lokusy, pro které je nezbytná znalost cílových sekvencí nebo sekvencí ohraničujících cílovou oblast (Karp a Edwards, 1997).

Při metodě PCR - RFLP jsou pomocí PCR amplifikované fragmenty DNA štěpeny restrikčními enzymy. To vede k odhalení polymorfismu restrikčních míst (Rademaker, et al., 1997).

Díky možnosti klonování a sekvenování lze identifikovat tandemové repetice (STMS, SSR) a navrhnout tak primery k jejich detekci. (Powell, et al., 1996). Díky vysoké proměnlivosti v těchto oblastech je tak možné identifikovat v rámci studované populace mnoho alel (Waeschenbach, et al., 2009).

Modifikační metody SSR je technika nazývaná Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Tato metoda je založena na použití PCR s primery, vytvořených z krátkých tandemových repetice (SSR), (Serra, et al., 2007). Jedná se o amplifikace vysoce polymorfni oblasti mezi samotnými tandemovými repeticemi (Abbot, 2001).

Další významnou metodou sloužící k analýze polymorfismu je studium oblasti Internal Transcribed Spacers (ITS). Jedná se o analýzu vysoce variabilních úseků rRNA, které jsou během sestřihu vystřiženy a degradovány. Úsek používaný pro analýzy je většinou kombinací ITS a části rRNA. Nejčastěji se využívá úsek 18S rRNA (pro prokaryota 16S), ITS 1, sekvence 5.8S rRNA, ITS 2 a úsek 28S rRNA (ESTEVE - ZARZOSO, et al., 1999).

2.12. Hodnocení genetické diverzity a genového toku

Pro ochranu genetické diverzity má hlavní význam výzkum vztahů mezi konkrétními jedinci založený na spolehlivém určování míry jejich příbuznosti. Můžeme tak stanovit lokální tok genů, migraci nebo populační strukturu. Tyto jevy jsou v těsném vztahu k početnosti populací a jejím změnám v čase (Kate a Laird, 1999).

Obecně rozlišujeme tři základní vrstvy biologické rozmanitosti. Jedná se o diverzitu na úrovni genů (genetická diverzita), druhů (druhovú diverzita) a ekosystémů (ekologická diverzita), (Mendel, et al., 2008).

2.13. Charakteristika a hodnocení genetické diverzity

Nejméně známým aspektem výše zmíněné biologické rozmanitosti je samotná genetická diverzita. Z tohoto důvodu je také nejméně chráněnou součástí rozmanitosti. Potřeba a důležitost ochrany genetické diverzity je zakotvena v Úmluvě o biologické rozmanitosti (1992). Genetická diverzita představuje přirozenou zásobárnu variabilních genotypů pro možné využití ve šlechtitelství a v biotechnologiích (Laikre, et al., 2009).

Zdrojem genetické rozmanitosti jsou dědičné vlohy obsažené v genotypu. Druhou složkou jsou faktory prostředí, které se podílí na fenotypovém projevu vnějších znaků. Oba dva projevy od sebe nelze jednoznačně oddělit (Roudná a Dotlačil, 2007).

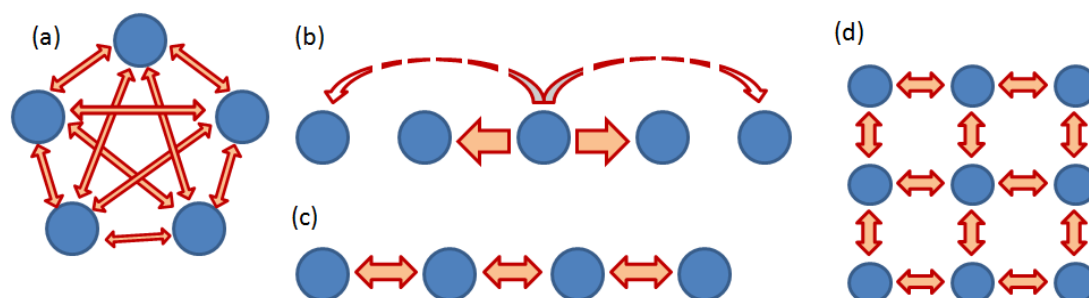
Pro přežití jednotlivých populací a druhů je velmi nutná schopnost adaptovat se novým podmínkám prostředí. Nezbytným předpokladem adaptivní odpovědi je genetická variabilita. Jakékoliv narušení této variability jednoznačně snižuje schopnost populace přizpůsobit se novým podmínkám. Genetická diverzita tak vytváří základnu pro vyšší úroveň biodiverzity (Laikre, et al., 2009).

Ztráta genetické diverzity je mnohem nebezpečnější pro malé populace, kde dochází častěji např. k příbuzenskému křížení (Kate a Laird, 1999).

Genetická diverzita je v přírodě uspořádána hierarchicky. Na nejvyšší úrovni leží diverzita jednotlivých populací, druhů či vyšších taxonů. Na nižší úrovni stojí potom mezipopulační vnitrodruhovú rozdíly označované také jako populační struktura v rámci druhu (Rasmusson a Phillips, 1997). Na ještě nižší úrovni potom nalézáme genetickou diverzitu v rámci populace. Pro její ochranu má hlavní význam výzkum vztahů mezi konkrétními jedinci. Můžeme tak stanovit lokální tok genů, migraci nebo populační strukturu. V praxi slouží individuální úroveň genetické diverzity na příklad pro zjištění příbuzenských vztahů v jednotlivých skupinách a populacích nebo pro zjištění podstaty rozmnožovací strategie (Kate a Laird, 1999).

2.14. Charakteristika genového toku

Hlavní mechanismy evoluce v populacích jsou mutace, genový tok (tj. rekombinace, migrace), selekce a genetický drift. Ve velkých populacích jsou určující první tři mechanismy, zatímco v malých populacích je patrný výrazný vliv náhodných efektů genetického driftu (Obr. 5). Populace s malou početností bývají často postiženy ztrátou genetické variability, příbuzenským křížením nebo akumulací škodlivých mutací (Chèvre, et al., 1997).



Obr. 5 Modely genového toku: (a) ostrovní model, (b) isolation - by - distance model, (c) jednorozměrný stepping - stone model, (d) dvourozměrný stepping - stone model - čtvercové uspořádání subpopulací (The American Phytopathological Society, 2015)

Genový tok je termín označující jakýkoliv proces, který vede k předávání genetického materiálu mezi populacemi (Slatkin, 1985). Genový tok je šíření určitých alel v rámci populace či mezi populacemi vyplývající z outbreedingu. Je to zároveň důležitý faktor evoluce (Hudson, et al., 1992). Významně ovlivňuje genetickou strukturu populací. Pomocí genového toku jsou také stírány rozdíly v alelových frekvencích mezi odlišnými subpopulacemi. Jak již bylo zmíněno, omezuje se tak jejich schopnost adaptovat se na lokální podmínky a zabraňuje tak diferenciaci subpopulací (Slatkin, 1987).

Zatímco genový tok vede k homogenizaci populací, selekce a genetický drift vede k diferenciaci populací. Genetický drift, jinak označovaný jako genetický posun, představuje náhodné fluktuace ve frekvencích jednotlivých alel v genofondu určité populace (Hartl a Clark, 1997).

Genetický drift plyne z náhodného výběru gamet při pohlavním rozmnožování (Slatkin, 1977). Dojde - li při fluktuaci početnosti populace k náhlému

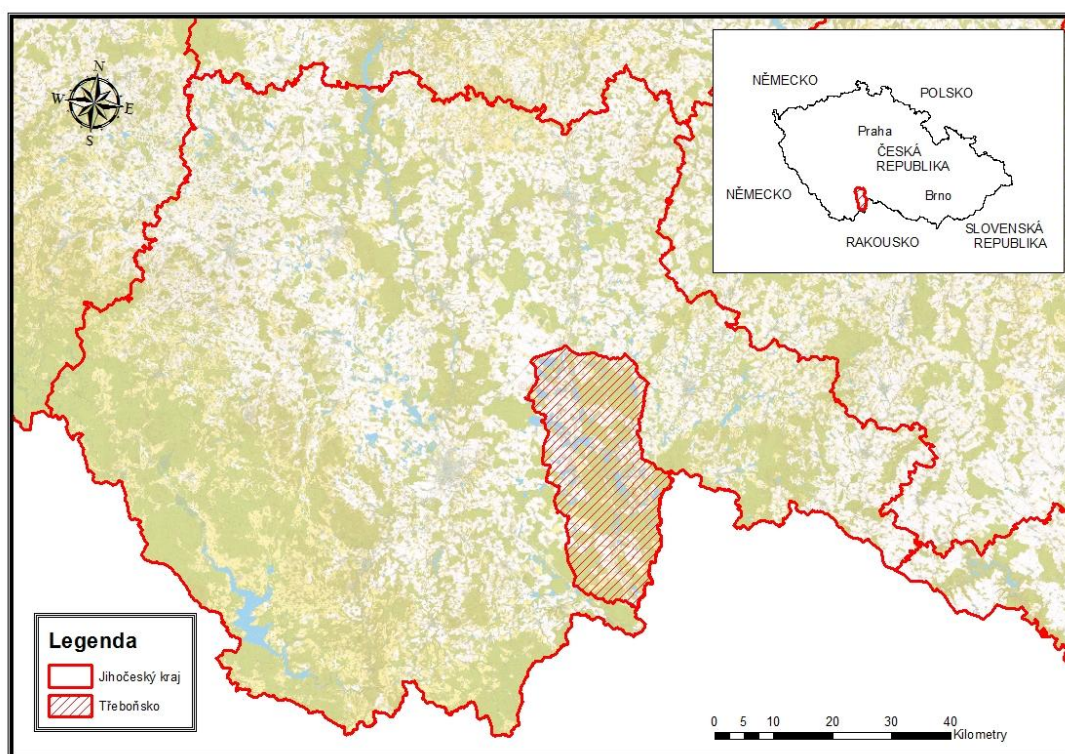
a výraznému poklesu početnosti, je tento jev označen jako tzv. populační nebo genetický bottleneck, nebo také „bottleneck effect“ (Nei, et al., 1975). Zvláštním případem bottlenecku je tzv. efekt zakladatele – „founder effect“. Jedná se o založení nové populace z malého počtu jedinců (Ladizinsky, 1985).

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit genetickou diverzitu u jednotlivých kolonií bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*) Leidy (1851) na území CHKO a BR Třeboňsko.

4. METODIKA

Studovaný materiál pocházel z Chráněné krajinné oblasti Třeboňsko (Obr. 6).



Obr. 6 Lokalizace zájmového území Třeboňsko v rámci Jihočeského kraje a České republiky

Oblast Třeboňska se nachází v Jihočeském kraji, na území okresu Jindřichův Hradec. Lokalita je tvořena souvislým územím táhnoucím se v severo - jižním směru od hranic s Rakouskem až po Veselí nad Lužnicí.

V rámci této lokality byla vybrána místa, která jsou dlouhodobě sledována Katedrou biologických disciplín. Jedná se o několik transektů na těžební lokalitě pískovny Cep I. a Veselí I. a vodních nádrží Hejtman, Nový Lipnický (Podřezaný), Staňkovský a Vlkov. (Příloha: Obrázek 26)

4.1. Popis území

V následujících kapitolách budou shrnuty základní charakteristiky zájmové lokality Chráněné krajinné oblasti Třeboňsko. Výměra celé této Chráněné krajinné oblasti je 687,7 km².

4.1.1. Klima

Z hlediska klimatické klasifikace dle Quitta (1971) patří většina území Třeboňska do mírně teplé a mírně vlhké oblasti s mírnou zimou, do oblastí MT4, MT7, MT9, MT10 a MT 11 (Příloha: Obrázek 17).

Průměrná roční teplota ve střední části území (Třeboň) je 8°C, průměrná teplota ledna je - 2 až - 4 °C a průměrná teplota července 16 až 18°C. Průměrné množství srážek v průběhu vegetačního období je 350 - 450 mm a v zimním období 200 - 300 mm. Průměrná délka trvání souvislé sněhové pokrývky je 50 - 60 dní s maximem 20 - 30 cm. V průběhu roku je zaznamenáno v průměru 40 - 50 jasných dnů, kdy oblačnost pokrývá méně jak 20% oblohy. Přebývá zde západní a jihovýchodní proudění větru. Celkově je klima této oblasti do určité míry specifické, a to především z důvodu geomorfologie oblasti a velkým zastoupením vodních ploch. Častý je výskyt přivalových srážek v letním období. Pro Třeboňskou pánev je charakteristický častý výskyt inverzních situací s bezvětřím, které ale neovlivňují příliš znečištění ovzduší, protože v oblasti se nevyskytuje velké množství zdrojů emisí.

4.1.2. Geologie

Geologický podklad Třeboňska je tvořen horninami moldanubika. Na tomto území se vyskytují metamorfované horniny v podobě pararuly a migmatitů předprvohorního stáří a granitoidy, jako jsou žuly a granodiority, moldanubického plutonu prvohorního stáří. Třeboňská pánev je pak vyplněna sedimenty druhohorní svrchní křídly a třetihorního neogénu s mělkovodními jezerně - říčními sedimenty. Svrchnokřídlová sedimentace, představovaná především klikovským souvrstvím. Jedná se o nejrozsáhlejší a nejmocnější výplň Třeboňské pánve s mocností až 300 m. Sedimenty jsou tvořeny barevnými pískovci, slepenci, jílovci, prachovci, jíly a písky různé zrnitosti a různého stupně zpevnění. V menší části Třeboňska jsou povrchovou vrstvou neogenní sedimenty lipnického, domanínského a ledenického souvrství v podobě jílu, písků, diatomitů a křemenců. Kvartérní usazeniny jsou potom zastoupeny až 30 m mocnou vrstvou pleistocenních říčních písků a štěrků na říčních terasách Lužnice a Nežárky, které jsou dnes především předmětem těžby na dobývacích prostorech Veselí nad Lužnicí, Cep, Tuš, Horusice, Novosedly nad Nežárkou, Stráž nad Nežárkou, Pístina a Krabonoš. Důležitou součástí geologické struktury jsou také holocenní sedimenty tedy nejmladší vrstvy fluviálních štěrků a písků, nivní a svahové hlíny, sedimenty vodních nádrží, kyselá slatiny a oligotrofní rašeliny. Důležitý je také výskyt vátých písků vzniklých zřejmě koncem posledního glaciálu či v postglaciálu na říčních terasách v pásu od Majdaleny k Veselí nad Lužnicí (Vlkova, Slepíčí vršek u Lužnice).

Samostatnou formou jsou potom rašelinisté přechodového typu nebo submontánního vrchovištního typu z konce posledního glaciálu v místech s příhodnou konfigurací terénu a málo propustným podložím. Nejrozsáhlejší rašelinisté jsou v těsné blízkosti Třeboně, Šalmanovic, Hrdlořez, Mirochova a v blízkosti Záblatského a Horusického rybníka (Příloha: Obrázek 19).

Údaje byly převzaty ze Svoboda (1964).

4.1.3. Geomorfologie

Území Třeboňska spadá podle geomorfologického členění Demek (1965) do provincie Česká vysočina a Českomoravské soustavy, na kterou na jižní straně navazuje Šumavská soustava. Většina území potom patří do oblasti Jihočeských

pánvi, do celku Třeboňská pánev. V západní části Třeboňská pánev přechází v plochý reliéf podcelku Lomnické pánve a ve východní části ve zvlněný reliéf Kardašorečické pahorkatiny. Třeboňská pánev má mírný sklon od jihu k severu. Od níže položené pánve Českobudějovické ji odděluje vyvýšený Lišovský práh. Nadmořská výška území se pohybuje od 421 do 550 m n. m. Část na východ od toku řeky Lužnice potom náleží k celku Javořické vrchoviny (Příloha: Obrázek 18)

4.1.4. Pedologie

V rámci Čech je Třeboňsko unikátní tím, že se jedná o nejrozsáhlejší území, kde se jako půdotvorný substrát uplatňují především nezpevněné předkvartérní sedimenty. Třeboňsko je největší souvislou plochou pokrytou pseudogleji a gleji v Čechách. Nejpočetnější jsou také organogenní rašelinné půdy. Častou jsou zde také zastoupeny kambizemě, a to v poměrně nízkých nadmořských výškách. Pro toto území je také typický výskyt extrémně lehkých půd na písčitém podloží. Půdy jsou již od počátku výrazně oligotrofní s velmi nízkým obsahem živin, tedy nevhodné pro zemědělskou činnost. Nízká přirozená úrodnost písčiny, jílovitých a rašelinných půd nepříliš vhodných pro zemědělské využití je také příčinou toho, proč na Třeboňsku zůstaly až do dnešní doby zachovány v rovinaté krajině v relativně nízké nadmořské výšce rozsáhlé souvislé lesní celky i rybníční soustavy (Příloha: Obrázek 20).

Údaje poskytl Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy Praha, v. v. i..

4.1.5. Hydrologie

Přirozenou páteřní vodotečí odvodňující podstatnou část Třeboňské pánve je řeka Lužnice. Délka toku na území Třeboňska je 75 km, z nichž podstatná část je v podobě přirozených meandrů s více než 500 trvale zavodněnými tůňemi a odstavenými meandry.

Druhým významným tokem je řeka Nežárka, protékající severovýchodním Třeboňskem v délce 34 km. Z menších vodních toků stojí za zmínku potoky Dračice a Koštěnický potok. Vedle přirozených vodotečí jsou pro tuto oblast typické umělé

vytvořené soustavy kanálů a stok. Nejvýznamnější z nich jsou Nová řeka (13,5 km) a Zlatá stoka (47 km), (Příloha: Obrázek 22).

Typický ráz krajiny je tvořen především malými vodními nádržemi v podobě 465 rybníků o celkové rozloze 7484 ha, z nichž největší je Rožmberk s rozlohou 658 ha (plocha výtopy 489 ha). Dalšími významnými rybníky jsou Horusický velký, Zábalský, Svět, Opatovický, Kaňov, Velký Tisý, Hejtman, Staňkovský apod. Celkem jsou rybníky propojeny do 16 rybníčních soustav (např. Nadějská, Chlumecká atd.). Původ většiny z nádrží je v 16. století u významných rybníkářů Štěpánka Netolického, Jakuba Krčina z Jelčan a Sedlčan nebo Mikuláše Rutharda z Malešova. Vzhledem k vysoké intenzitě hospodaření se jejich úživnost v průběhu století změnila z přirozeně oligotrofní na převážně eutrofní až hypertrofní (Heřmanová, 2012), (Hule, 2003), (Příloha: Obrázek 21).

Západní část Třeboňska je od roku 1982 vyhlášena jako Chráněná oblast přirozené akumulace vod (CHOPAV) Třeboňská pánev s hlavním účelem ochránit významné zdroje podzemních vod. Na základě hydrogeologických průzkumů je předpokládáno využitelné množství podzemní vody na úrovni 900 až 1000 l.s⁻¹. Tato voda je využita z části vodárensky (Příloha: Obrázek 23).

Údaje poskytl Výzkumný ústav vodohospodářský, Praha a dále byly údaje převzaty z Tlapák, et al. (1992).

4.1.6. Flora a fauna

Třeboňsko patří k oblasti botanicky velmi pestré a zároveň zde také nalezneme celou řadu vzácných jedinců. Z ohrožených rostlin je zde zastoupeno 400 druhů, z toho 104 chráněných (34 kriticky ohrožených, 34 silně ohrožených a 35 ohrožených). Vegetaci Třeboňska utváří z větší části lesní komplexy. Jedná se většinou o luhy a olšiny, bikové bučiny, acidofilní doubravy a acidofilní bory. Tyto rozsáhlé jehličnaté a listnaté lesy jsou velmi cenné a nalezneme v nich řadu místních variant běžných druhů. Vzácné jsou také velmi rozmanité květnaté a rašelinné louky s ostřicové porosty kde se nachází řada rostlin se světově i Evropsky vzácnými izolovanými nalezišti. Typickou částí krajiny jsou také vrchoviště a přechodová rašeliniště. Pro Třeboňsko je typická také druhová pestrost rostlin vázaných na vodní prostředí. V dnešní době jsou ale některé druhy ohroženy změnami trofických stupňů

z původních dystrofních a oligotrofních vod na stávající mezotrofní až eutrofní. Zajímavá je rovněž i flora suchých písčin a vátých písků.

Stejně jak je rozmanitá krajina Třeboňska tak je rozmanité i druhové složení fauny. Tato diverzita se projevuje především v zastoupení společenstev bezobratlých živočichů. Fauna obratlovců je spojena s bohatstvím druhů vázaných na různé typy mokřadních biotopů a biotopů lesních. Nejvýznamnější skupinou obratlovců Třeboňska jsou ptáci. Byl zde doložen výskyt 277 druhů ptáků, z nichž 182 druhů zde hnízdí nebo hnízdilo. Další desítky druhů zde mají pravidelnou migrační zastávku nebo zimoviště. Nejtypičtější pro tuto oblast jsou vodní a mokřadní ptáci. Na Třeboňsku byl prokázán výskyt přibližně padesáti druhů savců. Většinou jsou to druhy více či méně hojné po celém území ČR. Za významný druh je možno považovat především celoevropsky ohroženou vydru říční (*Lutra lutra*).

Údaje byly převzaty z Neuhäuslová (1998), Pokorný a Kučerová (2000) a Culek a Grulich (2010) a dále byly poskytnuty Agenturou ochrany přírody a krajiny v Českých Budějovicích a Správou Chráněné krajinné oblasti Třeboňsko.

4.1.7. Zemědělství

Jak již bylo výše zmíněno, nebylo zemědělství na Třeboňsku nikdy dominantním způsobem využití s výjimkou severovýchodních oblastí s lepší úrodností půd. Ráz krajiny byl pozměněn především výstavbou umělých vodních nádrží a toků. Obyvatelstvo se živilo hlavně těžbou dřeva a rašeliny, drobnou řemeslnou výrobou a pastevectvím. Zemědělské půdy zaujímají přibližně 30% rozlohy území Třeboňska a převládají hlavně louky a pastviny.

Pro tento kraj došlo k podstatné změně až v době Karla IV., kdy se začaly zakládat v této ploše první rybníky, a to Bošilecký z roku 1355 a Dvořiště z roku 1367. Hlavní rozkvět této oblasti byl zaznamenán v 16. století za Štěpánka Netolického, který zavedl do rybníkářské praxe řád a začal budovat první ucelené rybníční soustavy. Největší rybníční díla, která nechal vystavět, byla v roce 1520 stavba Zlaté stoky a rybníky Horusický, Káňov nebo Opatovický. Jeho současníkem byl také Mikuláš Ruthard z Malešova, který je autorem soustavy velkých rybníků okolo Chlumu u Třeboně. Jejich pokračovatelem byl Jakub Krčín z Jelčan a Sedlčan, který převzal zavedené hospodářství a soustavu doplnil o velké rybníky jako je Svět

a především Rožmberk. Navíc zajistil odvod povodňových vod z Lužnice do Nežárky prostřednictvím uměle vystavěné Nové řeky. Rybníkářská praxe v této oblasti byla vždy výnosnou hospodářskou aktivitou, a proto zde nebyly rybníky, jako v jiných částech republiky, zrušeny v průběhu 17. století. V současné době tvoří vodní plochy více jak 10% rozlohy území Třeboňska, a to prostřednictvím 16 soustav v povodí Lužnice a Nežárky.

Údaje byly převzaty z Pokorný a Kučerová (2000).

4.1.8. Hospodářství

Významným odvětvím hospodářské činnosti je již dlouhodobě také velkoplošná těžba šterkopísků v nivách Lužnice a Nežárky na třinácti dobývacích prostorech s různým stupněm vytěžení a u některých těžebních prostorů v různé fázi rekultivace. V omezené míře zde dochází také k průmyslové těžbě rašeliny a jejím hlavním odběratelem jsou místní lázeňské provozy.

Z dalších hospodářských odvětví je na Třeboňsku dlouhodobě tradiční pivovarnictví, zpracování dřeva, textilní výroba a výroba prefabrikátů a stavebních hmot. Je zde samozřejmě obnovena i tradiční řemeslná lidová malovýroba. Významným odvětvím je potom již dlouhodobě turistický ruch a tradiční lázeňství.

Údaje byly převzaty z Jeřábek (1999)

4.1.9. Ochrana území

Celá oblast Třeboňska byla vyhlášena dne 15. listopadu 1979 Chráněnou krajinnou oblastí. Pro svou unikátnost a nesporné přírodní i kulturní hodnoty je Třeboňsko rovněž od roku 1977 jednou z šesti biosférických rezervací na území České republiky vyhlášených v rámci programu Člověk a biosféra UNESCO. Krom této velkoplošné ochrany je od roku 1990 reprezentativní část rybníků a mokřadních ekosystémů uvnitř chráněné krajinné oblasti zapsána jako mokřad mezinárodního významu podle Ramsarské konvence pod označením Třeboňské rybníky a Třeboňská rašeliniště.

Další významný ochranný statut mají dílčí území vyhlášených a navržených maloplošných chráněných území. Nejcennější části Třeboňska jsou chráněny v 31

přírodních rezervacích a památkách. Z toho jsou 4 v nejvyšší kategorii národní přírodní rezervace, dále zde existují 2 národní přírodní památky, 18 přírodních rezervací a 6 přírodních památek.

V rámci Třeboňska jsou vymezena rovněž tři nadregionální biocentra ÚSES České republiky, velká část oblasti tvoří jádrové území evropské ekologické sítě EECONET.

Na území Třeboňska je rovněž vyhlášeno 231 památných stromů, z toho 216 dubů, 12 lip, 1 buk, 1 jilm a 1 hrušeň. Většina stromů se nachází ve třech památných alejích a jedné skupině stromů, 36 stromů roste jednotlivě.

V rámci propojení legislativy České republiky a Evropské unie bylo v rámci Třeboňska vyhlášeno větší množství lokalit pod ochranou NATURA 2000. Důležitá pro oblast Třeboňska je také velká rozmanitost ptačí populace a rovněž fakt, že je důležitou tahovou zastávkou při migracích ptáků mezi severem a jihem Evropy. Ptačí oblast Třeboňsko se rozprostírá především v centrální a severní části lokality Třeboňska (Příloha: Obrázek 24). Vedle ptačí oblasti bylo na Třeboňsku vyhlášeno 17 evropsky významných lokalit v rámci území sítě NATURA 2000. Vzhledem k plošnému výskytu prioritních druhů (vydra říční, orl mořský) i některých evropsky významných stanovišť (rašeliniště a rašelinné lesy) pokrývá chráněná soustava NATURA 2000 velkou část lokality (Tab. 1; Příloha: Obrázek 25).

Tab. 1 Přehled evropsky významných lokalit v CHKO Třeboňsko

| | | |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1. Cepská pískovna a okolí | 2. Červené blato | 3. Hliníř – Ponědrážka |
| 4. Lomnický velký rybník | 5. Lužnice a Nežárka | 6. Malý Horusický rybník |
| 7. Nadějská soustava | 8. Ruda | 9. Třeboň |
| 10. Písečný přesyp u Vlkova | 11. Široké blato | 12. Štičí rybník |
| 13. Purkrabský rybník a Točnick | 14. Třeboňsko - střed | 15. Velký a Malý Tisý |
| 16. Žofínka | 17. Žofína Hut' | |

Údaje poskytla Agentura ochrany přírody a krajiny v Českých Budějovicích a Správa Chráněné krajinné oblasti Třeboňsko.

4.2. Materiál

Pro porovnání genetické diverzity kolonií odebraných na území České republiky byl použit i vzdálený vzorek kolonií odebraných na západě USA ve státě Oregon. Z odebraných kolonií byly za účelem izolace DNA použity zooidy a statoblasty (Tab. 3).

K optimalizaci vhodné metody izolace byly použity vzorky zooidů a statoblastů (Testovací – Tab. 2); a. čerstvě odebrané a skladované v - 20°C; b. vzorky odebrané do 96% etanolu a uchované v 4°C. Dále byl použit lyofilizovaný vzorek zooidů a statoblastů odebraný na území USA.

Tab. 2 Testovací vzorky pro optimalizaci izolace DNA

| Způsob odběru | Název | Zooid | Statoblast |
|---------------|-----------|-------|------------|
| Voda | Testovací | X | X |
| Etanol 96% | Testovací | X | X |

Tab. 3 Vzorky kolonií *Pectinatella magnifica*

| Způsob odběru | Název/lokalit a odběru | Rok odběru | Zooid | Statoblast | Poznámky |
|---------------|------------------------|------------|-------|------------|--|
| Lyofilizát | USA | 2013 | X | X | Použit směsný vzorek |
| Voda | Vlkov | 2009 | X | X | Zooid rozpadlý, nelze s jistotou určit |
| Etanol 96% | Nový Kanclíř | 2014 | X | X | |

| | | | | | |
|--|-------------------------|------|---|---|------------------------------------|
| | Cep | 2014 | X | X | |
| | Podřezaný | 2014 | X | - | Nezralá kolonie bez statoblastů |
| | ejtman | 2014 | X | X | |
| | Veselí | 2014 | X | X | |
| | 1/1B / Hejtman | 2011 | X | X | |
| | 4/3B / Staňkovský | 2011 | X | X | |
| | 2/1B / Staňkovský | 2012 | X | X | |
| | 3/3B / Nový Kancelář | 2012 | X | X | |
| | 4/1B /Staňkovský | 2012 | X | X | |
| | 3/2B / Nový Kancelář | 2012 | X | X | |
| | 4/2B / Staňkovský | 2012 | X | X | |
| | 4/5B / Staňkovský | 2012 | X | X | |
| | 4/6B / Staňkovský | 2012 | X | X | |

| | | | | | |
|--|-------------------|------|---|---|------------------------------------|
| | Nový Kanclíř 1 | 2012 | X | X | |
| | Nový Kanclíř 2 | 2012 | X | X | |
| | Nový Kanclíř 3 | 2012 | X | X | |
| | Veselí I. 4 | 2012 | X | X | |
| | Veselí I. 5 | 2012 | X | X | |
| | Veselí I. 6 | 2012 | X | X | |
| | Veselí I. 2Tr. | 2012 | X | X | |
| | Veselí I | 2012 | X | - | Nezralá kolonie bez statoblastů |
| | Veselí I. 3Tr. | 2012 | X | - | Nezralá kolonie bez statoblastů |
| | Veselí I. 5Tr. | 2012 | X | X | |
| | Veselí I. 3Tr. | 2012 | X | X | |
| | Veselí I. 4Tr. | 2012 | X | X | |

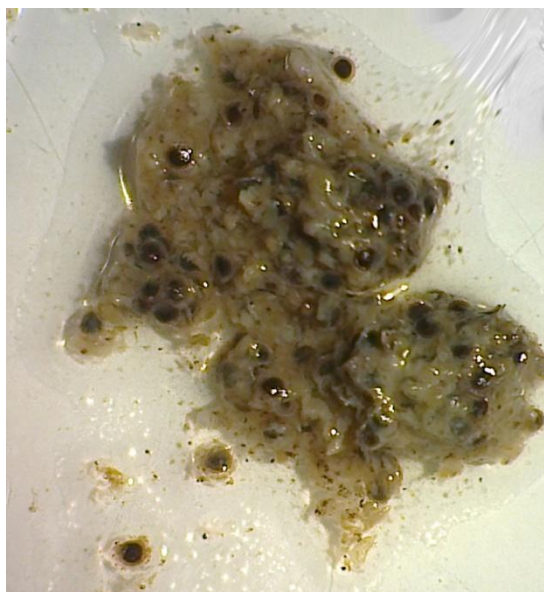
4.3. Metody

4.3.1. Metoda odběru *Pectinatella magnifica*

Na vybraných lokalitách bylo vytipováno 2 - 8 transektů na základě velikosti lokality a přístupu k vodě. Tyto transekty se táhly 10 metrů podle pobřeží a zasahovaly zhruba 2 metry do vody, tato vzdálenost byla hodně ovlivněna rozsahem pobřežních porostů. Na zvolených úsecích byly sesbírány všechny kolonie *Pectinatella* z potopených větví vrb a jiných příbřežních rostlin, potopených ulámaných větví a kamenů, za účelem komplexního zhodnocení výskytu *Pectinatella magnifica*. Z nasbíraných kolonií byly náhodně odebrány vzorky kolonií zooidů se statoblasty k DNA analýzám. Vzorky byly odebírány do falkonek o objemu 50ml naplněných do poloviny 96% etanolem. Samotný odběr vzorku proběhl seškrábnutím povrchové vrstvy kolonie (Obr. 7). Při odběru vzorku bylo třeba dbát na to, aby obsahoval co nejmenší množství gelovité matrix, produkované koloniemi (Obr. 8). Odebrané vzorky byly uskladněny podle typu odběru při 4°C nebo při - 20°C.



Obr. 7 Odběr kolonií *Pectinatella magnifica*; Foto: Josef Rajchard



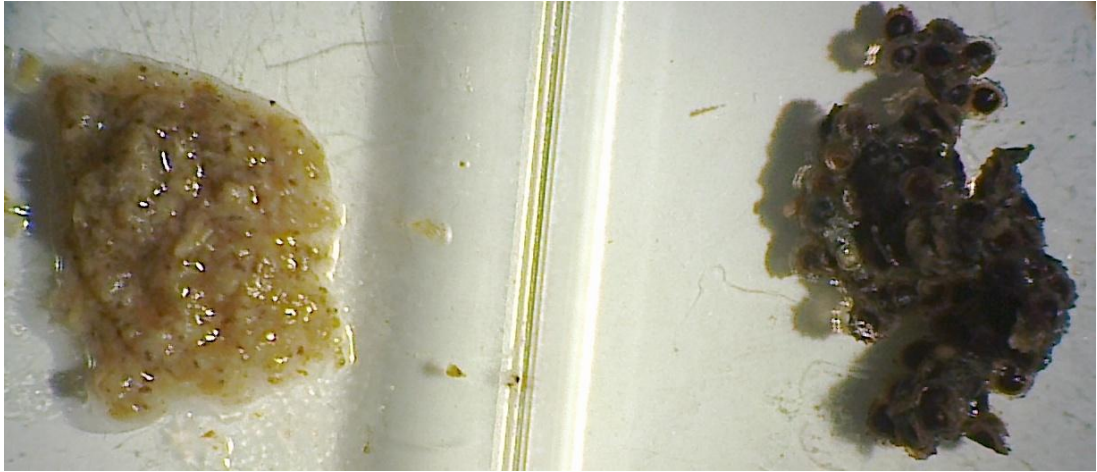
Obr. 8 Odebraná kolonie *Pectinatella magnifica*; Foto: Vendula Moravcová

4.3.2. Zpracování vzorků

Před izolací DNA byly odebrané vzorky rozděleny následovně (Obr. 9):

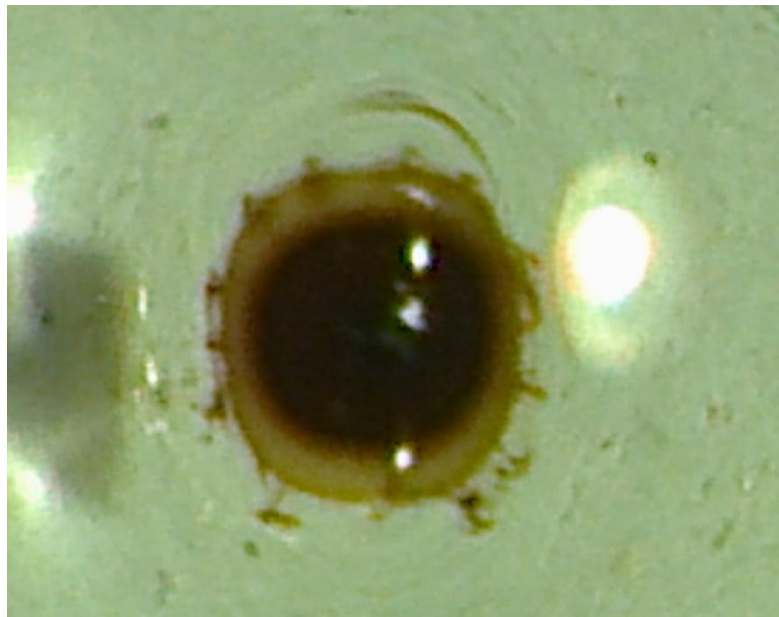
1. vzorky odebrané do H₂O
 - 1.1. statoblasty
 - 1.2. zooidy
2. Vzorky odebrané do Etanolu
 - 2.1. statoblasty
 - 2.2. zooidy

Pro samotnou přípravu jednotlivých typů vzorků byla odebraná část *P. magnifica* z dané lokality přenesena na Petriho misku. Ke vzorku byl přidán 96% etanol a pod binokulární lupou byly odebrány do 1,5 ml mikrozkušavky s 96% etanolem jednotlivé zooidy.



Obr. 9 Příprava vzorků; Foto: Vendula Moravcová

Vypreparované statoblasty byly pomocí etanolu a jemného štětečku opatrně očištěny od zbytků gelovité matrix, částí statoblastů, řas, sinic a dalších příměsí a nečistot, které by mohly způsobit kontaminaci cizorodou DNA (Obr. 10). Po očištění byly přeneseny do samostatné 1,5 ml mikrozskumavky s etanolem.



Obr. 10 Očištěný statoblast; Foto: Vendula Moravcová

V případě vzorků odebraných bez fixace etanolem byla při separaci, čištění a uchování použita destilovaná voda a vzorky následně skladovány při -20°C .

V případech výskytu mladých kolonií bez vyvinutých statoblastů, byla odebrána pouze kolonie zooidů očištěná od gelovité matrix a výrazných nečistot.

4.3.3. Optimalizace techniky izolace DNA

V rámci optimalizace metody izolace vzorků bochnatky americké byly použity vzorky zooidů a statoblastů, odebraných jak v čerstvém stavu s následným uchováváním při - 20°C, tak fixovaných v 96% etanolu s teplotou uchovávání 4°C. Byla otestována izolace pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini (QIAGEN), kitu Nucleo Spin (Marcherey - Nagel) a izolace pomocí CTAB. Během jednotlivých izolací byly testovány dostupné modifikace za účelem zjištění vhodného způsobu izolace, za účelem získání co nejvyšší kvality a množství vyizolované DNA. Tyto metody byly: izolace z čistých kolonií nebo přidání jemného mořského písku k izolovaným koloniím. Také byly testovány různé navážky zooidů a statoblastů. Tyto hodnoty se pohybovaly od tří statoblastů (cca 0,1mg) a k tomu odpovídající množství zooidů, až po přibližně patnáct statoblastů (0,7mg) a opět odpovídající množství zooidů.

V případě izolačních kitů byly použity postupy uvedené výrobcem (Příloha: Obrázek 14, 15). U izolačního kitu Nucleo - Spin byl pro použitý vzorek zvolen jako nejvhodnější izolační protokol Plant II (Příloha: Obrázek 15). Zároveň byl testován rozdíl mezi izolačními pufrů PL 1 a PL 2, dodávanými firmou a nabízenými jako možnost ke zvolenému protokolu.

Pro izolaci pomocí CTAB byl použit protokol pro izolaci DNA pomocí CTAB - PVP (Čurn, et al., 2012) zpracovaný na KRV ZF JCU. Zde bylo otestováno více možností navážky, za účelem největšího výtěžku DNA o co nejlepší čistotě. DNA získaná izolací byla rozpuštěna a uchována v TE pufru. Množství pufru bylo určeno podle množství použitých statoblastů a zooidů, a zároveň podle velikosti peletu získaného poslední centrifugací a následným vysušením izolovaných vzorků. Objem přidaného TE byl 50, 75 nebo 100 μ l podle množství získané DNA. Množství přidaného pufru bylo určeno podle počáteční navážky vzorků. Pro navážku 0,1 - 0,2mg (odpovídá přibližně 3 - 5 statoblastům) bylo použito 50 μ l, pro 0,3 - 0,5 mg (cca 6 - 10 statoblastů) 75 μ l a pro 0,6 - 0,7 mg (cca 11 - 15 statoblastů) 100 μ l TE pufru.

Návod na přípravu TE pufru, CTAB a T01E pufru byl získán z (<http://botanika.prf.jcu.cz/>).

4.3.4. Analýza izolované DNA

Kvalita a množství získané DNA byla ověřena pomocí spektrofotometru BioSpec Nano. Jako slepý vzorek byl použit vždy pufr sloužící k rozmíchání získané DNA podle typu provedené metody izolace. Vzhledem k množství nanášeného vzorku (2 µl) bylo nutné věnovat maximální pozornost jak při přípravě vlastního vzorku, tak při samotném nanášení (přesné pipetování a zabránění kontaktu mezi měřicím prostorem a špičkou pipety). Koncentrace DNA byla zaznamenána v jednotkách ng/µl, k posouzení čistoty DNA byly použity poměry absorbancí 260/280 a 260/230.

Získaná DNA byla testována pomocí specifických primerů pro *P.m.*, amplifikujících část úseku 28S rRNA genu. Primery byly navrženy z kontigu dostupných sekvencí z GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), (tabulka 4).

Tab. 4 Specifické primery pro *Pectinatella magnifica*

| Název primeru | Sekvence (5' - 3') | GenBank |
|---------------|----------------------|------------|
| 28S – F | CTTTTCAGCCAAGCACATGA | FJ409576.1 |
| 28S – R | AAACCTCGCGTAGAGCAAAA | FJ196151.1 |

Specifické primery byly použity pro amplifikaci vzorků při PCR.

- PCR mix (na vzorek):
- 10 µl 2 x Master Mix (1 x)
- 7 µl PCR H₂O
- 1 µl primeru 28 S – F (0,5 µM)
- 1 µl primeru 28 S – R (0,5 µM)
- 1 µl DNA (~3ng)

Nastavení PCR pro 28 S:

1. 95°C 5 min.
 2. 95°C 30 sek.
 3. 60°C 1 min.
 4. 72°C 1,5 min.
 5. 72°C 10 min.
 6. 4°C ∞
- } 35 x

Pro samotnou analýzu genetické diverzity *Pectinatella magnifica* na území Třeboňska byla zvolena metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Tato metoda byla vybrána pro citlivost odlišit i dva jedince jednoho druhu i u organismů s dosud nezmapovaným genomem. Zároveň se jedná o metodu, s jejíž pomocí je možné získat výsledky o studovaném genomu relativně rychle.

4.3.5. Analýza AFLP

Před vlastní analýzou byly testovány rozdíly v kvalitě a možné kontaminaci u vzorků DNA získaných individuálně ze statoblastů a zooidů (čerstvě zmražených a uchovaných v etanolu). Finální hodnocení polymorfismu jednotlivých kolonií bylo provedeno metodou AFLP jak uvádí Vos, et al. (1995) s použitím čtyř primerových kombinací: *EcoRI*+ACG/*MseI*+ACC, *EcoRI*+ACG/*MseI*+AGT, *EcoRI*+ACG/*MseI*+ATT, *EcoRI*+ACG/*MseI*+AAC. Získané PCR produkty byly následně vyhodnoceny pomocí fragmentační analýzy na sekvenátoru (Applied Biosystems).

Postup AFLP Analýzy (Příloha: Obrázek 16):

- Den1.
 - Restrikce DNA:
 - Byl připraven výchozí objem 40 μ l skládající se z 35 μ l TE pufru a 5 μ l DNA (25 ng/ μ l)
 - Byl namíchán mix (10 μ l na vzorek)

- Na 1 vzorek: 4,25 μl H_2O
 - 5 μl R/L Buffer (10 x)
 - 0,25 μl *EcoRI*. (10 U/ μl)
 - 0,5 μl *MseI* (10 U/ μl)
 - Po namíchání byl Mix důkladně promíchán
 - K připraveným 40 μl směsi DNA a TE bylo přidáno 10 μl mixu
 - Směs DNA a mixu byla umístěna do hybridizační pícky předeřáté na 37°C a inkubována po dobu 16 hodin
- Den 2.
 - Ligace adaptorů
 - Byl připraven „ligační“ mix (10 μl na vzorek)
 - Na 1 vzorek:
 - 6,2 μl H_2O
 - 1 μl R/L Buffer (10 x)
 - 0,1 μl *EcoRI* 3' (50 pmol/ μl)
 - 0,1 μl *EcoRI* 5' (50 pmol/ μl)
 - 0,2 μl *MseI* 3' (250 pmol/ μl)
 - 0,2 μl *MseI* 5' (250 pmol/ μl)
 - 1,2 μl ATP (10 mM), (zbytek vyhodit)
 - 1 μl T4 *ligázy* (1 U/ μl)
 - Namíchaná reakce byla stočena (max. 800 otáček) a inkubována 3 hodiny při 37°C
 - Byl připraven T01E pufr
 - Ligované vzorky byly smíchány s T01E pufr 1:10 (60 μl vzorku + 540 μl T01E)
 - Pre - amplifikace
 - Pro pre - amplifikaci bylo připraveno 5 μl DNA ředěné 1:10 v T01E pufru
 - Byl připraven pre - amplifikační mix (45 μl na vzorek)

- Na vzorek:
 - 5 μl H_2O
 - 5 μl PCR Buffer (10 x)
 - 2 μl MgCl_2 (50 mM)
 - 1 μl dNTP's (10 mM)
 - 0,15 μl *EcoRI* - A (500 ng/ μl)
 - 0,15 μl *MseI* - A (500 ng/ μl)
 - 0,2 μl Taq (5 U/ μl)
- Připravená směs byla umístěna do cycleru a spuštěn program PREAMP (cca 1,45 hod.)
- Připravený vzorek byl zředěn 20 x (40 μl vzorku + 760 μl TE pufru)
- Zbytek mohl být použit pro kontrolu na 3% agarózovém gelu
- Selektivní amplifikace
 - Pro selektivní amplifikaci bylo použito 2,5 μl DNA 20x ředěné v T01E pufru
 - Byl připraven mix (7,5 μl na vzorek)
 - Na vzorek:
 - 6,018 μl H_2O
 - 1 μl PCR Buffer (10 x)
 - 0,2 μl dNTP's (10 mM)
 - 0,087 μl *EcoRI* – ACG (10000 pmol)
 - Fluorescenčně značený primer
 - 0,095 μl *MseI* – ANN (316 ng/ μl)
 - ACC, ATT, AGT, AAC
 - 0,1 μl Taq (5 U/ μl)
 - Připravená PCR reakce byla spuštěna na program SELAMPL

Programy PCR:

Nastavení programu pro Pre - amplifikaci (PREAMP):

Víčko předeřtát na 99°C

- | | | | |
|----|------|---------|-------|
| 1. | 94°C | 2 min. | |
| 2. | 94°C | 30 sek. | } 29x |
| 3. | 60°C | 30 sek. | |
| 4. | 72°C | 1 min. | |
| 5. | 72°C | 9 min. | |
| 6. | 4°C | ∞ | |

Nastavení programu pro Selektivní amplifikaci (SELAMP):

Víčko předeřtát na 99°C

- | | | | |
|----|------|---------|---|
| 1. | 94°C | 2 min. | |
| 2. | 94°C | 30 sek. | } 10x, při každém opakování snížit teplotu annealingu o 1°C |
| 3. | 65°C | 30 sek. | |
| 4. | 72°C | 1 min. | |
| 5. | 94°C | 30 sek. | } 24x |
| 6. | 56°C | 30 sek. | |
| 7. | 72°C | 1 min. | |
| 8. | 72°C | 15 min. | |
| 9. | 4°C | ∞ | |

Správnost průběhu analýzy a následné amplifikace byla ověřena na testovacích vzorcích pomocí gelové elektroforézy. Pro toto ověření bylo použito 5 μ l vzorku, 3% agarózový gel a 7 μ l 100 bp ladder. Samotná elektroforéza byla nastavena na 150 V podobu cca 2 hodin.

4.3.6. Fragmentační analýza vzorků

Před samotnou fragmentační analýzou bylo nutné vzorky denaturovat. K tomuto účelu byla použita směs 11 μ l formamidu, 0,4 μ l GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Life Technologies) a 1 μ l vzorku po selektivní amplifikaci. Vzorky

byly důkladně promíchány, zbaveny všech bublinek a následně denaturovány v cycleru při 95°C po dobu 4 minut. Ihned po dokončení denaturace byly vloženy na minimálně 2 minuty do cold bloku vychlazeného na - 20°C.

Separace amplifikačních produktů s fluorescenčně značeným primerem *EcoRI*+ACG proběhla pomocí kapilární elektroforézy s použitím velikostního standardu GS500 (Life Technologies) na přístroji ABI 3500 (Applied Biosystem).

4.3.7. Vyhodnocení dat po fragmentační analýze

Signály separovaných produktů byly vyhodnoceny v programu Gene Mapper verze 5.0 (Life Technologies) a převedeny do podoby binární matice, kde 1 značí přítomnost a 0 nepřítomnost amplifikovaného fragmentu o dané velikosti. Získaná matice byla použita pro další statistické zpracování. Pro samotné statistické zpracování byly použity pouze polymorfni alely.

K vyhodnocení struktury studované populace byla použita analýza PCO (principal coordinates analysis) a Neighbor - Joining klastrová analýza. Analýzy byly provedeny pomocí programů MVSP 3.1 (Kovach Computing Services, Anglesey, U. K.) a DARwin 5.0.158 (CIRAD, Montpellier, F). Analýza genetické struktury populace byla provedena pomocí programu Structure 2.3.4 (Pritchard, et al., 2000), (length of burn - in period/number of iterations: 5000/50000; admixture model; correlated allele frequencies) s minimálním počtem deseti opakování pro počet populací (K), K=1 - 10. Počet klastrů byl následně stanoven dle Evanno, et al. (2005).

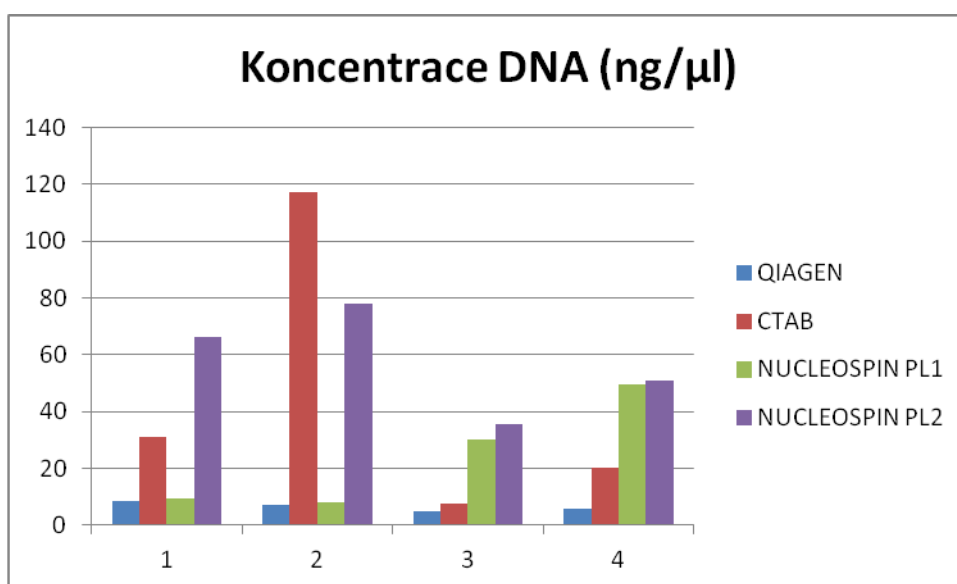
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Výsledky izolace DNA

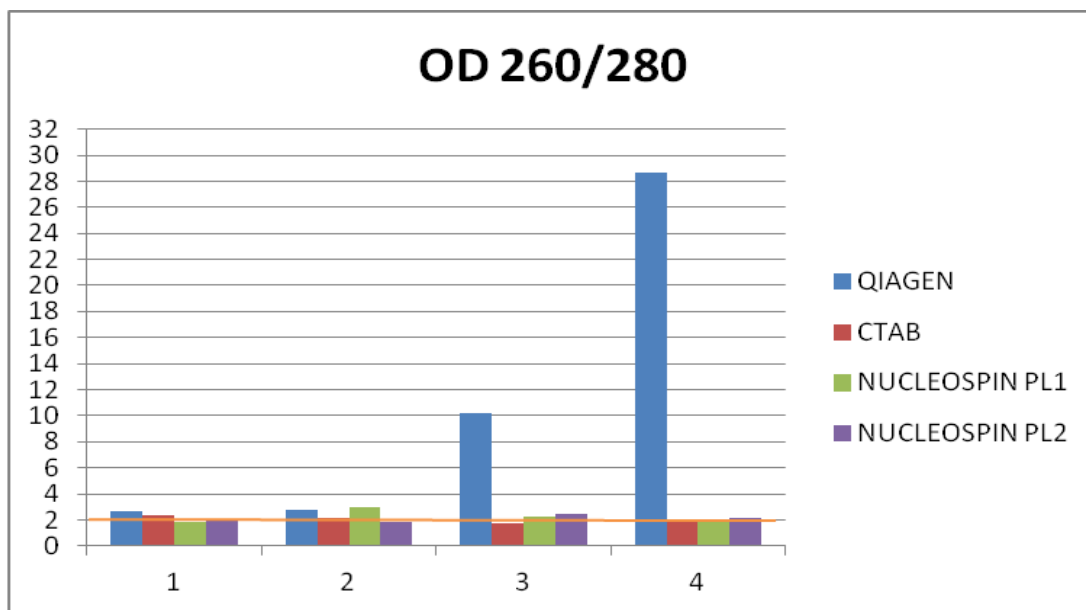
Ke zvolení metody, která bude nejlepší pro analýzu AFLP, byly použity výsledky hodnocení testovacích vzorků, na kterých byla optimalizována metoda izolace. Vzorky byly posuzovány podle výtěžnosti DNA a parametrů OD 260/280 a OD 260/230.

Hodnota OD 260/280 značí absorbanci vzorku při záření o vlnové délce 260 a 280 nm. Tyto údaje ukazují čistotu DNA, kdy hodnoty pohybující se mezi 1,8 - 2 značí „čistou“ DNA. Nižší naměřené hodnoty mohou být způsobeny přítomností proteinů, fenolů nebo jiných kontaminantů, případně velmi nízkou koncentrací DNA. Naopak vyšší hodnoty absorbance neindikují problém se vzorkem. (THERMO SCIENTIFIC, 2015)

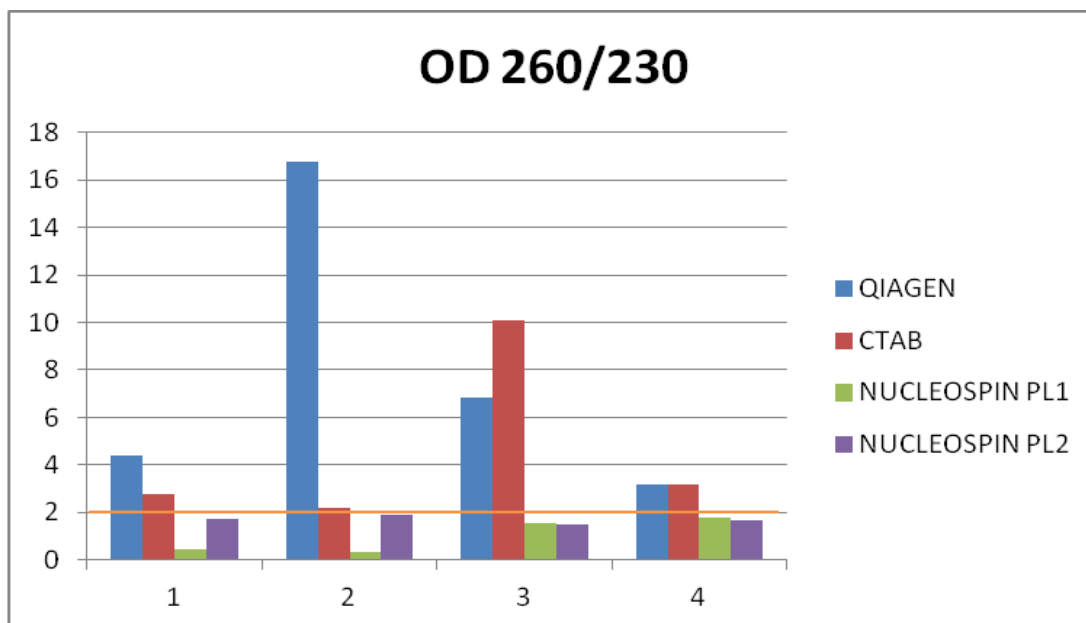
Údaj OD 260/230 ukazuje absorbanci při vlnové délce záření 260 a 230 nm. Tyto hodnoty jsou zpravidla vyšší než u OD 260/280 a měly by se u „čisté“ DNA pohybovat okolo 2,0 - 2,2. Nižší hodnoty mohou indikovat přítomnost kontaminantů, zatímco vyšší hodnoty mohou značit znečištění nanášecího místa při měření slepého vzorku (Blank), nebo použití nevhodného slepého vzorku. Další možností výkyvu naměřených hodnot je přítomnost vzduchových bublin v naneseném vzorku (THERMO, 2015).



Graf. 1 Koncentrace DNA: 1 – Testovací H₂O statoblast; 2 – Testovací H₂O zooid; 3 – Testovací Et OH statoblast; 4 – Testovací Et OH zooid



Graf. 2 OD 260/280: 1 – Testovací H₂O statoblast; 2 – Testovací H₂O zooid; 3 – Testovací Et OH statoblast; 4 – Testovací Et OH zooid



Graf. 3 OD 260/230: 1 – Testovací H₂O statoblast; 2 – Testovací H₂O zooid; 3 – Testovací Et OH statoblast; 4 – Testovací Et OH zooid

Z naměřených hodnot je patrné, že vzorky fixované v etanolu mají nižší výtěžnost DNA než vzorky uchovávané v „čerstvém“ stavu. Tento jev může být způsoben denaturací vzorků působením etanolu. Nicméně, vzorky fixované etanolem

se snáze zpracovávaly, díky narušení kolonií a tím i jejich snazšímu rozdělení na zooidy a statoblasty. Zároveň je patrné, že izolace ze statoblastů má lepší výtěžnost než ze zooidů. Izolační kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) má nejnižší výtěžnost a kvalitu v porovnání s ostatními kity. Tuto skutečnost potvrzuje Zetzsch, et al. (2008) ve své studii, kde porovnával jednotlivé izolační metody. Nejstabilnější výsledky dává izolační kit Nucleo Spin PL2 (Macherey - Nagel).

Podle analýzy Zetzsche et al. (2008) má izolační metoda CTAB při využití pro živočišné tkáně a houby průměrnou výtěžnost velmi kvalitní DNA, o průměrné délce získaných fragmentů. Její výhodou je, v porovnání s ostatními způsoby izolace, poměrně nízká cena, ale trvá velmi dlouhou dobu. Metodou Nucleo Spin PL2 (Mercherey - Nagel) byla získána kvalitní DNA o dlouhých fragmentech, ale stejně jako izolační kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN) je finančně poměrně náročná.

Z důvodu splnění požadovaných parametrů na kvalitu DNA (Graf 2, 3), (THERMO, 2015), na grafech je optimum vyznačené žlutou čarou, a množství potřebné pro techniku AFLP (Graf 1), byly použity vzorky izolované s použitím CTAB a dále jeden vzorek (lyofilizát), který byl izolován pomocí kitu DNeasy Plant Mini (QIAGEN). Metoda izolace CTAB - PVP je pro účely analýzy AFLP často využívána. (Čurn, et al., 2012)

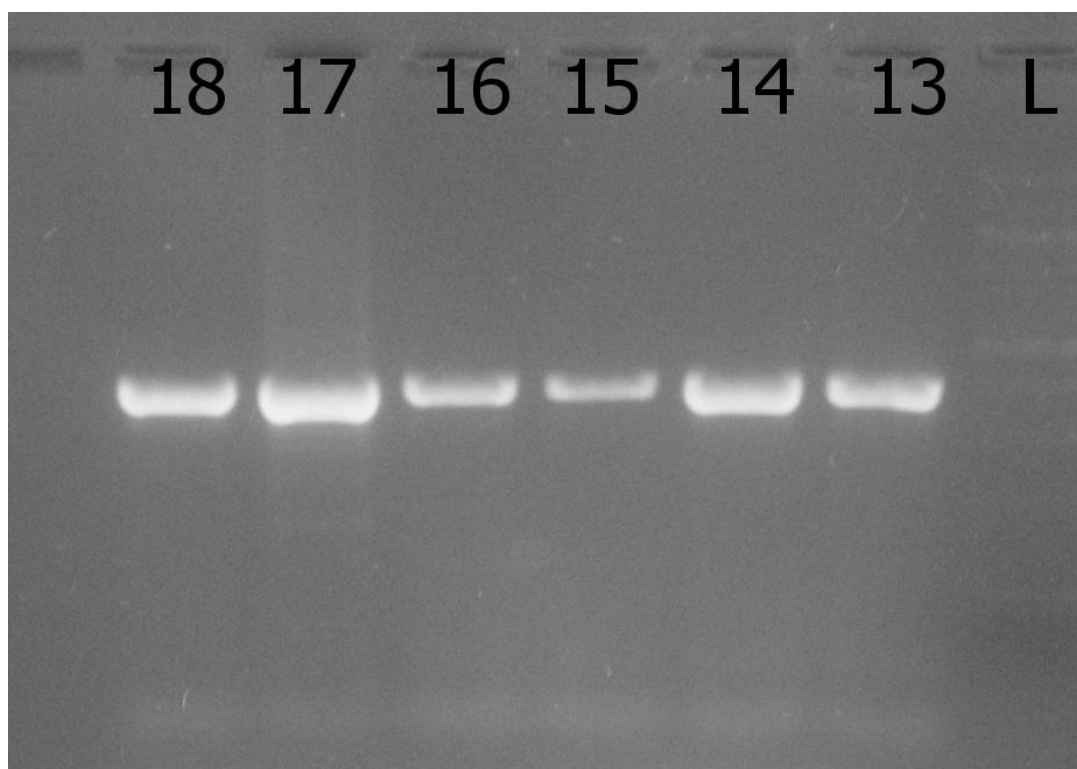
Waeschenbach, et al. (2012) k izolaci DNA použil DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), tato metoda byla podle analýzy Zetzsche et al. (2008) vyhodnocena jako nejlepší pro izolaci DNA z materiálu živočišného a houbového původu. Rubini, et al. (2011) použil pro izolaci genomické DNA z navážky 0,1mg statoblastů extrakční pufr složený z CTAB a SDS.

Ze vzorků izolovaných pomocí CTAB byly pro AFLP vybrány ty vzorky, kde byly pro izolaci DNA použity kolonie statoblastů. Pouze v několika případech byla použita DNA z kolonií zooidů, konkrétně u vzorků neobsahujících statoblasty (29, 30, 61) a vzorku z USA, kde nebylo možné kolonie statoblastů a zooidů oddělit (Tab. 5). V tabulce 4 jsou zaznamenány parametry vypovídající o kvalitě získané DNA vzorků použitých pro analýzy AFLP.

Tab. 5 Výsledky izolace DNA

| Označení Vzorku | Vzorek | Koncentrace DNA (ng/μl) | OD 260/280 | OD 260/230 |
|--------------------|---------------------|----------------------------|------------|------------|
| 11 | Veselí (2014) | 5,42 | 3,62 | 1,22 |
| 13 | Hejtman (2014) | 10,39 | 3,38 | 1,70 |
| 17 | Veselí (2014) | 22,07 | 2,34 | 1,77 |
| 19 | Hejtman (2014) | 55,13 | 2,12 | 1,71 |
| 25 | Nový Kanclíř (2014) | 15,10 | 1,89 | 2,48 |
| 27 | Cep (2014) | 39,49 | 2,09 | 1,94 |
| 29 | Podřezaný (2014) | 117,71 | 2,12 | 2,10 |
| 30 | Veselí I 3 Tr. | 18,61 | 1,91 | 3,72 |
| 31 | Nový Kanclíř 1 | 17,20 | 2,03 | 2,87 |
| 35 | Nový Kanclíř 3 | 12,37 | 3,24 | 1,57 |
| 37 | Nový Kanclíř 2 | 10,35 | 4,48 | 0,94 |
| 39 | Veselí I 5Tr. | 3,53 | 13,22 | 0,92 |
| 41 | Vlkov | 7,18 | 2,95 | 3,46 |
| 43 | 1/1B | 5,22 | 14,35 | 1,49 |
| 45 | 2/1B | 21,09 | 2,68 | 1,88 |
| 47 | 4/3B | 11,84 | 4,60 | 2,26 |
| 49 | Veselí I 3 Tr. | 26,81 | 2,39 | 1,91 |
| 51 | Veselí I 4 | 31,78 | 2,40 | 2,19 |
| 53 | Veselí I 6 | 21,93 | 2,69 | 1,72 |
| 55 | Hejtman (2014) | 7,34 | 1,59 | <0,01 |
| 57 | Veselí I 2 Tr. | 5,77 | <0,01 | 0,84 |
| 59 | Veselí I 5 | 10,99 | 5,46 | 1,11 |
| 61 | Veselí I | 563,14 | 2,17 | 2,17 |

| | | | | |
|----|------------|-------|------|------|
| 63 | 3/2 B | 10,29 | 2,67 | 2,72 |
| 65 | 3/3 B | 13,65 | 2,83 | 2,02 |
| 67 | 4/1 B | 16,75 | 3,48 | 1,71 |
| 69 | 4/2 B | 12,84 | 4,59 | 2,18 |
| 71 | 4/5 B | 11,95 | 5,34 | 1,88 |
| 73 | 4/6 B | 10,06 | 7,79 | 1,58 |
| 80 | Lyofilizát | 30,36 | 2,22 | 2,86 |

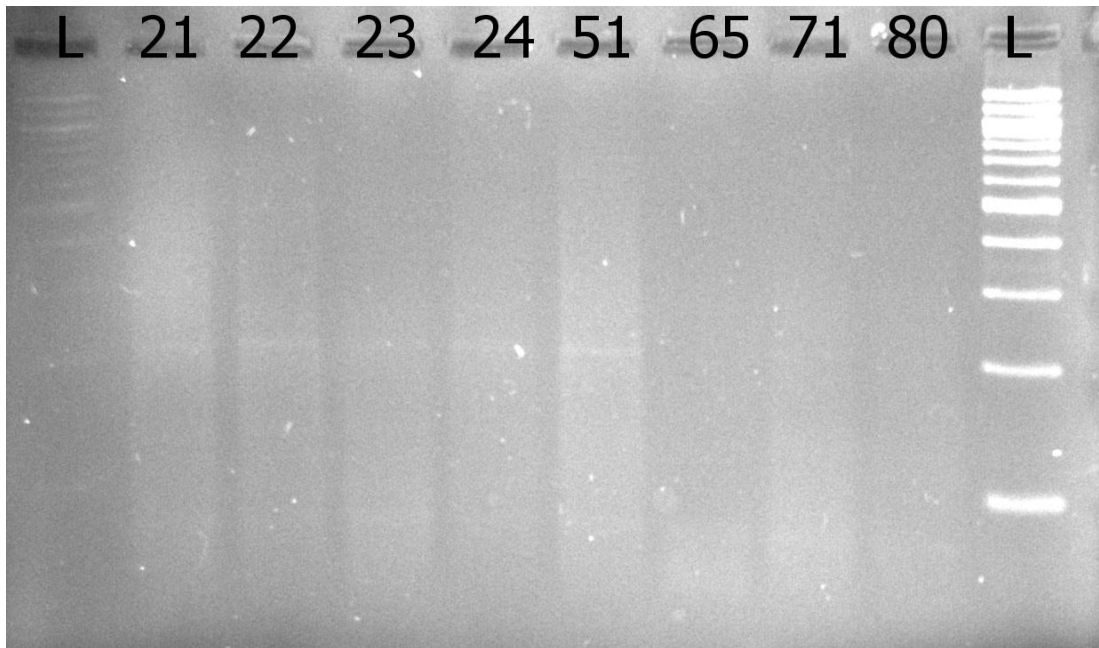


Obr. 11 *Pm* s primery pro 28S rRNA: vzorek: 18, 17, 16, 15, 14, 13, Ladder

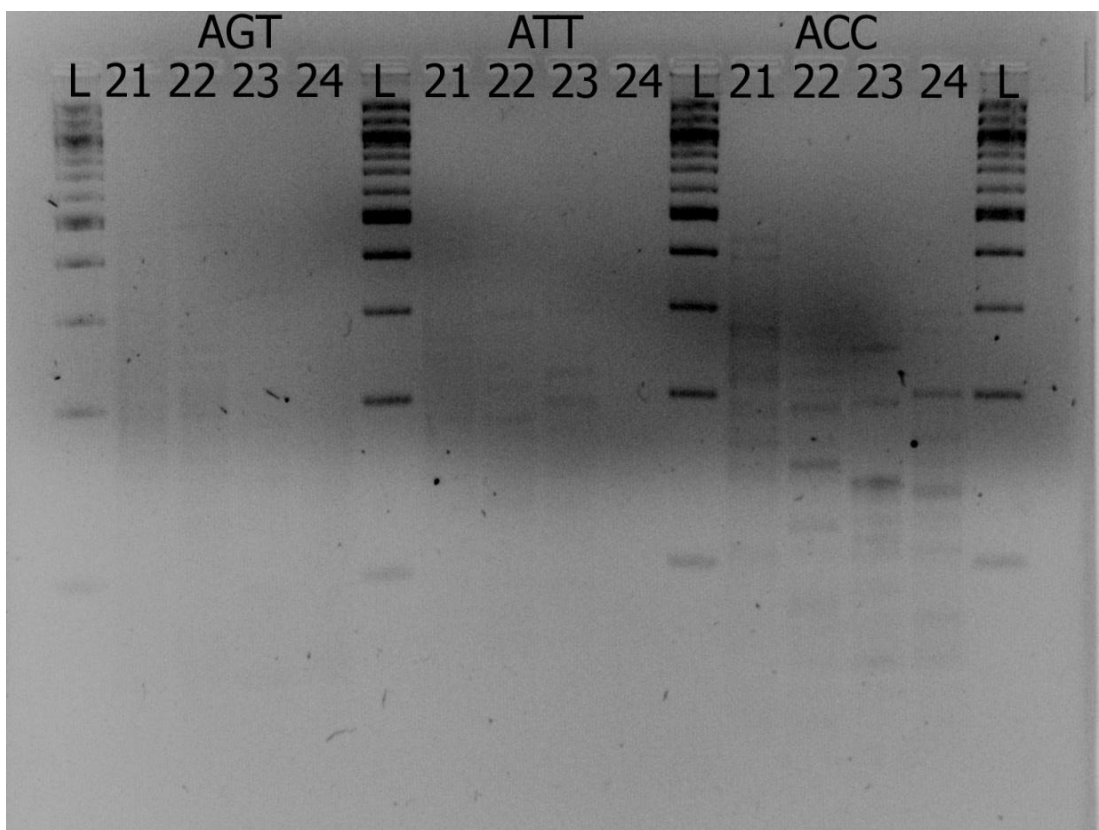
Amplifikací izolované DNA společně s primery specifickými pro 28S rRNA bochníky americké byl prokázáno, že izolace DNA pomocí metody CTAB – PVP byla úspěšná a byla tak získána skutečně DNA studovaného organismu.

5.2. Výsledky analýzy AFLP

Výsledky kontroly Preamplifikace pomocí gelové elektroforézy (Obr. 12) a amplifikace (Obr. 13).



Obr. 12 Kontrola Preamplifikace: Ladder; 21; 22; 23; 24; 51; 65;71;80; Ladder



Obr. 13 Gelová elektroforéza vzorků po selektivní amplifikace na 3% agarózovém gelu

Pořadí vzorků pro gelovou elektroforézu: Ladder; vzorky s primerem *MseI* AGT: 21, 22, 23, 24; Ladder; vzorky s primerem *MseI* ATT: 21, 22, 23,24; Ladder; vzorky s primerem *MseI* ACC: 21, 22, 23, 24; Ladder.

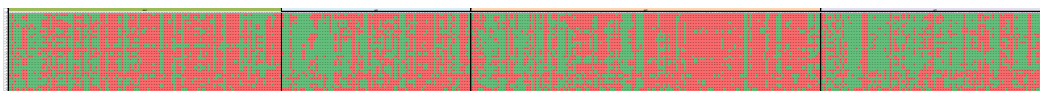
Na obrázku 13 je znázorněná vizualizace AFLP s použitím gelové elektroforézy. I přes nízkou viditelnost je na vzorcích 23 (statoblast) a 24 (zooid) amplifikovaných s primerem *Mse I* ACC patrný rozdíl ve spektru amplifikovaných proužků. Tato skutečnost by mohla být způsobena kontaminací izobátu ze zooidů cizorodou DNA například z potravy nebo řas, žijících na povrchu kolonií. Na základě opakovaného provedení AFLP a následného ověření gelovou elektroforézou byl ze všech dalších analýz vyřazen vzorek 65, u které se opakovaně nic neamplifikovalo.

5.2.1. Výsledky AFLP

Genomická DNA byla štěpena s pomocí dvou restrikčních endonukleáz *EcoRI/MseI* a byla provedena ligace adaptorů. Pro AFLP analýzu byl použit jeden *Eco* - primer značený FAM a čtyři různé *Mse* - primery. Použité primerové kombinace jsou uvedeny v tabulce 5. V této tabulce jsou uvedena i shrnutí výsledků AFLP analýzy – počty detekovaných fragmentů a rozsah velikosti fragmentů.

Tab. 6 Výsledek analýzy AFLP

| Primerová kombinace | Počet variabilních fragmentů | Velikost fragmentů (bp) |
|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| E - ACG/M – AAC | 103 | 44 – 480 |
| E - ACG/M – ACC | 72 | 43 – 301 |
| E - ACG/M – AGT | 132 | 36 – 414 |
| E - ACG/M – ATT | 87 | 43 – 399 |

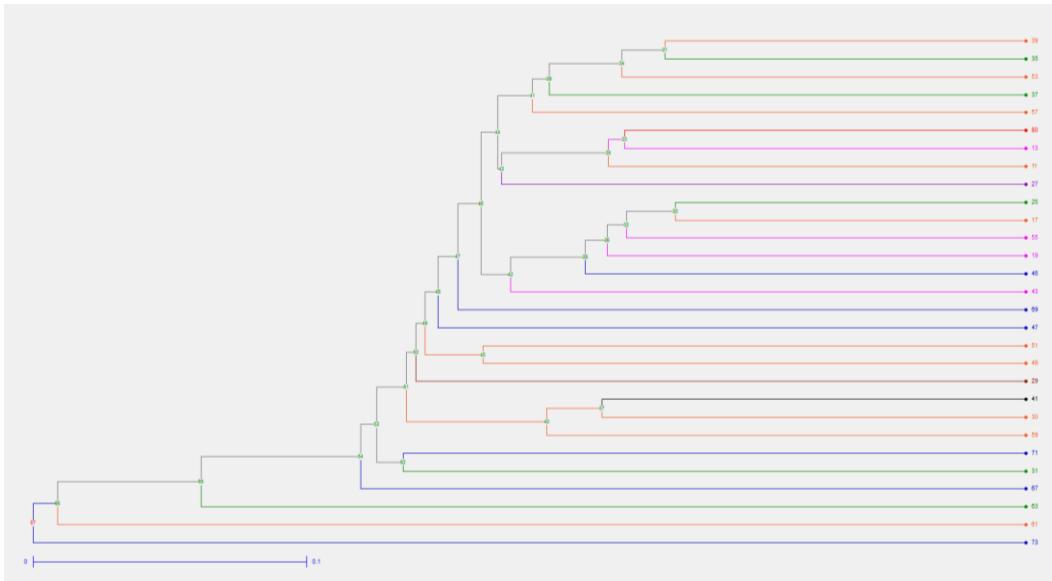


Graf 4 Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu

Na grafu 4 je zobrazen kompletní DNA fingerprinting pomocí 4 primerových kombinací tvořících 394 polymorfních AFLP fragmentů u 29 vzorků *Pectinatella magnifica* (zelená=přítomnost, červená=nepřítomnost amplifikačního AFLP produktu); pořadí zobrazených primerů – AAC, ACC, AGT, ATT

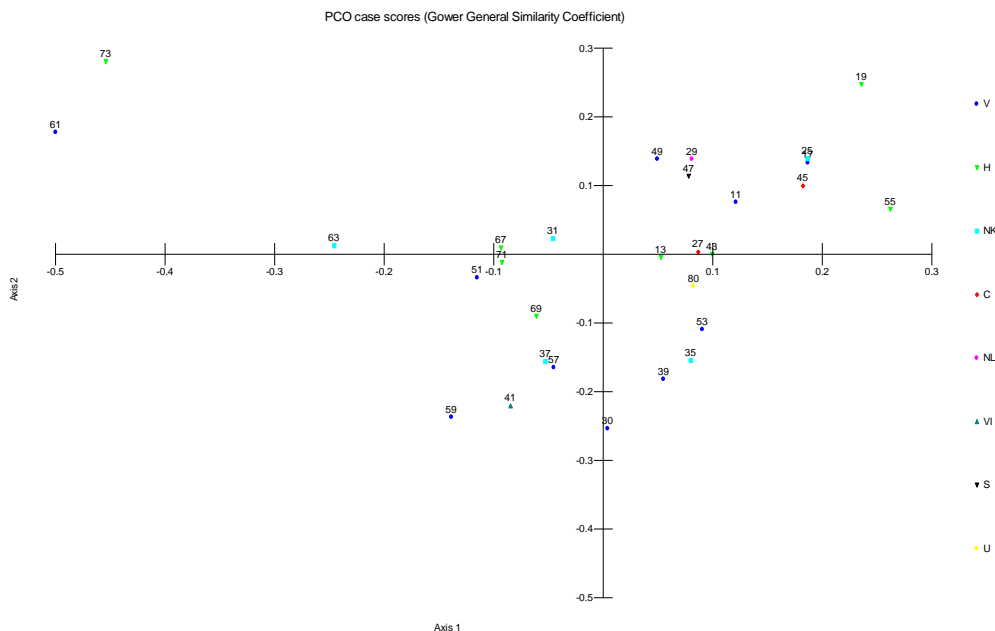
5.2.2. Analýza AFLP profilu

AFLP analýza vygenerovala 496 fragmentů (E - ACG/M - AAC=129, E - ACG/M - ACC=98, E - ACG/M - AGT=157, E - ACG/M - ATT=112) o velikosti 36 - 480 bp, z nichž 394 bylo polymorfních (79,4%). Průměrný počet fragmentů na jednoho jedince činil 180 (125 – 225). Analýza odlišnosti jedinců v rámci celé skupiny byla vyhodnocena na základě distanční matice, metodou Neighbor - Joining klastrové analýzy (graf 5). Podobnost testovaných vzorků se dle získané distanční matice pohybovala v rozmezí 47,6 - 86,1%. V rámci jedinců, pocházejících ze stejné geografické oblasti byla pozorována minimální tendence shlukování. Také grafické vyjádření genetické struktury v rámci populace pomocí PCO ordinačního diagramu, naznačuje diverzitu mezi jedinci v rámci geograficky blízkých lokalit (graf 6). Analýza odhadu genetické struktury populace v programu Structure rozdělila skupinu do dvou geneticky homogenních skupin/klastrů (K=2). Při podrobném rozboru z pohledu časové i prostorové škály, nebyla nalezena souvislost v rámci jejich shlukování. Na grafu 5 jsou uvedeny výsledky klastrové analýzy – Neighbour Joining, vycházející z matice genetické podobnosti/vzdálenosti. Z dendrogramu je patrné, že analýza přinesla výsledky, že nejvíce odlišné jsou tři vzorky – 61, 63 a 71.



Graf 5 Neighbour - Joining analýza

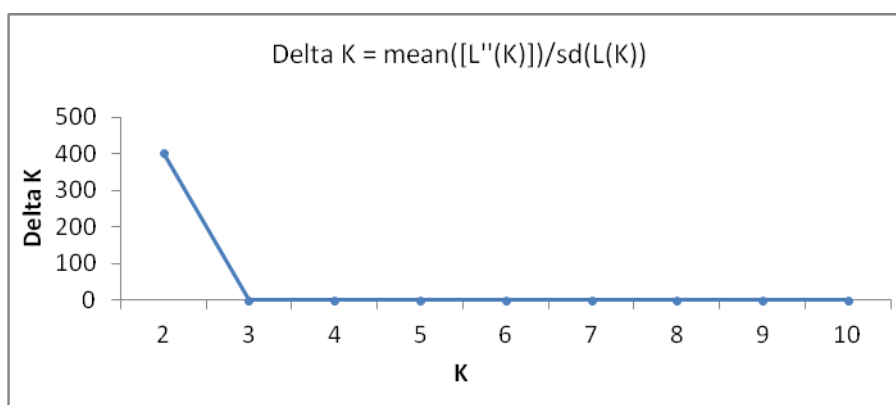
Neighbour - Joining analýza vyjadřuje genetickou vzdálenost mezi jednotlivými koloniemi pomocí horizontálního stromového diagramu, kde každý uzel představuje jednu fázi shlukovacího procesu. Oranžová – Veselí I (11, 17, 30, 39, 49, 51, 53, 57, 59, 61); Růžová – Hejtman (13, 19, 43, 55); Fialová – Cep (27); Červená – USA (80); Modrá – Staňkovský (45, 47, 67, 69, 71, 73); Zelená – Nový Kanceliř (25, 31, 35, 37, 63); Hnědá – Podřezaný (29); Černá – Vlkov (41)



Graf 6 Principal coordinates analysis (PCO) z AFLP analýzy u 29 vzorků *P. magnifica*

Označení v analýze PCO zastupují jednotlivé odběrové lokality: V - Vlkov; H – Hejtman; NK – Nový Kanclíř; C – Cep; NL – Nový Lipnický; VI – Veselí I.; S – Staňkovský; U – USA.

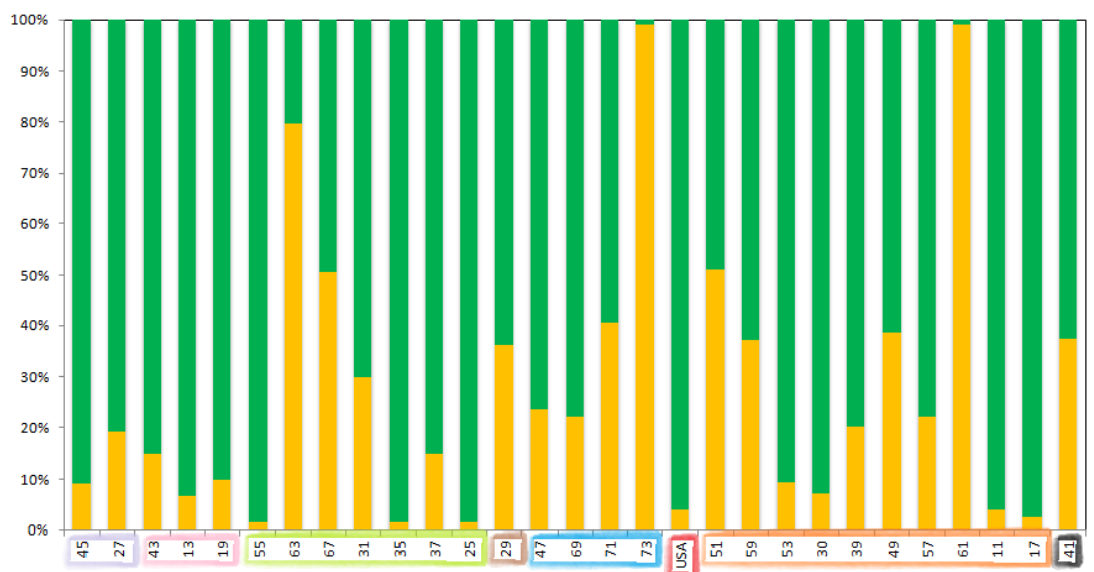
Výsledky PCO analýzy jsou v souladu s výsledky Neighbour Joining analýzy. Ordinační diagram uvedený na grafu 6 ukazuje opět nejvyšší odlišnost třech vzorků – 61, 63 a 71. Tyto tři vzorky jsou umístěny v levé části diagramu a neshlukují se s ostatními vzorky.



Graf 7 Evanno et al. (2005) graf k detekci počtu skupin/klastrů (K)

Na grafu na grafu 7 je zobrazen postup pro odhad parametru „K“ dle Evanno a kol. (2005). Nejvyšší hodnoty dosahuje křivka pro počet skupin 2 (K=2) a genetická struktura populace byla tedy hodnocena pro počet subpopulací 2. Výsledky analýzy genetické struktury populace jsou uvedeny na grafu 8. Tento graf ukazuje procentickou míru klastrování jednotlivých vzorků ve studované skupině. Vzorky v grafu byly řazeny abecedně dle lokality odběru: CepI, Hejtman, Nový Kanclíř, Nový Lipnický (Podřezaný), Staňkovský, USA, Veselí I a Vlkov.

K výpočtu matice podobnosti, potřebné pro analýzy získaných dat, byl použit program Darwin – s použitím Jaccard koeficientu, u konstrukce dendrogramu pak UnWeighted Neighbor-Joining a u PCO analýzy Kaiser's rule.



Graf 8 Genetické vyhodnocení populace *Pectinatella magnifica* v programu Structure

Z výsledků AFLP analýzy lze usuzovat, že je variabilita vzhledem k způsobu shlukování mezi různými koloniemi obecně malá a v sekundárním areálu – tj. České republice zatím nedošlo k speciaci. Toto vysvětlení může osvětlit nemožnost odlišení původní a invadující populace s pomocí 394 polymorfních alel. Vzhledem k charakteru použité techniky, předpokládané velikosti genomu bochnatky, který podle (www.genomesize.com) činí přibližně 1,5 Gb, a množství analyzovaných alel, však může být příčinou i nedostatečná informativní hodnota a kapacita použité techniky. Přesto byla vzhledem k situaci (nedostatečné znalosti o genomu bochnatky americké, vysokému množství variabilních alel, získaných z jedné primerové kombinace, a citlivosti AFLP v porovnání s jinými možnými technikami) technika AFLP vyhodnocena jako neoptimálnější k pilotní analýze struktury populací *Pectinatella magnifica*. Podle Muellera, et al. (1999) by měla být pro studium diverzity v rámci jednoho druhu metoda AFLP vhodná. Nicméně její nevýhodou je, že se jedná o dominantní marker a není možné s její pomocí odhalit heterozygotní alely. Možností studie heterozygotních alel by bylo použití kodominantního markeru, jako je RFLP. Nevýhodou této metody je, ale nutná předchozí znalost studovaného genomu. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Rubini et al. (2011), který použil metodu izolace DNA blízko metodě použité pro AFLP, použil pro analýzy DNA metodu ITS. Hatton - Elish et al. (1998)

úspěšně použil pro analýzu genetické diverzity *Cristatella mucedo* v jižní Anglii metodu RAPD - PCR. Freeland, et al. (2000) testovali u téhož druhu (*Cristatella mucedo*) genetickou diverzitu s použitím markeru 16S rDNA a analýzou mikrosatelitů. Fuchs, et al. (2009) používali pro fylogenetické studie skupiny *Ectoprocta*, kam je *Pectinatella* zařazena, markery 18S a 28S rDNA. Další možností fylogenetické studie mechovců bylo použití markerů IsrDNA a SsrDNA (Waeschenbach, et al., 2012).

V rámci neustálého progresu a častějších aplikací technik založených na NGS (Next Generation Sequencing) je již nyní bochnatka americká, vzhledem ke své neprobádanosti, jedním z následných cílových organismů, který čeká na odhalení svého genomu. Tato práce je pilotní studií a celkově i první studií vůbec, která se zabývá hodnocením genetické diverzity populace *Pectinatella magnifica*. V průběhu, optimalizace techniky izolace DNA a samotném výběru vhodných primerových kombinací pro AFLP nedocházelo k významným problémům.

6. ZÁVĚR

Během této práce byla snaha stanovit stupeň genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* odebraných na území CHKO a BR Třeboňsko. Jako nelepší metoda izolace DNA pro analýzy AFLP byla zvolena metoda pomocí CTAB – PVP a použitím specifických primerů bylo overěno, že se jedná o DNA *Pm*. Za pomoci analýzy AFLP u čtyřech primerových kombinací bylo vygenerováno 496 fragmentů o velikosti 36 - 480 bp, z nichž bylo polymorfních 394, tedy 79,4%. Podobnost testovaných vzorků se ve výsledku pohybovala v rozmezí 47,6 - 86,1%. Studované vzorky vykazovaly celkovou nízkou hladinu diverzity, přičemž nejvyšší odlišnost vykazovali vzorky 61 (Veselí I), 63 (Nový Kanclíř) a 71 (Staňkovský).

7. LITERATURA

1. ABBOT, P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter - simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, 1(1), 8.
2. ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, A., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2005. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero publishing, 740 s., ISBN 80 - 902906 - 2 - 0.
3. ANDERSON, C., CANNING, E., OKAMURA, B. 1999. Molecular data implicate *Bryozoans* as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of *Bryozoan* parasites within the Myxozoa. *Parasitology*, 119(06), 555 - 561.
4. ANIMAL GENOME SIZE DATABASE. 2015. Detailed Record for *Pectinatella magnifica* [online]. [cit. 2015 - 04 - 18]. Dostupné z: http://www.genomesize.com/result_species.php?id=4691/
5. AVISE, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution: Natural History and Evolution*. New York: Springer Science & Business Media, 305 s., ISBN 0412037718.
6. BALOUNOVÁ, Z., PECHOUŠKOVÁ, E., RAJCHARD, J., JOZA, V., ŠINKO, J. 2013. World - wide distribution of the *Bryozoan Pectinatella magnifica* (Leidy 1851). *European Journal of Environmental Sciences*, 3(2), 96 - 100.
7. BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J., ŠVEHLA, J., ŠMAHEL, L. 2011. The onset of invasion of *Bryozoan Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech Republic). *Biologia*, 66(6), 1091 - 1096.
8. BALOUNOVÁ, Z., ŠMAHEL, L., RAJCHARD, J. 2007. Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová, J., Štěrba, O. (Eds.). *Proceedings of the Říční krajina 4*, Olomouc.
9. BARNES, D. K., LAUER, T. E. 2003. Distribution of freshwater sponges and *Bryozoans* in northwest Indiana. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 112, 29 - 35.
10. BARNES, R. S. K., GOLDING, D. 2009. *Invertebrates : A Synthesis (3rd Edition)*. Hoboken: Wiley - Blackwell, 512 s., ISBN 9781444312331.

11. BAUER, C., MILDNER, J., ŠETLÍKOVÁ, I. 2010. Das Moostierchen *Pectinatella magnifica* in Österreich. *Heredity*, 87, 207 - 214.
12. BAXEVANIS, A. D., OUELLETTE, B. F. 2004. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Hoboken: John Wiley & Sons, 560 s., ISBN 0471461016.
13. BILTON, D. T., FREELAND, J. R., OKAMURA, B. 2001. Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual review of ecology and systematics*, 32, 159 - 181.
14. BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic acids research*, 27(8), 1767 - 1780.
15. BRANDWEIN, P. F. 1938. The Culture of *Pectinatella magnifica* Leidy. *The American Naturalist*, 72(738), 94 - 96.
16. BUSHNELL, J. H. 1965. On the taxonomy and distribution of freshwater *Ectoprocta* in Michigan. III. *Transactions of the American Microscopical Society*, 84(4), 529 - 548.
17. CAETANO - ANOLLÉS, G., BASSAM, B. J., GRESSHOFF, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(4), 294 - 307.
18. CAMPBELL, N. A., MARKL, J. 1997. *Biologie*. Heidelberg/Berlin/Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 560 s.
19. CANNING, E. U., REFARDT, D., VOSSBRINCK, C. R., OKAMURA, B., CURRY, A. 2002. New diplokaryotic microsporidia (Phylum *Microsporidia*) from freshwater *Bryozoans* (*Bryozoa*, *Phylactolaemata*). *European Journal of Protistology*, 38(3), 247 - 265.
20. CLAVERIE, J. - M. 2001. What if there are only 30,000 human genes? *Science*, 291(5507), 1255 - 1257.
21. CORDELL, H. J. 2002. Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Human molecular genetics*, 11(20), 2463 - 2468.
22. CULEK, M., GRULICH, V. 2010. Biogeografické členění ČR. Praha: Enigma, 347 s. ISBN 80 - 85368 - 80 - 3.

23. ČURN, V., HAVLÍČKOVÁ, L., VONDRÁŠKOVÁ, E., KUČERA, V., VYVADILOVÁ, M., KLÍMA, M., 2012. *Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (Brassica napus L.) a hodnocení jejich diverzity*. České Budějovice, ISBN 978 - 80 - 7394 - 251 - 9.
24. D'HONDT, J. - L. 2005. Revised biological definition of the *Bryozoa*. In: *Bryozoan studies 2004: proceedings of the thirteenth International Bryozoology Association Conference, Concepción Chile, 11 - 16 January 2004*. Taylor & Francis, p. 119.
25. DAVENPORT, C. B. 1900. On the Variation of the Statoblasts of *Pectinatella magnifica* from Lake Michigan, at Chicago. *The American Naturalist*, 34(408), 959 - 968.
26. DAVENPORT, C. B. 1904. Report on the fresh - water *Bryozoa* of the United States. US Government Printing Office, 27, 211 - 221.
27. DEMEK, J. 1965. Geomorfologie českých zemí. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 335 s.
28. DENDY, J. S. 1963. Observations on *Bryozoan* ecology in farm ponds. *Limnology and Oceanography*, 8(4), 478 - 482.
29. DE - VETTEN, N., QUATTROCCHIO, F., MOL, J., KOES, R. 1997. The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD - repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes and Development*, 11(11), 1422 - 1434.
30. ESTEVE - ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F., QUEROL, A., 1999, Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Internal Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 329 - 337.
31. EVANNO G., REGNAUT S., GOUDET J. 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
32. EVERITT, B. 1975. Fresh - water *Ectoprocta*: distribution and ecology of five species in southeastern Louisiana. *Transactions of the American Microscopical Society*, 94(1), 130 - 134.

33. FRANKHAM, R., BRISCOE, D. A., BALLOU, J. D. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press, 607 s., ISBN 0521639859.
34. FREELAND, Joanna R.; ROMUALDI, Chiara; OKAMURA, Beth. 2000. Gene flow and genetic diversity: a comparison of freshwater *Bryozoan* populations in Europe and North America. *Heredity*, 85.5: 498 - 508.
35. FROST, T. M., WILLIAMSON, C. E. 1980. In situ determination of the effect of symbiotic algae on the growth of the fresh water sponge *Spongilla lacustris*. *Ecology*, 61(6), 1361 - 1370.
36. FUCHS, J., OBST, M., SUNDBERG, P. 2009. The first comprehensive molecular phylogeny of *Bryozoa (Ectoprocta)* based on combined analyses of nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1), 225 - 233.
37. GILBERT, D. E., FEIGON, J. 1999. Multistranded DNA structures. *Current opinion in structural biology*, 9(3), 305 - 314.
38. GOLDIE'S ROOM. *Molecular Biology*. 2013. Dostupné z: http://www.goldiesroom.org/Multimedia/Bio_Images/. Citováno dne 29.3.2015.
39. GOSDEN, J., HANRATTY, D. 1993. PCR in situ: a rapid alternative to in situ hybridization for mapping short, low copy number sequences without isotopes. *Biotechniques*, 15(1), 78 - 80.
40. GRANT, D., SHOEMAKER, R. 1997. Molecular hybridization. In: Caetano – Anollés, G., Gesshoff, P. M. (Eds.): *DNA Markers - Protocol, Applications, and Overviews*. Hoboken: Wiley - VCH, 364 s., ISBN 978 - 0 - 471 - 16067 - 0.
41. GUGEL, J. 2001. Life cycles and ecological interactions of freshwater sponges (*Porifera, Spongillidae*) in the River Rhine in Germany. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 31(3), 185 - 198.
42. HAND, S. C. 1991. Metabolic dormancy in aquatic invertebrates. *Advances in comparative and environmental physiology*, 8, 1 - 50.
43. HARTL, D. L., CLARK, A. G. 1997. Principles of population genetics. Sunderland: Sinauer associates, 635 s.

44. HATTON - ELLIS, TRISTAN W.; NOBLE, LESLIE R.; OKAMURA, BETH. 1998. Genetic variation in a freshwater *Bryozoan*. I: Populations in the Thames basin, UK. *Molecular ecology*, 7.11: 1575 - 1585.
45. HEJSKOVÁ, E. 1953. Revise československých mechovek (Bryozoi). *Věstník Královské české společnosti nauk, třída matematika - přírodověda*, 5, 1 - 12.
46. HENTRICH, W. 1979. Multiple Allelie, Pleiotropie und zuchterische Nutzung mehltaresistenter Mutanten des mlo - Locus der Gerste. *Tagungsbericht - Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der Deutschen Demokratischen Republik*, 191 - 203.
47. HEŘMANOVÁ, E. 2012. Jihočeské rybníky a rybníkářství. *Geografické rozhledy*, 21(3), 5 - 7.
48. HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real - time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11, 1026 - 1030.
49. HRABĚ, S. 1935. O *Pectinatella magnifica* a některých jiných mechovkách. *Věda přírodní*, 16, 89 - 92.
50. HUBSCHMAN, J. H. 1970. Substrate discrimination in *Pectinatella magnifica* Leidy (*Bryozoa*). *Journal of Experimental Biology*, 52, 603 - 607.
51. HUDSON, R. R., SLATKIN, M., MADDISON, W. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2), 583 - 589.
52. HULE, M. 2003. *Rybníkářství na Třeboňsku: historický průvodce; povodeň r. 2002*. Třeboň: Carpio, 250 s., ISBN 8086434001.
53. CHEN, K., RAJEWSKY, N. 2006. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nature genetics*, 38(12), 1452 - 1456.
54. CHÈVRE, A. - M., EBER, F., BARANGER, A., RENARD, M. 1997. Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 389(6654), 924 - 924.
55. CHURCH, G., GILBERT, W. 1984. Genomic Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 81(7), 1991 - 1995.

56. JEŘÁBEK, M. 1999. Geografická analýza pohraničí České republiky. Ostrava: Sociologický ústav Akademie věd České republiky, 179 s., ISBN 8085950766.
57. JONES, K., MARSH, T., WOOD, T. 2000. Surveying for phylactolaemate *Bryozoans* by sieving lentic sites for their statoblasts. Proceedings of the 11th International Bryozoology Association Conference, 259, 264.
58. JOO, G. - J., WARD, A. K., WARD, G. M. 1992. Ecology of *Pectinatella magnifica* (*Bryozoa*) in an Alabama Oxbow Lake: Colony Growth and Association with Algae. Journal of the North American Benthological Society, 11(3), 324 - 333.
59. JULLIEN, J. 1885. Monographie des *Bryozoaires* d'eau douce. Meulan: Société Zoologique de France, 45 s.
60. KAFKA, J. 1887. Die Süßwasserbryozoen Böhmens. Praha: Rivnac Verlag, 34 s.
61. KAPITONOV, V. V., JURKA, J. 2006. Self - synthesizing DNA transposons in eukaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(12), 4540 - 4545.
62. KARP, A., EDWARDS, K. 1997. DNA markers: a global overview. DNA markers: protocols, applications, and overviews, 1 - 13.
63. KATE, K. T., LAIRD, S. A. 1999. The commercial use of biodiversity: Access to genetic resources and benefit - sharing. London: Earthscan Publications Ltd., 416 s., ISBN 1853833347.
64. KELLICOTT, D. 1882. Polyzoa: Observations on Species Detected near Buffalo, NY. Proceedings of the American Society of Microscopists, 4, 217 - 229.
65. KENT, M., KHATTRA, J., HEDRICK, R., DEVLIN, R. 2000. *Tetracapsula renicola* n. sp.(*Myxozoa: Saccosporidae*); the PKX myxozoan - the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. Journal of Parasitology, 86(1), 103 - 111.
66. KRAEPELIN, K. 1887. Die deutschen süßwasser - bryozoen: Eine monographie. Hamburk: L. Friederichsen & Company, 48 s.

67. LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE ROSTLIN PŘF JU. 2005. Metody [online]. [cit. 2015 - 04 - 13]. Dostupné z: <http://www.botenika.prf.jcu.cz/laboratory/navody.html/>
68. LACOURT, A. 1968. A monograph of the freshwater *Bryozoa* - *Phylactolaemata*. Leiden: EJ Brill, 155 s.
69. LADIZINSKY, G. 1985. Founder effect in crop - plant evolution. *Economic Botany*, 39(2), 191 - 199.
70. LAIKRE, L., ALLENDORF, F. W., ARONER, L. C., BAKER, C. S., GREGOVICH, D. P., HANSEN, M. M., JACKSON, J. A., KENDALL, K., MCKELVEY, K. S., NEEL, M. C. 2009. Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on biological diversity. *Conservation Biology*, 24, 86.
71. LEIDY, J. 1851. On *Cristatella magnifica*. *Proceedings of Academy of Natural sciences Philadelphia*, 5, 265 - 266.
72. LOPPENS, K. 1908. Les *Bryozoaires* d'eau douce. *Annales de Biologie Lacustre*, 3, 141 - 158.
73. LYNCH, M., MILLIGAN, B. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology*, 3(2), 91 - 99.
74. MACHEREY - NAGEL, 2014, Mecherey - Nagel Usermanual, 16 - 17
75. MALONE, C. D., BRENNECKE, J., DUS, M., STARK, A., MCCOMBIE, W. R., SACHIDANANDAM, R., HANNON, G. J. 2009. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*, 137(3), 522 - 535.
76. MARCUS, E. 1925. *Bryozoa*. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 63 s.
77. MASSARD, J., GEIMER, G. 2005. Die Süßwasserbryozoen in der Fauna Europaea 2004: Karten und Kommentare. 167 - 174.
78. MASSARD, J. A., GEIMER, G. 2008a. Global diversity of *Bryozoans* (*Bryozoa* or *Ectoprocta*) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 198, 93 - 99.

79. MASSARD, J. A., GEIMER, G. 2008b. Global diversity of *Bryozoans* (*Bryozoa* or *Ectoprocta*) in freshwater: an update. *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois*, 109, 139 - 148.
80. MASSARD, J. A., GEIMER, G., BROMLEY, H. J., DIMENTMAN, C. 1992. Additional note on the fresh and brackish water *Bryozoa* of Israel (*Phylactolaemata*, *Gymnolaemata*). *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois*, 93, 199 - 214.
81. MENDEL, J., LUSK, S., KOŠČO, J., VETEŠNÍK, L., HALAČKA, K., PAPOUŠEK, I. 2008. Genetic diversity of *Misgurnus fossilis* populations from the Czech Republic and Slovakia. *Folia Zoologica*, 57(1 - 2), 90 - 99.
82. MORSE, W. 1930. The chemical constitution of *Pectinatella*. *Science*, 71(1836), 265.
83. MUELLER, U. G., WOLFENBARGER, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(10), 389 - 394.
84. MUKAI, H. 1999. Comparative morphological studies on the statoblasts of lower *phylactolaemate* *Bryozoans*, with discussion on the systematics of *Phylactolaemata*. *Science Reports of the Faculty of Education Gunma University*, 46, 51 - 91.
85. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2015. [online]. [cit. 2015 - 04 - 13]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
86. NECK, R., FULLINGTON, R. 1983. New records of the fresh - water *Ectoproct Pectinatella magnifica* in eastern Texas. *Texas Journal of Science*, 35(3), 269 - 271.
87. NEČAS, O., SVOBODA, A., HEJTMÁNEK, M., JANISCH, R., ČERVINKA, M., LENHART, K., KOLÁŘ, Z. 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Praha: H+H, 555 s., ISBN 8086022463.
88. NEI, M., MARUYAMA, T., CHAKRABORTY, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1), 1 - 10.
89. NEUHÄUSLOVÁ, Z. 1998. *Potenciální vegetace České republiky*. Praha: Academia, 341 s.

90. NOTTEGHEM, P. 1999. *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851): une nouvelle espèce de *Bryozoaires* pour la Bourgogne. Revue périodique de la Physiophile, 74(131), 12 - 25.
91. ODA, S. 1974. *Pectinatella magnifica* occurring in Lake Shoji, Japan. Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology, 10, 31 - 39.
92. ODA, S., MUKAI, H. 1985. Fine surface structure of the statoblasts of higher *phylactolaemate* *Bryozoans*. *Bryozoa: Ordovician to Recent*. Fredensborg: Olsen & Olsen, 244 s.
93. OKAMURA, B., WOOD, T. 2002. *Bryozoans* as hosts for *Tetracapsula bryosalmonae*, the PKX organism. Journal of Fish Diseases, 25(8), 469 - 475.
94. O'MALLEY, D. M., WHETTEN, R. 1997. Molecular markers and forest trees. DNA markers. In: Caetano - Anollés G., Gresshoff, PM (Eds.), Protocols and Overviews, 237 - 257.
95. OPRAVILOVÁ, V. 2005. O výskytu dvou druhů bezobratlých zavlečených do ČR: *Dusegia trigrina* (*Tricladida*) a *Pectinatella magnifica* (*Bryozoa*). Sborník přírodovědeckého klubu v Brně, 39 - 50.
96. OSBORN, A. M., SMITH, C. J. 2005. Molecular microbial ecology. New York: Garland Science, 256 s., ISBN 1859962831.
97. OSBURN, R. C. 1921. *Bryozoa* as food for other animals. Science, 53(1376), 451 - 453.
98. PARDUE, W., WOOD, T. 1980. Baseline toxicity data for freshwater *Bryozoa* exposed to copper, cadmium, chromium and zinc. Journal of Tennessee Academy of Science, 55(1), 135 - 148.
99. PENG, C. - K., BULDYREV, S. V., HAVLIN, S., SIMONS, M., STANLEY, H. E., GOLDBERGER, A. L. 1994. Mosaic organization of DNA nucleotides. Physical Review E, 49(2), 1685.
100. POKORNÝ, J., KUČEROVÁ, A. 2000. Monitoring klimatu a atmosférických depozic v CHKO Třeboňsko. In: Pokorný, J. Šulcová, J., Hátle, M., Hlásek, J. (Eds.), Třeboňsko 2000. Ekologie a ekonomika Trebonska po dvaceti letech. Třeboň: UNESCO a ENKI, 87 - 99.

101. POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY, S., RAFALSKI, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225 - 238.
102. PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
103. QIAGEN, 2006, DNeasy Plant Handbook
104. QUITT, E. 1971. Klimatické oblasti ČSSR. Brno: Studia geographica, 150 s.
105. RADEMAKER, J., DE BRUIJN, F., CAETANO - ANOLLES, G., GRESSHOFF, P. 1997. DNA markers: protocols, applications, and overviews, Hoboken: Willey, 360 s., ISBN 978 - 0 - 471 - 16067 - 0.
106. RASMUSSEN, D., PHILLIPS, R. 1997. Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. *Crop Science*, 37(2), 303 - 310.
107. RICCIARDI, A., LEWIS, D. J. 1991. Occurrence and ecology of *Lophopodella carteri* (Hyatt) and other freshwater *Bryozoa* in the lower Ottawa River near Montréal, Quebec. *Canadian journal of zoology*, 69(5), 1401 - 1404.
108. RICCIARDI, A., REISWIG, H. M. 1994. Taxonomy, distribution, and ecology of the freshwater *Bryozoans* (*Ectoprocta*) of eastern Canada. *Canadian journal of zoology*, 72(2), 339 - 359.
109. RODRIGUEZ, S., VERGON, J. 2002. *Pectinatella magnifica* Leidy 1851 (*Phylactolaemates*), a species of *Bryozoa* introduced in the north of Franche - Comté. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* (France), 75(2 - 3), 15 - 22.
110. ROUDNÁ, M., DOTLAČIL, L. 2007. Genetické zdroje - význam, využívání a ochrana. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 28 s., ISBN 8072124692.
111. RUBINI, A., PIERONI, G., ELIA, A., ZIPPILLI, L., PAOLOCCI, F., TATICCHI, M., 2011, Novel morphological and genetic tools to discriminate species among the family *Plumatellidae* (*Phylactolaemata*, *Bryozoa*). *Hydrobiologia*, 664(1), 81 - 93.

112. RUTHERFORD, S. L. 2003. Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nature Reviews Genetics*, 4(4), 263 - 274.
113. SERRA, I. A., PROCACCINI, G., INTRIERI, M. C., MIGLIACCIO, M., MAZZUCA, S., & INNOCENTI, A. M. 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, 338: 71 - 79.
114. SCHACHANOWSKAJA, J. 1929. *Pectinatella magnifica* Leidy in Böhmen. *Zoologischer Anzeiger*, 80, 296 - 301.
115. SLATKIN, M. 1977. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical population biology*, 12(3), 253 - 262.
116. SLATKIN, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39(1), 53 - 65.
117. SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803), 787 - 792.
118. SRŠEŇ, Š., SRŠŇOVÁ, K. 2000. *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. Bratislava: Osveta, 2000. ISBN 8080630216.
119. SVOBODA, J. 1964. *Regionální geologie ČSSR*. Praha: Ústřední ústav geologický, 205 s.
120. ŠETLÍKOVÁ, I., BALOUNOVÁ, Z., LUKAVSKÝ, J., RAJCHARD, J. 2005. Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku. *Živa*, 53, 172 - 173.
121. ŠETLÍKOVÁ, I., SKÁCELOVÁ, O., ŠINKO, J., RAJCHARD, J., BALOUNOVÁ, Z. 2013. Ecology of *Pectinatella magnifica* and associated algae and cyanobacteria. *Biologia*, 68(6), 1136 - 1141.
122. ŠINKO, J., [2014 - 05 - 28] , Ústní sdělení
123. THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. 2015. Genetic flow. Dostupné z: <http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/topics/popgenetics/Pages/GenotypeFlow.htm>. Citováno dne 29.3.2015.
124. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. 2015. Nano Drop products T009 - Technical Bulletin, 260/280 and 260/230 Ratios, ISBN 3024797707

125. TLAPÁK, V., ŠÁLEK, J., LEGÁT, V. 1992. Voda v zemědělské krajině. Praha: Brázda, 318 s., ISBN 8020902325.
126. Úmluva o biologické rozmanitosti, 1992, Rio de Janeiro
127. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRITERS, A., POT, J., PALEMAN, J., KUIPER, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407 - 4414.
128. WAESCHENBACH, A., COX, C. J., LITTLEWOOD, D. T. J., PORTER, J. S., TAYLOR, P. D. 2009. First molecular estimate of cyclostome *Bryozoan* phylogeny confirms extensive homoplasy among skeletal characters used in traditional taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1), 241 - 251.
129. WAESCHENBACH, A., TAYLOR, P., LITTLEWOOD, D. 2012. A molecular phylogeny of *Bryozoans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(2), 718 - 735.
130. WELSH, J., HONEYCUTT, R., MCCLELLAND, M., SOBRAL, B. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP - PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, 82(4), 473 - 476.
131. WILCOX, A. W. 1906. Locomotion in young colonies of *Pectinatella magnifica*. *The Biological Bulletin*, 11(5), 245 - 252.
132. WILLIAMS, S. R. 1921. Concerning" larval" colonies of *Pectinatella*. *The Ohio Journal of Science*, 21(4), 123 - 127.
133. WOOD, T. 2001a. Freshwater *Bryozoans*: a zoogeographical reassessment. *Bryozoan studies*, 21, 339 - 345.
134. WOOD, T. S. 1989. Ectoproct *Bryozoans* of Ohio. Ohio: College of Biological Sciences, Ohio State University, 70 s., ISBN 0867271051.
135. WOOD, T. S. 2001b. Three new species of plumatellid *Bryozoans* (*Ectoprocta*: *Phylactolaemata*) defined by statoblast nodules. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(1), 133 - 143.
136. WOOD, T. S. 2010. Chapter 13 - *Bryozoans*. In: Covich, J. H. T. P. (Ed.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (Third Edition). San Diego: Academic Press, 437 - 454.

137. WOOD, T. S., ANURAKPONGSATORN, P., MAHUICHARIYAWONG, J. 2006. Freshwater *Bryozoans* of Thailand (Ectoprocta and Entoprocta). The Natural History Journal of Chulanlongkorn University, 6, 83 - 119.

138. WOOD, T. S., WOOD, L. J. 2000. Statoblast morphology in historical specimens of phylactolaemate *Bryozoans*. Proceedings of the 11th International Bryozoology Association Conference, 421 - 430.

139. ZETZSCHE, H., KLENK, H. P., RAUBACH, M. J., KNEBELSBERGER, T., GEMEINHELZER, B. 2008. Comparison of methods and protocols for routine DNA extraction in the DNA Bank Network. Gradstein R, Klatt S, Norrman F, Weigelt P Willmann R, Wilson R, 354

8. SEZNAM GRAFŮ

Graf. 1 Koncentrace DNA: 1 – Testovací H₂O zooid; 2 – Testovací H₂O statoblast; 3 – Testovací Et OH zooid; 4 – Testovací Et OH statoblast 54

Graf. 2 OD 260/280: 1 – Testovací H₂O zooid; 2 – Testovací H₂O statoblast; 3 – Testovací Et OH zooid; 4 – Testovací Et OH statoblast 55

Graf. 3 OD 260/230: 1 – Testovací H₂O zooid; 2 – Testovací H₂O statoblast; 3 – Testovací Et OH zooid; 4 – Testovací Et OH statoblast55

Graf 4 Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu 61

Graf 5 Neighbour - Joining analýza 62

Graf 6 Principal coordinates analysis (PCO) z AFLP analýzy u 29 vzorků *P. magnifica* 62

Graf 7 Evanno et al. (2005) graf k detekci počtu skupin/klastrů (K) 63

Graf 8 Genetické vyhodnocení populace *Pectinatella magnifica* v programu Structure 64

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1 Systematické zařazení <i>Pectinatella magnifica</i> (Lacourt, 1968) | 10 |
| Obr. 2. Mapa výskytu <i>Pectinatella magnifica</i> v rámci Evropy..... | 24 |
| Obr. 3 Centrální dogma molekulární biologie (Nečas, et al., 2000) | 26 |
| Obr. 4 Uspořádání eukaryotního chromozomu (Goldie's Room, 2013)..... | 27 |
| Obr. 5 Modely genového toku: (a) ostrovní model, (b) isolation - by - distance model, (c) jednorozměrný stepping - stone model, (d) dvourozměrný stepping - stone model - čtvercové uspořádání subpopulací (The American Phytopathological Society, 2015) | 32 |
| Obr. 6 Lokalizace zájmového území Třeboňska v rámci Jihočeského kraje a České republiky | 33 |
| Obr. 7 Odběr kolonií <i>Pectinatella magnifica</i> ; Foto: Josef Rajchard..... | 44 |
| Obr. 8 Odebraná kolonie <i>Pectinatella magnifica</i> ; Foto: Vendula Moravcová | 45 |
| Obr. 9 Příprava vzorků; Foto: Vendula Moravcová..... | 46 |
| Obr. 10 Očištěný statoblast; Foto: Vendula Moravcová..... | 46 |
| Obr. 11 <i>Pm</i> s primery pro 28S rRNA: vzorek: 18, 17, 16, 15, 14, 13, Ladder | 58 |
| Obr. 12 Kontrola Preamplifikace: Ladder; 21; 22; 23; 24; 51; 65;71;80; Ladder | 59 |
| Obr. 13 Gelová elektroforéza vzorků po selektivní amplifikace na 3% agarózovém gelu - pořadí vzorků: Ladder; vzorky s primerem <i>MseI</i> AGT: 21, 22, 23, 24; Ladder; vzorky s primerem <i>MseI</i> ATT: 21, 22, 23,24; Ladder; vzorky s primerem <i>MseI</i> ACC: 21, 22, 23, 24; Ladder | 59 |
| Obr. 14 Protokol pro izolační kit DNeasy Plant mini (QIAGEN, 2006) | 81 |
| Obr. 15. Protokol pro izolační kit Nucleo Spin (Macherey - Nagel, 2014) | 83 |
| Obr. 16 Schéma AFLP (Mueller, Wolfenbarger, 1999)..... | 84 |
| Obr. 17 Klima Třeboňska (Quitt, 1971)..... | 85 |
| Obr. 18 Geomorfologie Třeboňska (Demek, 1965)..... | 86 |
| Obr.19 Geologie Třeboňska (Svoboda, 1964) | 87 |

| | |
|--|----|
| Obr.20 Pedologie Třeboňska (VÚMOP Praha, v.v.i.) | 88 |
| Obr. 21 Vodní nádrže na Třeboňsku (VÚV Praha)..... | 89 |
| Obr. 22 Vodní toky na Třeboňsku (VÚV Praha) | 90 |
| Obr. 23 Chráněné oblasti přirozené akumulace vod, ochranná pásma vodních zdrojů a zátopová pásma na Třeboňsku (VÚV Praha) | 91 |
| Obr. 24 Ptačí oblast Třeboňsko (AOPK České Budějovice) | 92 |
| Obr. 25 Evropsky významé lokality Natura 2000 Třeboňsko (AOPK České Budějovice) | 93 |
| Obr. 26 Mapa lokalit odběrů vzorků | 94 |

10. SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tab. 1 Přehled evropsky významných lokalit v CHKO Třeboňsko..... | 40 |
| Tab. 2 Testovací vzorky pro optimalizaci izolace DNA..... | 41 |
| Tab. 3 Vzorky kolonií <i>Pectinatella magnifica</i> | 41 |
| Tab. 4 Specifické primery pro <i>Pectinatella magnifica</i> | 48 |
| Tab. 5 Výsledky izolace DNA | 57 |
| Tab. 6 Výsledek analýzy AFLP | 60 |

11. SEZNAM ZKRATEK

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

BR – Biosférická rezervace

CTAB - PVP - Cetyl trimethylamonium bromide polyvinyl pyrrolidone

DNA – Deoxyribonukleová kyselina


Et OH – Etanol

CHKO – Chráněná krajinná oblast

PCR – Polymerázová řetězová reakce

rRNA – Ribozomální ribonukleová kyselina

12. PŘÍLOHY



Bench Protocol: DNeasy Plant Mini

Note: Before using this bench protocol, you should be completely familiar with the safety information and detailed protocols in the *DNeasy Plant Handbook*.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffers AP1 and AP3/E concentrate.
- Ensure that ethanol has been added to Buffers AW and AP3/E.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

Procedure

1. Disrupt the sample material (≤100 mg wet weight or ≤20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor, the TissueLyser, or a mortar and pestle.
2. Add 400 µl Buffer AP1 and 4 µl RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert tube 2–3 times during incubation.
Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
3. Add 130 µl Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
Recommended: Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
4. Pipet the lysate into a QIAshredder Mini spin column in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Transfer the flow-through fraction into a new tube without disturbing the pellet. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
6. Transfer 650 µl of the mixture into a DNeasy Mini spin column in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥6000 x g (≥8000 rpm). Discard flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
7. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥6000 x g. Discard flow-through.
8. Add another 500 µl Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so the column does not come into contact with the flow-through.
9. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube, and add 100 µl Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature. Centrifuge for 1 min at ≥6000 x g. Repeat this step.

Obr. 14 Protokol pro izolační kit DNeasy Plant mini (QIAGEN, 2006)

5 Protocols

5.1 NucleoSpin® 96 Plant II – centrifuge processing

- For hardware requirements, refer to section 2.3.
- For detailed information on each step, see page 18.
- For use of the NucleoSpin® 96 Plant II Core kit (REF 740468.4), refer to section 2.4 regarding recommended accessories.

Before starting the preparation:

- Check if Buffer PW2 and RNase A were prepared according to section 3.
- Set incubator or oven to 65 °C.
- Equilibrate Buffer PE to 70 °C.

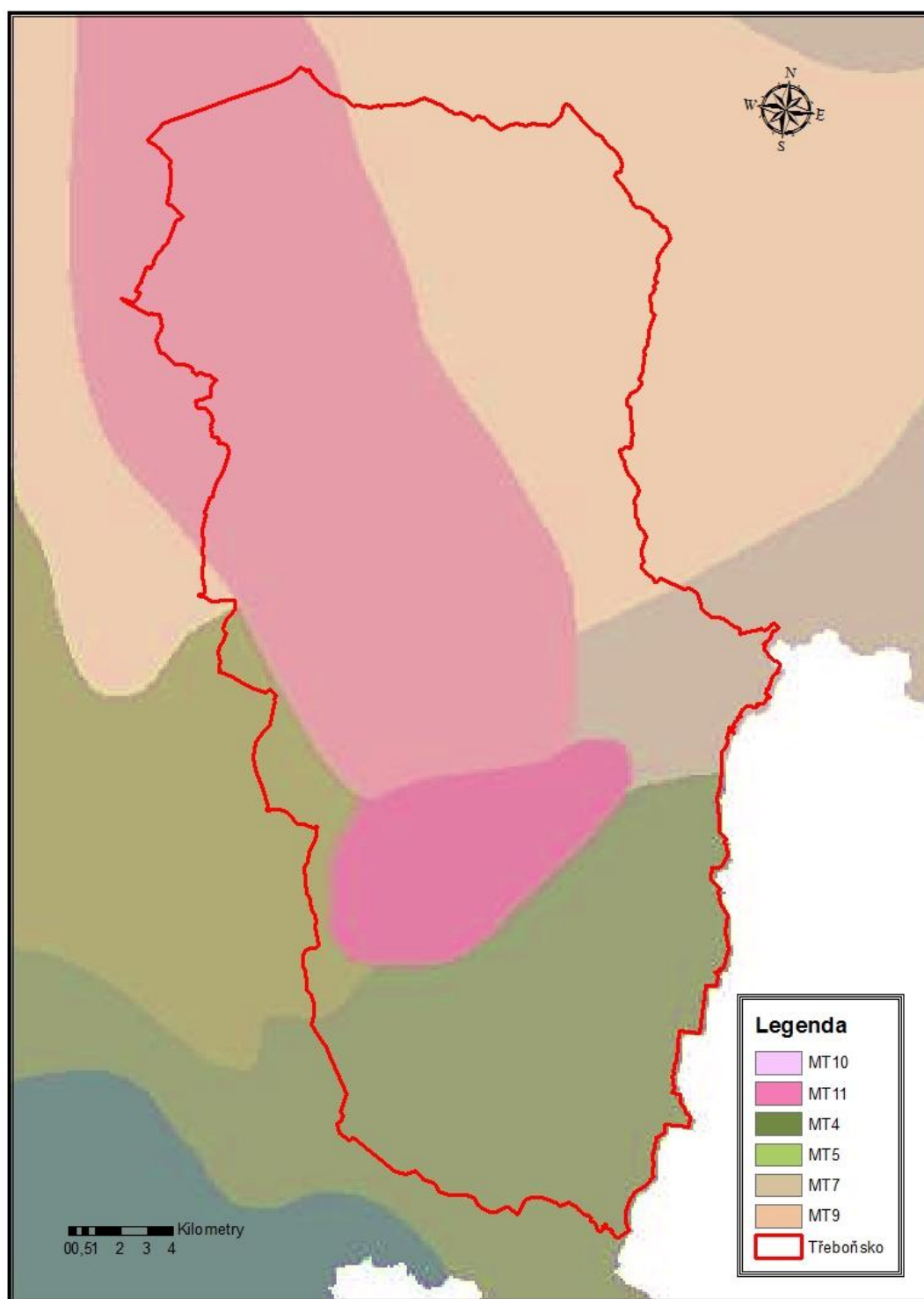
Protocol-at-a-glance

| | | |
|------------|--|---|
| 1 | Homogenize samples | Up to 100 mg wet or 20 mg lyophilized plant tissue 5,600–6,000 x g, 2 min |
| 2 a | Cell lysis using Buffer <u>PL1</u> | 500 µL PL1 10 µL RNase A Mix 65 °C, 30 min Proceed with step 3 |
| 2 b | Cell lysis using Buffer <u>PL2</u> and <u>PL3</u> | 400 µL PL2 10 µL RNase A Mix 65 °C, 30 min 100 µL PL3 Mix and incubate on ice for 5 min Proceed with step 3 |

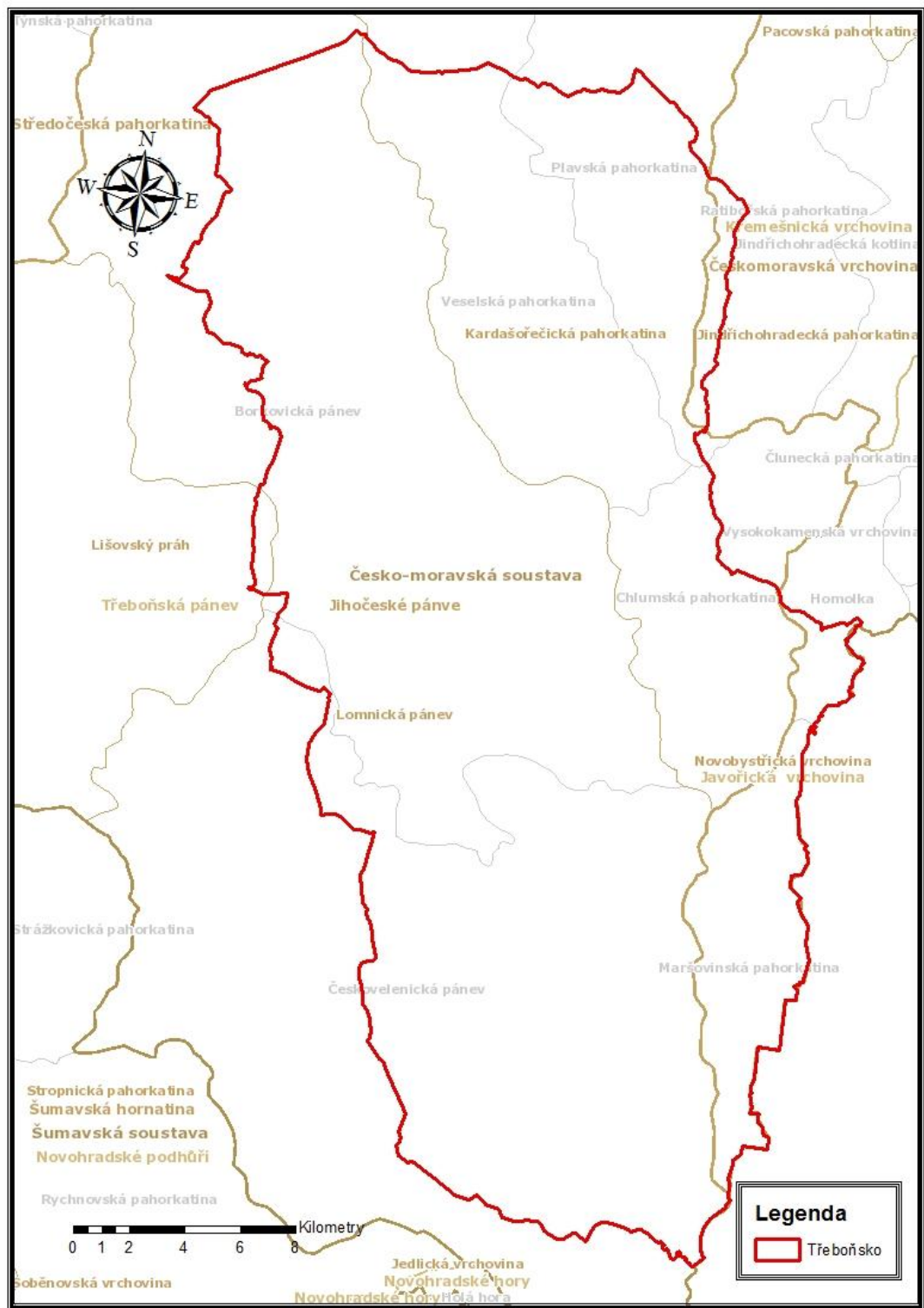
| NucleoSpin®96 Plant II – centrifuge processing | |
|--|---|
| 3 | Clear lysate by centrifugation 5,600–6,000 x g, 20 min |
| 4 | Adjust binding conditions Mix 450 µL PC with 400 µL cleared lysate |
| 5 | Transfer lysate to NucleoSpin® Plant II Binding Plate |
| 6 | Bind DNA to silica membrane of the NucleoSpin® Plant II Binding Plate 5,600–6,000 x g, 2 min |
| 7 | Wash and dry silica membrane 400 µL PW1 5,600–6,000 x g, 2 min 700 µL PW2 5,600–6,000 x g, 2 min 700 µL PW2 5,600–6,000 x g, 10 min |
| 8 | Elute DNA 100 µL PE (70 °C) (incubate 2 min) 5,600–6,000 x g, 2 min Repeat once |

MACHEREY-NAGEL – 05/2014, Rev.03 17

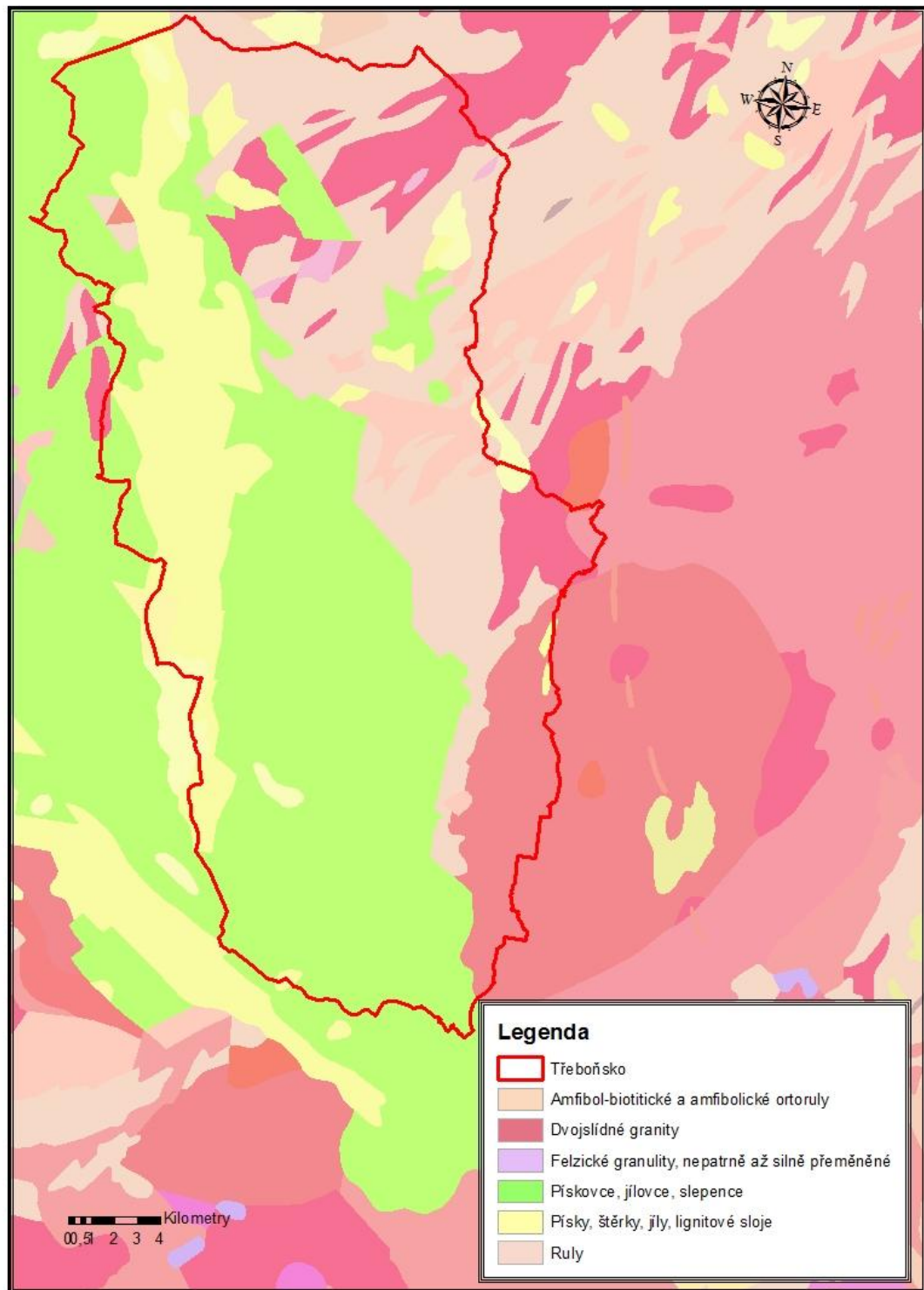
Obr. 15. Protokol pro izolační kit Nucleo Spin (Macherey - Nagel, 2014)



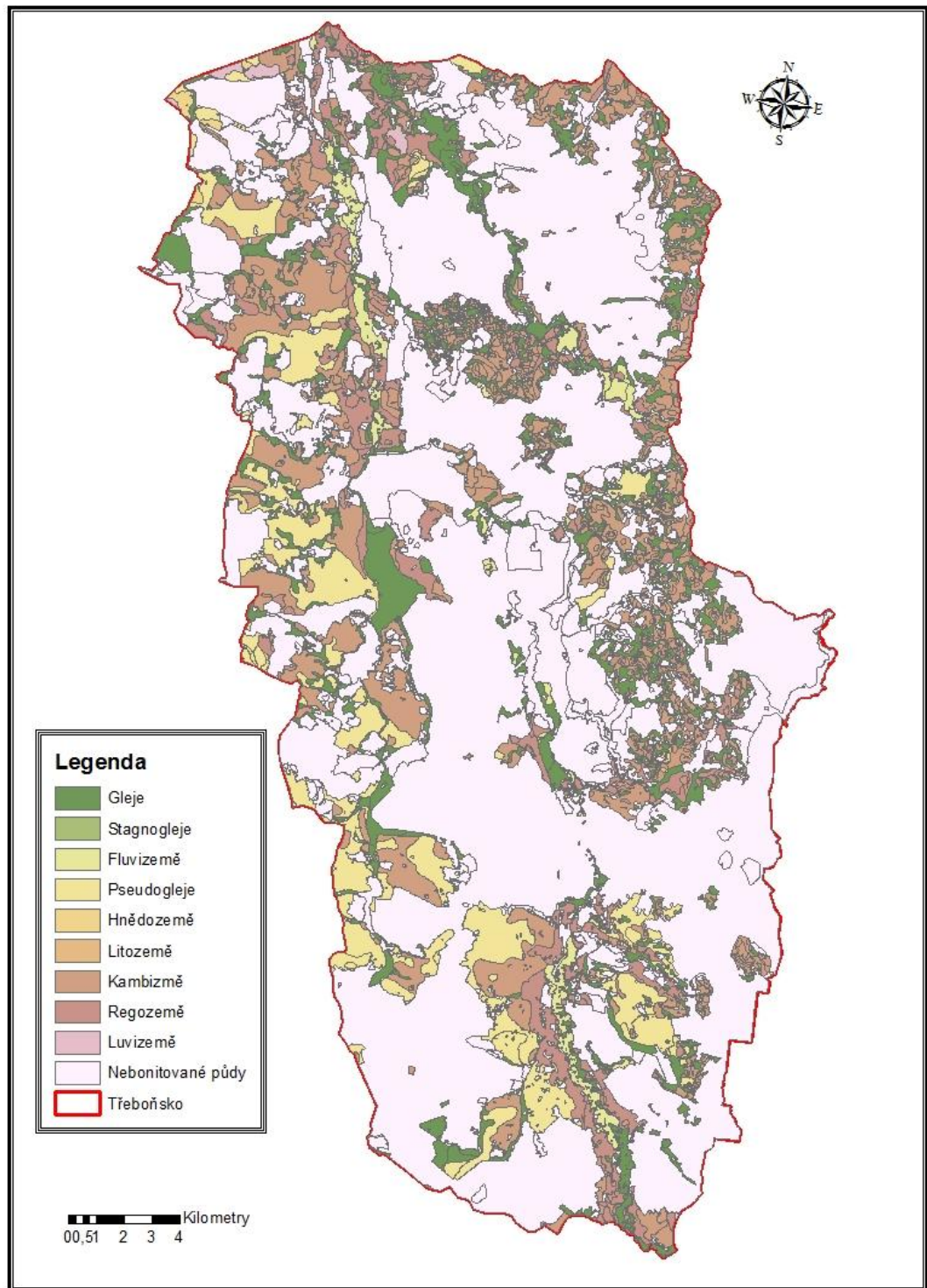
Obr. 17 Klima Třeboňska (Quitt, 1971)



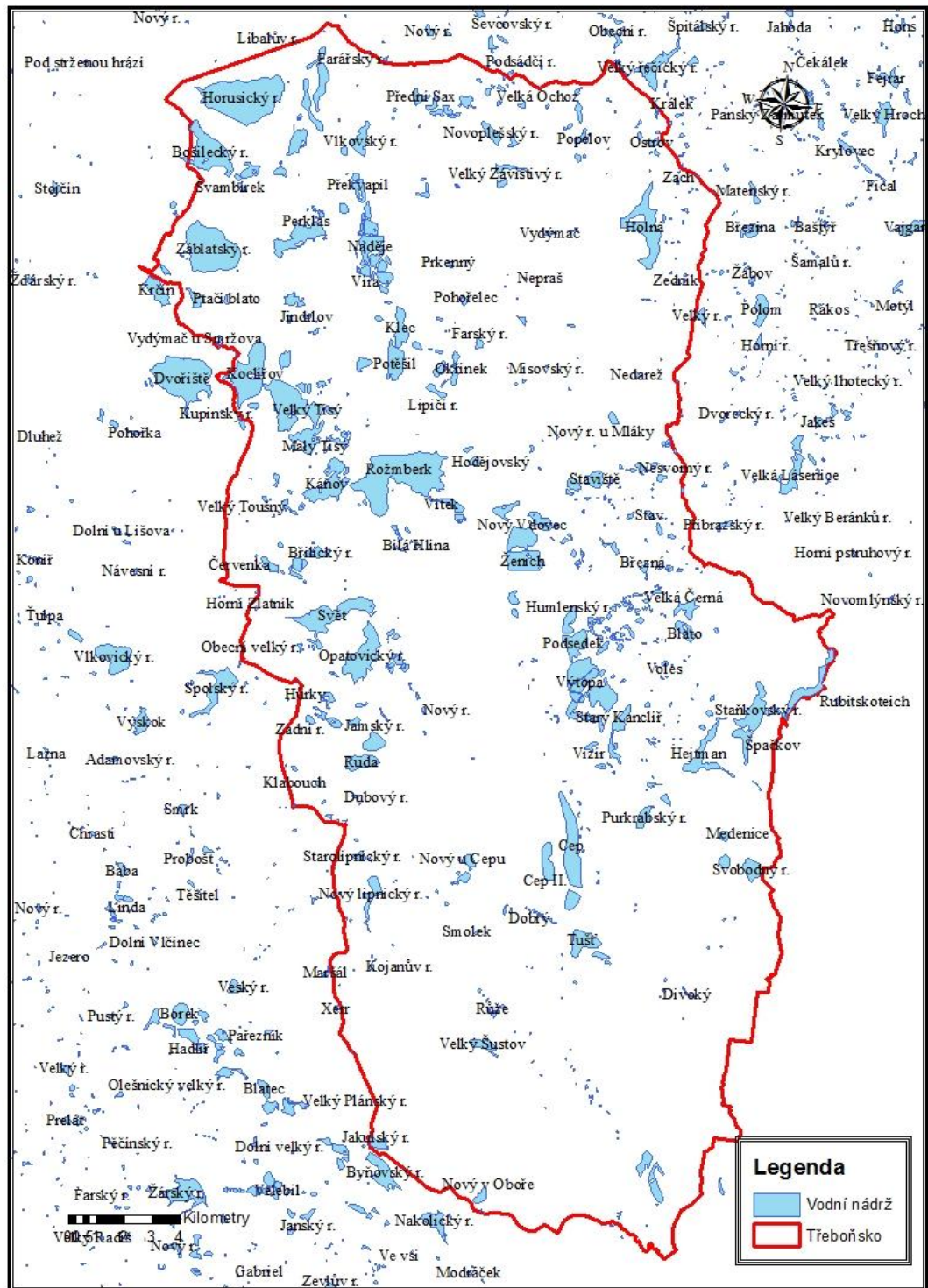
Obr. 18 Geomorfologie Třeboňska (Demek, 1965)



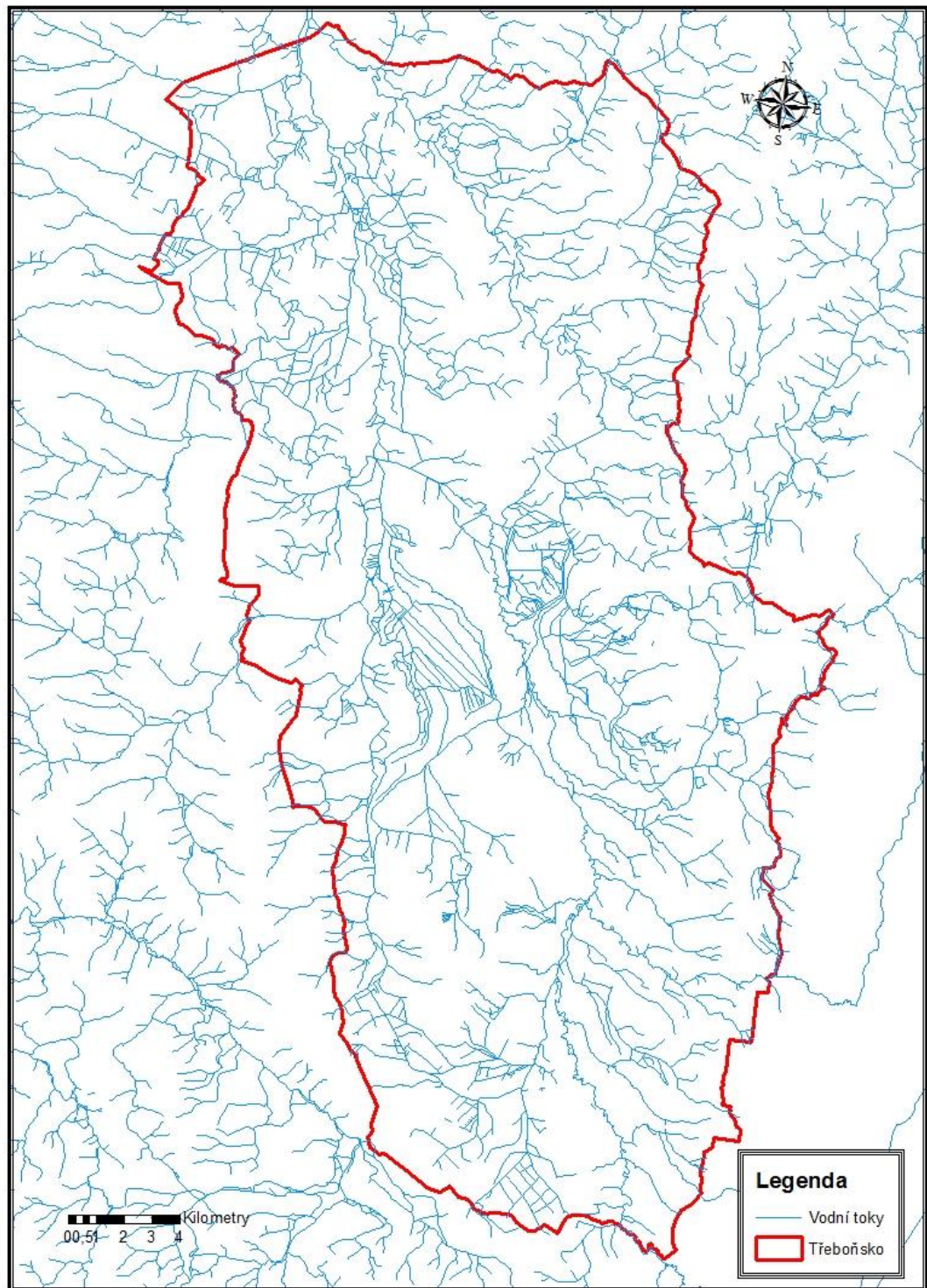
Obr.19 Geologie Třeboňska (Svoboda, 1964)



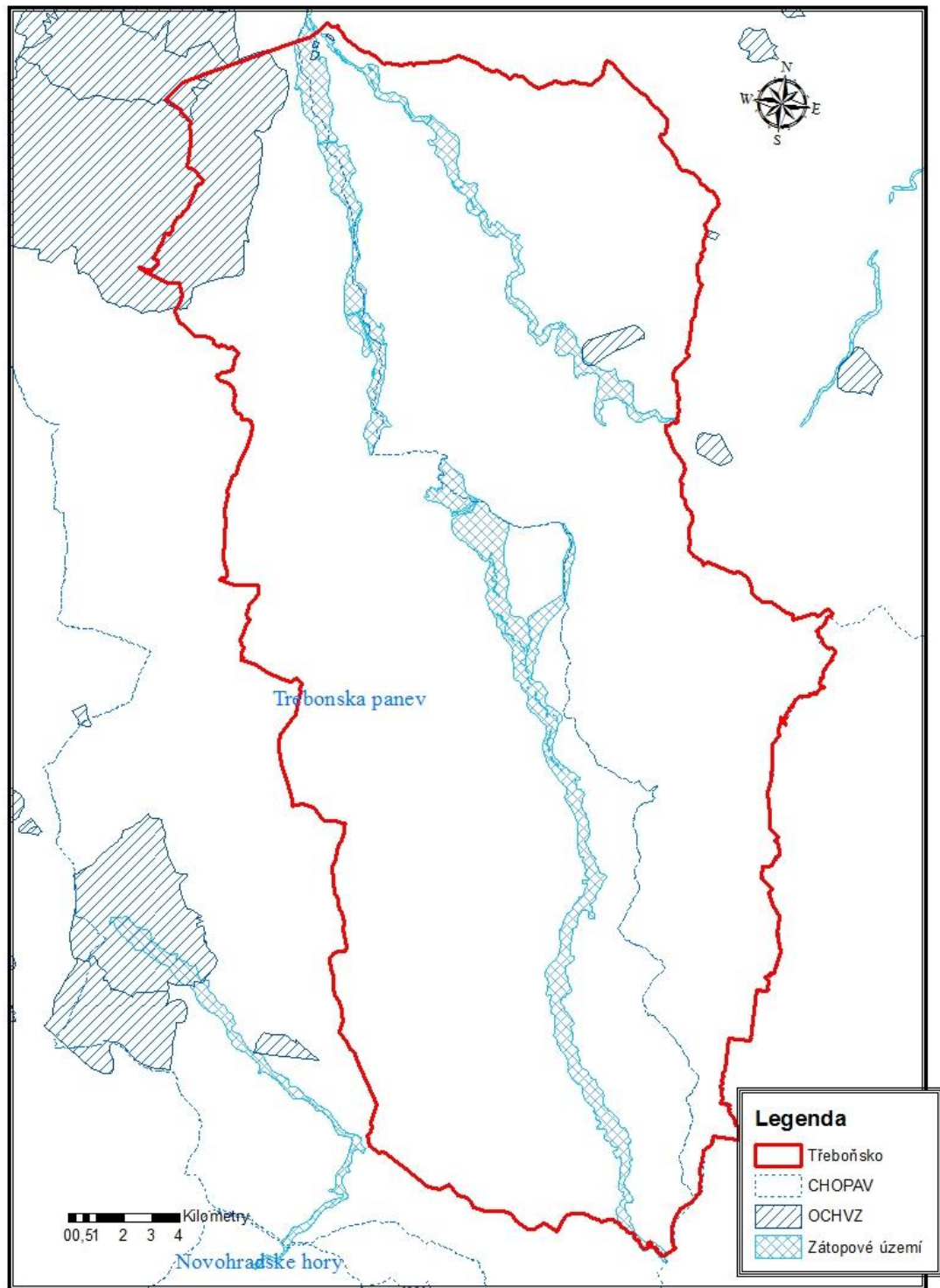
Obr.20 Pedologie Třeboňska (VÚMOP Praha, v.v.i.)



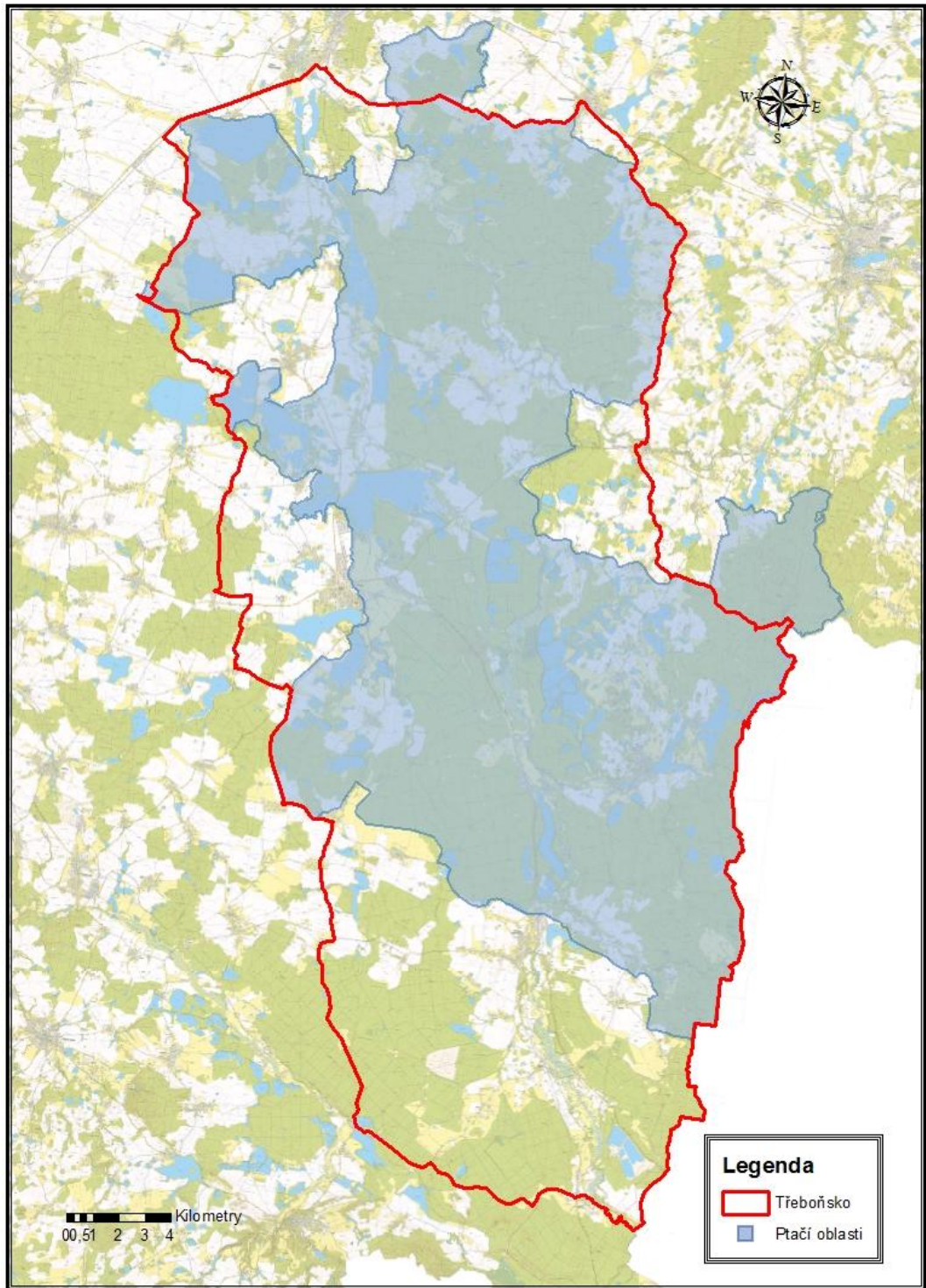
Obr. 21 Vodní nádrže na Třeboňsku (VÚV Praha)



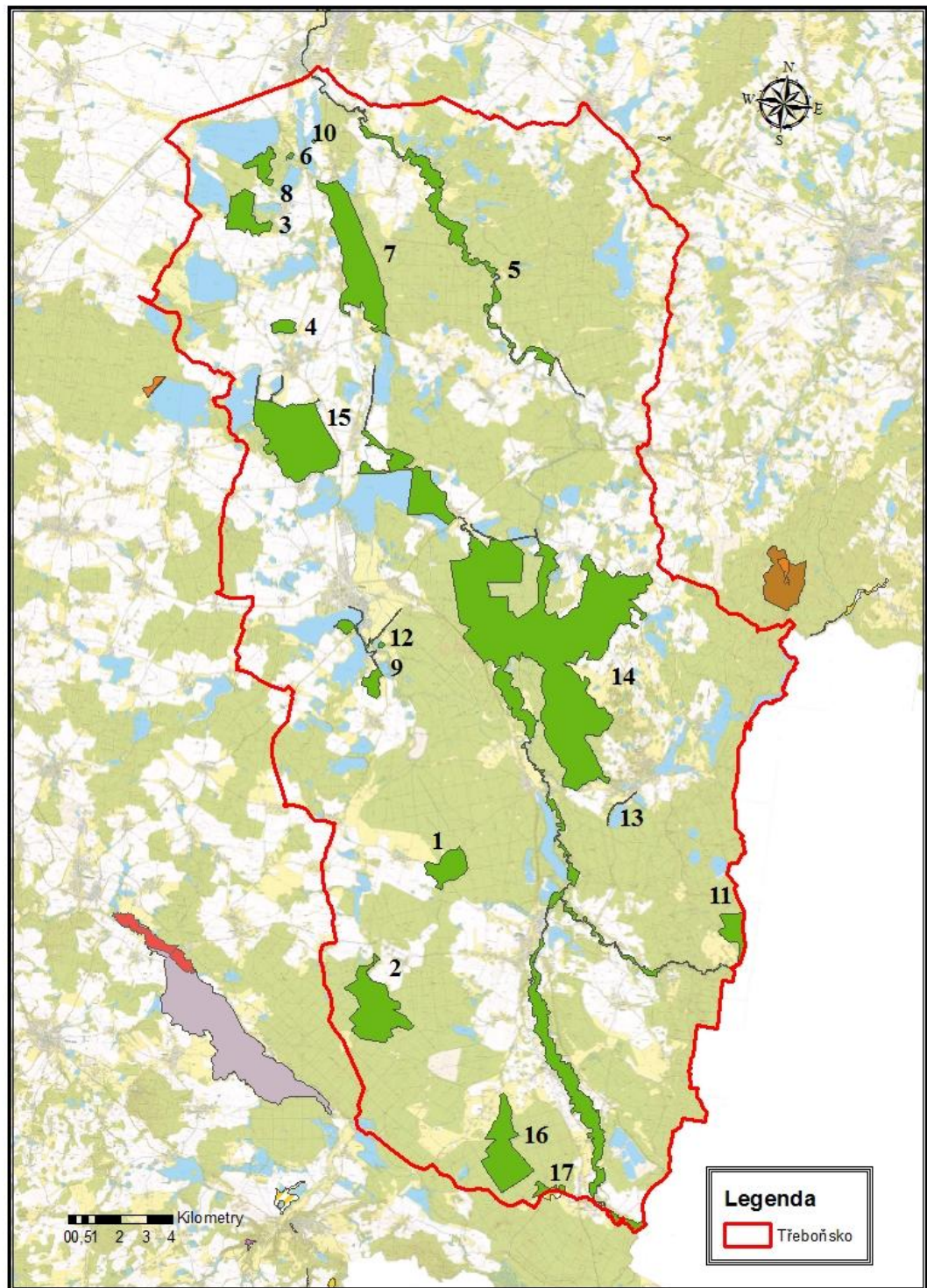
Obr. 22 Vodní toky na Třeboňsku (VÚV Praha)



Obr. 23 Chráněné oblasti přirozené akumulace vod, ochranná pásma vodních zdrojů a zátopová pásma na Třeboňsku (VÚV Praha)

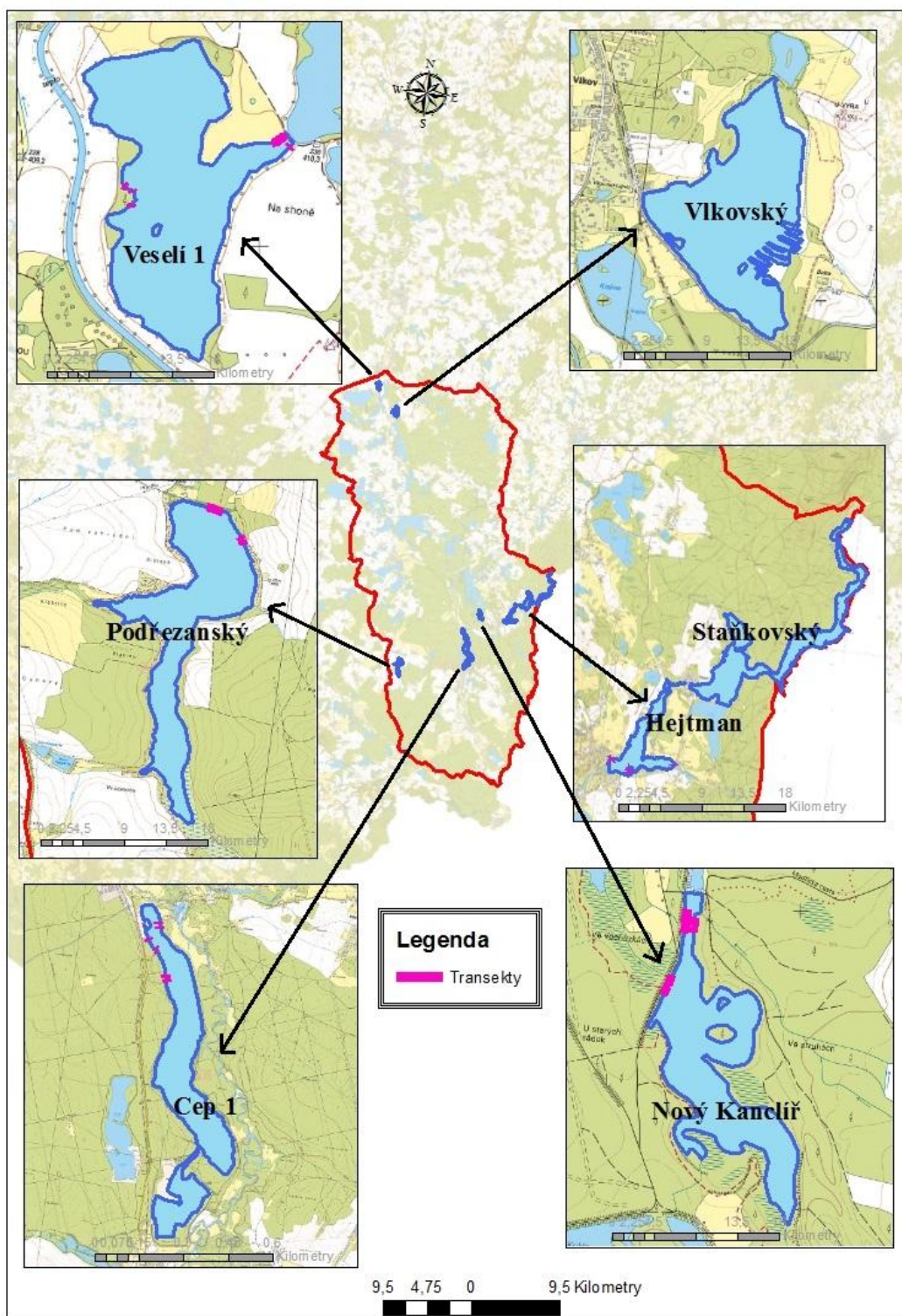


Obr. 24 Ptačí oblast Třeboňsko (AOPK České Budějovice)



Obr. 25 Evropsky významné lokality Natura 2000 Třeboňsko (AOPK České Budějovice)

*) číselné označení je vysvětleno v kapitole 5.3.9.



Obr. 26 Mapa lokalit odběrů vzorků