



Fakulta zemědělská  
a technologická  
Faculty of Agriculture  
and Technology

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

Studijní obor: Krajinná a aplikovaná ekologie

## Disertační práce

Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*  
(Leidy 1851)

Autorka práce: Ing. Vendula Moravcová

Vedoucí práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph. D.  
doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph. D.

České Budějovice  
2023

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne .....

.....

Podpis

## Abstrakt

*Pectinatella magnifica* je sladkovodním organismem ze skupiny mechovců, žijícím v prostředí oligotrofních a mezotrofních vod, ve kterých teplota během roku dosahuje 20°C. Poprvé byla nalezena a popsána Josephem Leidyem v oblasti Philadelphie roku 1851. Ačkoliv je původním místem výskytu Severní Amerika, v současné době je známá jako invazní organismus i na dalších kontinentech. Zástupci druhu *Pectinatella magnifica* žijí v koloniích o charakteristickém kulovitém tvaru, díky němuž je snadno rozpoznatelná a identifikovatelná. Tyto kulovité kolonie jsou pokryty společenstvem zooidů, které produkují gelovitou hmotu vyplňující samotný útvar kolonie. Rozmnožování mechovců je záležitostí sexuální i asexuální, kdy nepohlavní rozmnožování převažuje nad pohlavním. Produktem nepohlavního rozmnožování jsou vnitřní pupeny, tzv. statoblasty, opatřené háčky, díky kterým se mohou přichytit na jakýkoliv podklad, což umožňuje snadnou distribuci i na velké vzdálenosti skrze jinak obtížný terén. Ačkoliv se jedná o starobylou skupinu s převahou nepohlavního, tudíž klonálního, rozmnožování, pohlavní rozmnožování hraje významnou úlohu pro udržení genetické variability a adaptaci novým podmínkám. Disertační práce je zaměřena na stanovení genetické diverzity kolonií odebraných na území jižních Čech a přilehlého okolí za použití technik molekulární biologie. Pro zpracování genetických analýz byly použity dvě molekulární techniky, a to AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Obě tyto techniky využívají univerzální primery za účelem stanovení podobnosti mezi jednotlivými organismy.

**Klíčová slova:** *Pectinatella magnifica*, DNA, molekulární marker, AFLP, ISSR

## Abstract

*Pectinatella magnifica* is a freshwater organism from the bryozoan group, living in oligotrophic and mesotrophic waters where the temperature reaches 20°C during the year. It was first found and described by Joseph Leidy in the Philadelphia area in 1851. Although the original place of occurrence is North America, it is currently known as an invasive organism on other continents as well. Representatives of the species *Pectinatella magnifica* live in colonies with a characteristic spherical shape, which makes it easy to recognize and identify. These spherical colonies are covered with a community of zooids that produce a gel-like substance filling the colony itself. The reproduction of bryozoans is both sexual and asexual, with the non-sexual part exceeding the sexual part. The product of asexual reproduction are internal buds, so-called statoblasts, equipped with hooks, thanks to which they can attach to any substrate, which enables easy distribution even over long distances through otherwise difficult terrain. Although this is an ancient group with a predominance of asexual, therefore clonal, reproduction, the sexual part of reproduction enables the emergence of mutations and adaptation to new conditions. The dissertation is focused on determining the genetic diversity of colonies taken from the territory southern Bohemia and the surrounding area using molecular marker techniques. Two molecular techniques were used for processing genetic analyses, namely AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Both techniques use universal primers to determine similarity between organisms.

**Keywords:** *Pectinatella magnifica*, DNA, molecular marker, AFLP, ISSR

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala školiteli práce panu profesoru Vladislavu Čurnovi, který byl nejen odborným školitelem v rámci genetických studií, ale i po předčasném odchodu školitele doc. Rajcharda, se ujal disertační práce jako hlavní školitel, a jen díky němu bylo možné tuto práci dokončit. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Michaelu Rostovi, Ph. D. za pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků disertační práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli během období zpracování disertační práce oporou a trpělivě se mnou prošli celé období doktorského studia.

## Obsah

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Úvod.....                                                                                     | 10 |
| 1 Literární rešerše.....                                                                      | 11 |
| 1.1 Utváření těla jedinců <i>Pectinatella magnifica</i> (třída <i>Phylactolaemata</i> ) ..... | 12 |
| 1.2 Reprodukční systém <i>Pectinatella magnifica</i> (třída <i>Phylactolaemata</i> ).....     | 15 |
| 1.3 Potravní preference druhu <i>Pectinatella magnifica</i> .....                             | 18 |
| 1.4 Soužití <i>Pectinatella magnifica</i> s dalšími organismy .....                           | 18 |
| 1.5 Vliv charakteristik vodní komponenty na život kolonií <i>Pectinatella</i> .....           | 20 |
| 1.5.1 Teplota vody.....                                                                       | 20 |
| 1.5.2 Složení vody.....                                                                       | 20 |
| 1.5.3 Vliv substrátu na růst kolonií <i>Pectinatella magnifica</i> .....                      | 21 |
| 1.6 Rozšíření <i>Pectinatella magnifica</i> ve světě .....                                    | 22 |
| 1.7 Rozšíření <i>Pectinatella magnifica</i> v rámci České republiky .....                     | 26 |
| 1.8 Možnosti studia genetické diverzity .....                                                 | 27 |
| 1.9 Molekulární markery .....                                                                 | 29 |
| 1.9.1 Techniky založené na hybridizaci bez PCR reakce .....                                   | 29 |
| 1.9.2 Techniky založené na PCR reakci za použití univerzálních primerů ..                     | 29 |
| 1.9.3 Amplifikace cílových sekvencí .....                                                     | 30 |
| 1.10 Techniky identifikace produktů molekulárních markerů .....                               | 30 |
| 2 Cíle práce .....                                                                            | 32 |
| 3 Metodika .....                                                                              | 33 |
| 3.1 Materiál .....                                                                            | 33 |
| 3.1.1 Charakteristika Jihočeského kraje.....                                                  | 33 |
| 3.1.2 Seznam studovaných lokalit.....                                                         | 36 |
| 3.2 Metody.....                                                                               | 38 |
| 3.2.1 Způsob sběru vzorků <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                 | 38 |

|        |                                                                              |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2  | Vyhodnocení vývoje výskytu <i>Pectinatella magnifica</i> .....               | 39 |
| 3.2.3  | Příprava vzorků <i>Pectinatella magnifica</i> pro genetické analýzy.....     | 40 |
| 3.2.4  | Izolace DNA.....                                                             | 41 |
| 3.2.5  | Analýza izolované DNA .....                                                  | 41 |
| 3.2.6  | Analýza vlivu stáří použitého vzorku na DNA .....                            | 43 |
| 3.2.7  | Vliv zmražení vzorku na kvalitu a množství DNA.....                          | 43 |
| 3.2.8  | Analýza AFLP.....                                                            | 44 |
| 3.2.9  | Metoda ISSR .....                                                            | 48 |
| 3.2.10 | Fragmentační analýza vzorků .....                                            | 50 |
| 3.2.11 | Vyhodnocení dat po fragmentační analýze .....                                | 51 |
| 3.2.12 | Gelová elektroforéza po ISSR.....                                            | 52 |
| 3.2.13 | Vyhodnocení gelové elektroforézy ISSR.....                                   | 52 |
| 4      | Výsledky .....                                                               | 53 |
| 4.1    | Výsledky pravidelného pozorování kolonií <i>Pectinatella magnifica</i> ..... | 53 |
| 4.1.1  | Vývoj teplot Třeboňsko.....                                                  | 55 |
| 4.1.2  | Vývoj srážek Třeboňsko .....                                                 | 59 |
| 4.2    | Výsledky izolací DNA <i>Pectinatella magnifica</i> .....                     | 62 |
| 4.2.1  | Výsledky izolace DNA pomocí spektrofotometrie .....                          | 62 |
| 4.2.2  | Výsledky gelové elektroforézy pro 28 S.....                                  | 73 |
| 4.3    | Vliv stáří vzorku na množství a kvalitu DNA.....                             | 74 |
| 4.4    | Výsledek vlivu mrazu na kvalitu a množství DNA.....                          | 76 |
| 4.5    | Výsledky analýzy AFLP .....                                                  | 78 |
| 4.5.1  | Výsledky gelové elektroforézy .....                                          | 78 |
| 4.5.2  | Výsledky fragmentační analýzy – celkový stav.....                            | 82 |
| 4.5.3  | Výsledky fragmentační analýzy – pískovna Cep I.....                          | 87 |
| 4.5.4  | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Hejtman.....                          | 90 |
| 4.5.5  | Výsledky fragmentační analýzy – vodní dílo Kořensko.....                     | 93 |

|        |                                                                            |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.6  | Výsledky fragmentační analýzy – vodní nádrž Lipno I.....                   | 96  |
| 4.5.7  | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Nový Hospodář.....                  | 99  |
| 4.5.8  | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Nový Kanclíř.....                   | 102 |
| 4.5.9  | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Podřezanský.....                    | 105 |
| 4.5.10 | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Staňkovský.....                     | 108 |
| 4.5.11 | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Vápenský.....                       | 111 |
| 4.5.12 | Výsledky fragmentační analýzy – pískovna Veselí I.....                     | 114 |
| 4.5.13 | Výsledky fragmentační analýzy – pískovna Vlkov.....                        | 117 |
| 4.5.14 | Výsledky fragmentační analýzy – Vltava - Lužnice.....                      | 120 |
| 4.5.15 | Výsledky fragmentační analýzy – rybník Vydymač.....                        | 123 |
| 4.5.16 | Výsledky fragmentační analýzy pro ostatní vzorky.....                      | 126 |
| 4.6    | Výsledky analýzy ISSR.....                                                 | 127 |
| 4.7    | Shrnutí výsledků genetických analýz.....                                   | 130 |
| 5      | Souhrn nejvýznamnějších výsledků.....                                      | 131 |
| 6      | Diskuse.....                                                               | 133 |
| 6.1    | Monitoring výskytu kolonií v závislosti na počasí.....                     | 133 |
| 6.2    | Zpracování a výsledky izolace DNA.....                                     | 133 |
| 6.3    | Vyhodnocení vlivu stáří vzorku na množství a kvalitu DNA.....              | 135 |
| 6.4    | Vyhodnocení vlivu mrazu na množství a kvalitu DNA.....                     | 136 |
| 6.5    | Vhodnost zvolených molekulárních markerů pro populační analýzu.....        | 137 |
| 6.6    | Vyhodnocení výsledků genetické analýzy <i>Pectinatella magnifica</i> ..... | 138 |
| 7      | Závěr.....                                                                 | 140 |
|        | Seznam použité literatury.....                                             | 142 |
|        | Seznam internetových zdrojů.....                                           | 159 |
|        | Seznam obrázků.....                                                        | 160 |
|        | Seznam tabulek.....                                                        | 164 |
|        | Seznam použitých zkratk.....                                               | 165 |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Seznam příloh.....     | 166 |
| Přílohy .....          | 168 |
| Seznam publikací ..... | 187 |
| Životopis .....        | 189 |

---

## Úvod

*Pectinatella magnifica* Leidy (1851) je sladkovodním druhem pocházejícím původně ze Severní Ameriky, avšak v současné době obývá teplé čisté vody nejen na území celé Severní Ameriky, ale i ve většině Evropy a několika asijských oblastech. Její snadné šíření je umožněné nejen vysokou produkcí vnitřních pupenů (= statoblastů), schopných bez problémů vydržet podmínky, které jsou pro kolonie zooidů extrémní, ale i snadným přichycením k jakémukoliv podkladu pomocí háčků, kterými jsou statoblasty opatřeny. Ačkoliv se jedná o organismus beze sporu invazivní, zatím není známo, že by byla v nově osídlených oblastech přímo škodlivá či nebezpečná původním druhům ať mechovců či jiných organismů. Největší riziko představuje zejména pro lososovité ryby, vzhledem k faktu, že slouží jako mezipřenositel různým druhům parazitujícím na rybách. Z tohoto důvodu je v rámci vědeckého bádání spíše opomíjena, a kromě několika badatelů studujících skupinu mechovců je na pokraji vědeckého zájmu. Většina studií *Pectinatella magnifica* je zaměřena na potravinové vztahy vůči ostatním organismům, biologii, ekologii a fylogenetické studie.

Disertační práce je pokračováním pilotní studie na téma Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*, která byla zpracována jako diplomová práce v rámci projektu GAČR P503/12/0337 Invazní mechovka *Pectinatella magnifica* v České republice: její biologie a sekundární metabolity. Cílem této práce bylo optimalizovat techniku izolace DNA a podmínky AFLP analýzy, jako techniky použitelné pro genetické studie druhů o neznámém genomu. Optimalizace analýz byla zaměřena na invazní druh mechovky *Pectinatella magnifica*, která osídlila významné množství vodních ploch Jihočeského kraje. Výsledky pilotní studie byly použity jako základ pro zpracování disertační práce.

---

## 1 Literární rešerše

Bochnatka americká *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851), v některé literatuře rovněž nazývána jako mechovka americká, je sladkovodním zástupcem kmene mechovci (Bryozoa). Jedná se o starobylou skupinu převážně mořských živočichů, která je doplněna o významnou skupinu sladkovodních druhů (Wood, 2010).

Tabulka 1.1: Fylogenetické zařazení *Pectinatella magnifica* (Komárek, 1952)

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| ŘÍŠE  | <i>Animalia</i> (živočichové)     |
| KMEN  | <i>Bryozoa</i> (mechovci)         |
| TŘÍDA | <i>Phylactolaemata</i> (mechovky) |
| ŘÁD   | <i>Plumatellida</i>               |
| ČELEĎ | <i>Pectinatellidae</i>            |
| ROD   | <i>Pectinatella</i> (mechovka)    |
| DRUH  | <i>magnifica</i> (americká)       |

Původně kmen mechovci zahrnoval dva nepříbuzné kmeny *Entoprocta* a *Ectoprocta* (Wood, 2010). Zařazení těchto dvou kmenů do společné skupiny mělo pravděpodobně původ v podobné morfologii zástupců obou skupin. V současné době jsou rozděleny do dvou samostatných kmenů (Lacourt, 1968). Kmen *Entoprocta* (Mechovnatci), a kmen *Ectoprocta* s jiným již zmíněným označením *Bryozoa* (Mechovci). Kmen *Bryozoa* je dále dělen do tří tříd. Jedná se o třídy *Stenolaemata*, *Gymnolaemata* a *Phylactolaemata* (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 spadají stejně jako *Pectinatella magnifica* do třídy *Phylactolaemata* a pouze několik druhů je přiřazeno do třídy *Gymnolaemata* (Wood, 2010).

Třída *Stenolaemata* je skupina výhradně mořských organismů vytvářejících kolonie o nízké úrovni polymorfismu se schránkou tvořenou uhličitánem vápenatým. Většina zástupců této třídy je již vyhynulá, aktuálně je známý žijící pouze jediný řád (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 výrazně polymorfních koloniích, které mohou být kryty vápenatou schránkou. Ta se však nevyskytuje u všech druhů (Massard a Geimer, 2008a). *Gymnolaemata* se dále dělí na dva řády, *Ctenostomata* se schránkami bez uhličitanu vápenatého a *Cheilostomata* s vápenatou schránkou (Barnes, et al., 2009). Zvláštním znakem této třídy je rovněž absence produkovaných statoblastů.

Třetí skupinou kmene *Ectoprocta* je třída *Phylactolaemata* (mechovky), která je tvořena výhradně sladkovodními druhy s monomorfními koloniemi (Massard a Geimer, 2005). V dnešní době je zde 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).

### **1.1 Utváření těla jedinců *Pectinatella magnifica* (třída *Phylactolaemata*)**

*Pectinatella magnifica* je organismus tvořený gelovou hmotou žluté až žlutohnědé barvy (Brandwein, 1938). Tento druh mechovky byl poprvé popsán 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 téže roce pojmenoval nový rod „*Pectinatella*“ (Leidy, 1851). Jedná se o organismus vyskytující se ve formě kulovitých nebo obdélníkových kolonií (Obrázek 1.1), které dorůstají velikosti v průměru 0,6 m a jejich hmotnost se pohybuje od 0,25 do 70 kg (Brooks, 1929).



**Obrázek 1.1: Kolonie *Pectinatella magnifica* (vlastní foto)**

---

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 druhu *Pectinatella magnifica* jsou složeny až z několika tisíc zooidů. Tito zooidi jsou pak lokalizováni na povrchu gelové hmoty (Rodriguez a Vergon, 2002). Povrch kolonie je rozdělen do uskupení zooidů, nazývaných rozety (Obrázek 1.2), kdy jednu rozetu dává dohromady přibližně 12 až 18 jedinců (Morse, 1930).



**Obrázek 1.2: Roseta *Pectinatella magnifica* (vlastní foto)**

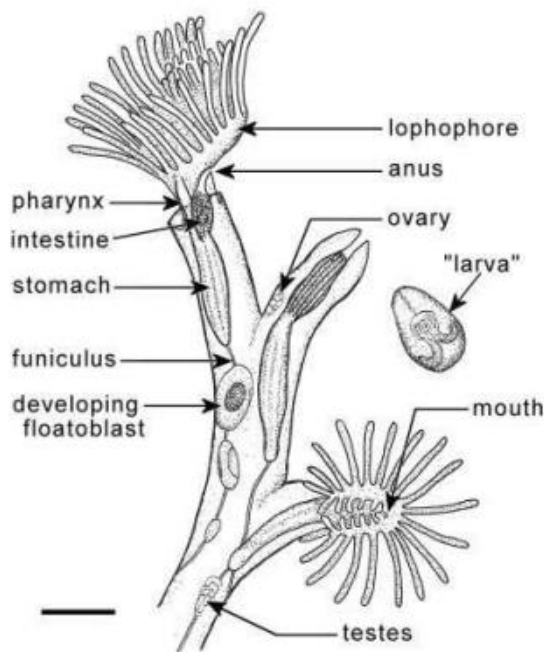
Každý zooid (Obrázek 1.3) se skládá z části tělní stěny (cystid) a z vnitřních orgánů uložených v polypidu, který může částečně vyčnívat. Zooidi umístění v blízkosti ústního otvoru jsou zbarveni červenohnědě a v blízkosti lofofru vytváří bílošedá místa (Wood, 2010). Jednotliví zooidi jsou pak vzájemně propojeni 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 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 vyúsťuje 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).



**Obrázek 1.3: Zooid *Pectinatella magnifica* (Wood, 2001c)**

Tělní stěna je složena z živých tkání nazvaných endocyst a z neživého ectocystu. 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

---

vchlípen 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 sklerotizovanou 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 *Phylactolaemata* 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. Zbývajících 1 % připadá na 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 sinicemi a pohybuje se od 0,4 % do 2,25 % (Morse, 1930).

Kolonie rodu *Pectinatella* jsou schopny prokazatelně ve svých tělech kumulovat některé látky obsažené vodě, ve které žijí. Především se jedná o různé formy dusíku a fosforu. Krom toho mají tyto kolonie také sklon k akumulaci jiných hlavních prvků jako je hořčík, ale také celé řady vedlejších látek a stopových prvků jako 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, vykazuje citlivější reakce než mnozí obratlovci i bezobratlé druhy živočichů (Pardue a Wood, 1980; Simionov, et al., 2022).

## **1.2 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). Jedinci skupiny *Phylactolaemata* jsou často schopni produkovat vajíčka i spermie a jsou tudíž hermafrodité (Zrzavý, 2006).

Sperma se vyvíjí v nápadných celcích ve funikulu jednotlivých zooidů, ze kterých se dále pasivně šíří coelomem kolonie, zatímco 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 rostlého do tělní stěny nazvaného ovicella (Wood, 2001a).

---

Embryo se postupně vyvíjí až do formy volně plovoucí struktury označené jako larva trochoforového typu, přestože technicky vzato se 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. Poté co se larva, zpravidla po setmění, uvolní z kolonie, plave kupředu koncem obsahujícím speciální žláznaté buňky a nervové centrum (Wilcox, 1906). Obvykle během hodiny dojde k usazení jednotlivých larev, které se pokryjí ektodermální tkání a následně dojde k jejich zploštění (Wood, 2001c). Tkáň přisedlé larvy 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).

Mimo pohlavní 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).

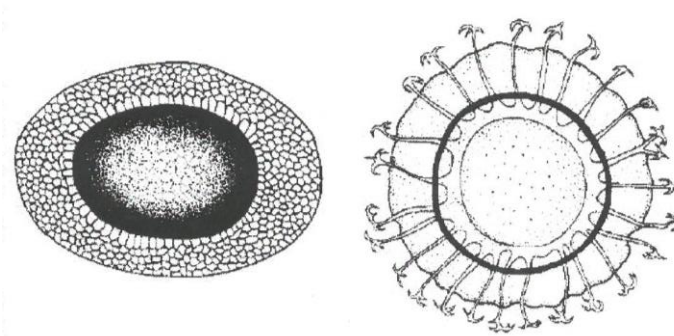
Všechny statoblasty se skládají ze dvou chlopní spojených dohromady na ekvatoriální rovině. U většiny vznášejících se statoblastů je floatoblast tvořen dvěma strukturálními úrovněmi. Vnitřní část tzv. kapsule obsahuje germinální tkáň a zásoby potravy. Vnější periplast obklopuje celou kapsuli. Je tvořen 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 na uprostřed ventrální části tělní stěny rodičovských zooidů. Vznik nového pupenu je doprovázen objevením nového zárodku pupenu, který se může, ale také nemusí dále vyvíjet. Každý

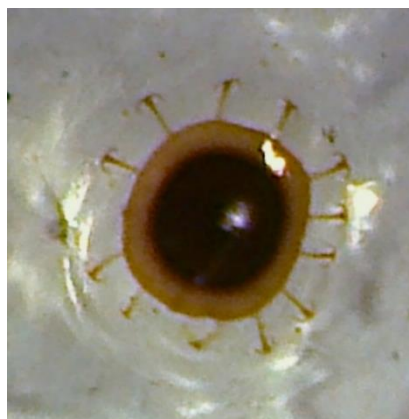
---

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* (Obrázek 1.5 a 1.6) 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).



Obrázek 1.4: Statoblasty *Pectinatella magnifica* (Barnes, et al., 2009)



Obrázek 1.5: Statoblast *Pectinatella magnifica* (Vlastní foto)

---

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).

### 1.3 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 uhynie (Williams, 1921).

### 1.4 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, Wood, 2002). Tyto parazitické druhy způsobují závažná onemocnění ledvin lososovitých ryb (Anderson, et al., 1999).

Důležité je také ovlivnění skladby řas 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 šterkopísků byly

---

zaznamenány jak vně, tak uvnitř kolonií *Pectinatella*. Jedná se například o rody *Coenococcus*, *Cymbella*, *Eunotia*, *Microchaete*, *Oscillatoria* atd. 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). Ačkoliv se *Pectinatella magnifica* a sinice často vyskytují na téže lokalitě, nadměrný výskyt sinic a rozvoj vodního květu má na stav kolonií *Pectinatella magnifica* škodlivý účinek. Během rozvoje vodního květu dochází k odčerpávání zásob kyslíku rozpuštěného ve vodě a tím i odumírání kolonií *Pectinatella magnifica*. Hlavní sinice, které se na vzniku vodního květu podílejí, jsou rody *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* a *Anabaena* (Adámek, 2008).

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 *Chironomidae*, 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, vlivem vrstevnatého nárůstu kolonií (Dendy, 1963). Vlková, et al. (2015) identifikovala, že gelovitá hmota druhu *Pectinatella magnifica* může rovněž potenciálně sloužit jako medium pro různé druhy bakteriálních kmenů jako *Aeromonas* a *Aquitale*, ale i dalších. 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 nesloužila 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). V případě kolonií, šířících se po jihovýchodní Asii, je pracováno s teorií, že byla zavlečena do sladkovodních nádrží v trávicím traktu chovných ryb (Ko, et al., 2019).

---

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

## **1.5 Vliv charakteristik vodní komponenty na život kolonií *Pectinatella***

### **1.5.1 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 tři dny stoupne teplota vody nad tuto stanovenou hranici a jakýkoliv, byť i krátkodobý výkyv pod tuto mez, vede k zastavení růstu (Balounová, et al., 2007). Déletrvající 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). 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 Nový Hospodář 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).

### **1.5.2 Složení vody**

Kolonie rodu *Pectinatella* jsou pravděpodobně euryvalentním druhem, který nemá jasné požadavky na čistotu 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). Vzhledem k vysokému počtu vodních nádrží eutrofního až hypertrofního typu, dle Pechar (2000) do těchto kategorií lze zařadit většinu rybochovných rybníků, nepředstavuje výskyt druhu *Pectinatella magnifica* pro rybářství významnější problém. Oproti tomu by preference vody o nižší míře trofie mohly představovat komplikace na lokalitách, kde je výskyt invazních druhů, zvláště těch méně prostudovaných, vysoce nežádoucí. Nízkou úživností se vykazuje nejen řada cenných biotopů, ale především vodárenské nádrže (Dumbrovský, et al., 2015), kde se dle pozorování začíná tento druh usazovat.

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 úživností 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).

### **1.5.3 Vliv substrátu na růst kolonií *Pectinatella magnifica***

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 orgánech vyšších rostlin *Typha latifolia* L., rodů *Nymphaea*, *Potamogeton*, *Alisma*, *Elodea*, *Lemna* nebo *Acorus* atd. (Šetlíková, et al., 2005). Kellicott (1882) zaznamenal rovněž výskyt na orgánech rostliny *Vallisneria spiralis*. Běžný je rovněž výskyt na povrchu kamenů i umělých materiálů např. sloupů, betonových prvků, plastových lahví a dalších odpadků ve vodě. 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 této studie kolonie *Pectinatella magnifica* vykazují preference větších částic substrátu před menšími (Joo, et al., 1992). 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).

## **1.6 Rozšíření *Pectinatella magnifica* ve světě**

*Pectinatella magnifica* byla poprvé objevena, jak již bylo výše popsáno, Josephem Leidym 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 neoarktický 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). Teorie o náhodném zavlečení byla podpořena dalším pozorováním v Severní Americe 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 *Pectinatella* 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 mechovky (Massard a Geimer, 2008b).

Osburn (1921) popsal přítomnost statoblastů v obsahu žaludku různých druhů ryb demonstrovaných např. *Micropterus salmoides*, *Pomoxis annularis* nebo *Dorosoma capedianum*. Tím, jak dochází k zvyšování rybí obsádky vodních nádrží, dochází 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 a Asii. Zajímavostí je, že doposud nebyl zaznamenán žádný výskyt druhu *Pectinatella magnifica* v tropických oblastech Afriky, jižní Asie, Austrálie a Oceánie.

V místě původního výskytu v severní Americe je zaznamenán v posledním století masivní výskyt zejména ve vodních nádržích a řekách v Iowě (Geiser, 1937) 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 Opravilová (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; Taticchi, 2011) a Guatemaly (Lacourt, 1968).

V oblasti Asie byl výskyt potvrzen v Japonsku (Oka, 1891; Mawatari, 1973; Oda, 1974) a také na území Jižní Korey (Rodriguez a Vergon, 2002). Jo, et al. (2014) uvádí rozšíření kolonií bochnatky americké po celé oblasti řek Geum a Nakdong. Ko, et al. (2019) tuto informaci rozšířil o řeky Han a Yeongsan, společně s několika nádržemi určenými pro rybí obsádku, kterou současně zmiňuje jako způsob zavlečení mechovky do širších oblastí Jižní Korey. V roce 2005 byl zaznamenán mimo jiné výskyt v oblasti provincie Zhejiang v Číně (Wang et al., 2017).

V Evropě byl 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 místa přiléhající k původní lokalitě výskytu, a to v povodí řeky Labe. Konkrétně se jednalo o lokalitu Havel u Spandau a na vodní ploše Tegeler See v blízkosti 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). V roce 1961 byl zaznamenán výskyt kolonií na území Velké Británie a Severního Irska (Grant a Jones, 2017) a Irska (Wood a Okamura, 2004).

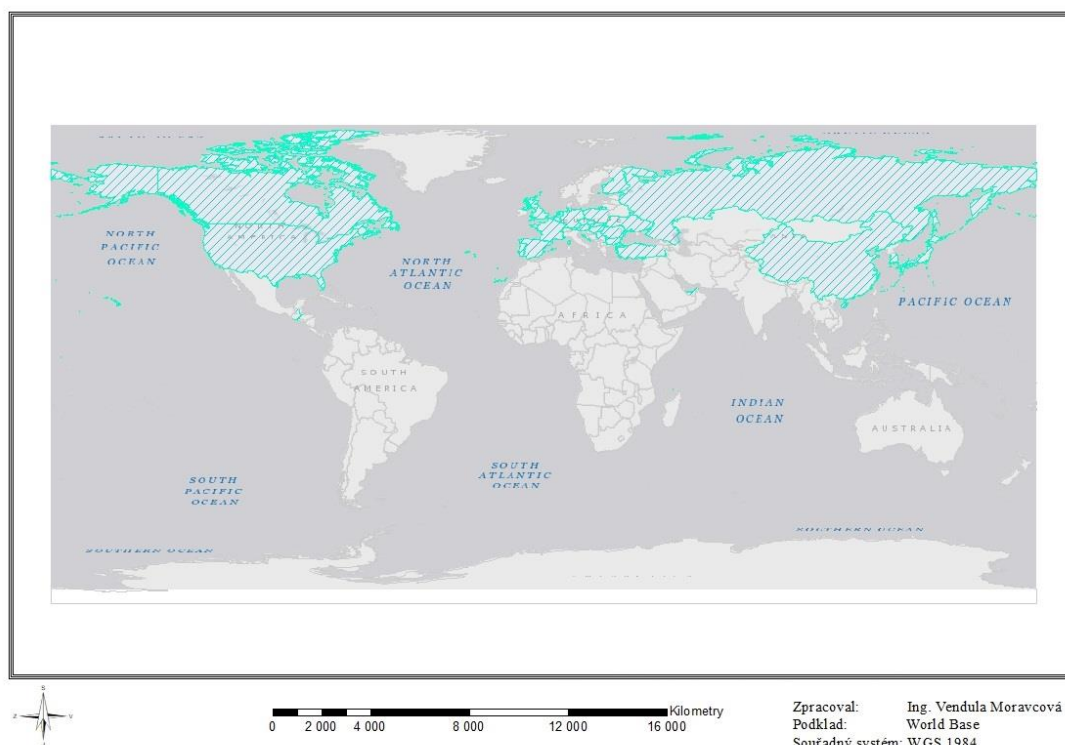
Jeden z hlavních směrů šíření od původního místa výskytu byla severo-jihní osa, tedy dále po velkých řekách a jejich propojení. Jedná se zejména o další expanzi do Německa a Francie prostřednictvím umělého vodního kanálu spojujícího řeky Labe, Wesser, Ems a Rýn (Massard a Geimer, 2005). V roce 1994 tak 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 (Massard, et al., 2013). 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 (Carroget, et al., 2005; Chabrol, 2016)). 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, 20015).

Ze směru východo-západní osy Evropy je jistě nevýznamnější šíření kolonií po povodí řeky Dunaje. Vzhledem k faktu, že Dunaj protíná více než polovinu Evropy a protéká celkovým počtem deseti států, je její šíření značně usnadněno. Z tohoto důvodu byl výskyt kolonií zaznamenán v Rakousku (Wöss, 2014), Slovensku (Schwaha a Bauder, 2021), Rumunsku (Lacourt, 1968; Serban, 2014), Chorvatsku (Koletič, et al., 2015), Srbsku (Martinovic-Vitanovic, 2010; Zoric, et al., 2015), Maďarsku (Szekeres, et al., 2013), Bulharsku (Todorov, et al., 2020; Trichkova, et al., 2022) a Ukrajině (Aleksandrov, et al., 2014). Kromě samotné řeky Dunaje byl v posledních letech zaznamenán výskyt i v povodí řeky Dněpru, kam byla podle všeho zavlečena na rybářském náčiní (Afanasyev a Lietytska, 2021). Mimo samotnou říční soustavu byly kolonie bochnatky americké zaznamenány na lokalitách jako jsou Vogézy v severo-východní Francii (Rodriguez a Vergon, 2002), v pískovnách na území Badenska Würtensberska (Německo) (Balounová, et al., 2013) a v jezeru Eifel (Hörter, et al., 2015), v Rakousku (Wöss, 2005; Bauer, et al., 2010), Polsku (Kraepelin, 1887; Kaminski, 1984), České republice (Balounová, et al., 2011; Balounová, et al., 2007), Švýcarsku v jezeru Gruere (Centre Nature Lez Cerlatez, 2010), v jezeru Vissiviere (D'Hondt a Mignot, 2010) a v 2011 v jezeru Rotsee (OID Kanton Luzern, 2012), ale i ve vzdálenějších částech jižní Evropy jako je Korsika (Notteghem, 1999) a také v jihovýchodní a východní Evropě, konkrétně v Turecku (Balounová, et al., 2013; Lacourt, 1968). Zajímavostí je, že v posledních letech se šíří zprávy o zaznamenaných koloniích i v rámci severní Evropy. Mezi nimi jsou zprávy o výskytu v jižní oblasti Finska (Vuorio, et al., 2018; Leinonen, et al. 2019; Selänpää, 2022), v Litvě (13. Šatkauskienė, et al., 2018) a v Rusku, konkrétně na hranici s Finskem (Vinogradov, 2011) a oblasti Petrohradu (Starunova, et al., 2021). Mimo záznamy v odborné literatuře je provozována mobilní aplikace a internetová stránka iNaturalist, do které mohou amatérští pozorovatelé po celém

světě přidávat záznamy o nálezích jednotlivých druhů, včetně jejich fotodokumentace a přesných souřadnic nálezů. Díky této aplikaci byl zjištěn výskyt druhu *Pectinatella magnifica* i na území Portugalska (povodí řeky Douro), Španělska (řeka Augeda), Ukrajiny (Vyžhorod) a Spojených Arabských Emirátů (Jazeerat al Marjan) (gbif.org,2022). Obrázek 1.6 vyobrazuje světové rozšíření kolonií *Pectinatella magnifica*.



Obrázek 1.6: Rozšíření *Pectinatella magnifica*

## 1.7 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 Podřezanský, 2006 rybník Hejtman a přehradní nádrže Hněvkovice a Orlík. V roce 2007 byly nové výskyty zaznamenány také na rybníku Nový Kancelář a pískovných 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 rybničních 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).

### **1.8 Možnosti studia genetické diverzity**

Studium genetické diverzity je jedním z aspektů důležitých pro ochranu a zachovávání biologické rozmanitosti, která je nezbytnou pro zachování života na Zemi, a z tohoto důvodu je zahrnuta v Úmluvě o biologické rozmanitosti (Slatkin, 1977). Přestože je genetická diverzita nedílnou součástí biologické rozmanitosti, stále patří mezi její méně známé prvky a je tak i nejméně chráněná. Genetická diverzita je uváděna jako přirozená zásobárna variabilních genotypů využitelných ve šlechtění a biotechnologiích (Laikre, et al., 2010).

Pro ochranu genetické diverzity má hlavní význam výzkum vztahů mezi konkrétními jedinci založený na spolehlivém rozlišení jejich podobnosti. 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 (druhová diverzita) a ekosystémů (ekologická diverzita) (Mendel, et al., 2008).

Zdrojem genetické rozmanitosti jsou dědičné vlohy obsažené v genotypu (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 (Nei, et al., 1975). Jakékoliv narušení této variability jednoznačně snižuje schopnost populace přizpůsobit se novým podmínkám. Genetická diverzita tak vytváří základnu pro vyšší úroveň biodiverzity (Laikre, et al., 2010). 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 vnitrodruhové 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 (Slatkin, 1987). Můžeme tak stanovit lokální tok genů, migraci nebo populační strukturu (Hudson, et al., 1992). 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). V případě, že se jedná o druhy s vysokou příbuzností jednotlivých jedinců, může být genetická diverzita založena na rozdílech několika unikátních alel (Slatkin, 1985).

Nástrojem pro studium genetické diverzity je analýza genomu. 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 (Sršeň a Sršňová, 2000). U prokaryot slouží většina DNA ke genové expresi, u eukaryot má většina DNA negenovou funkci, která se podílí především na regulaci (Church a Gilbert, 1984). Obsahuje náhodné opakující se sekvence, které mohou posloužit k identifikaci nositele (Campbell a Markl, 1997). K identifikaci genetické diverzity může být využita i kódující část genomu, tzv. genoform. U prokaryot se jedná o jeden chromozom a plazmidy, u eukaryot jde o jaderné a mimo jaderné chromozomy (mitochondrie, chloroplasty) a zřídka také plazmidy (Kapitonov a Jurka, 2006).

Kódující i nekódující částí genomu slouží jako nástroj pro identifikaci druhů i jednotlivých organismů. K tomuto účelu byly vyvinuty techniky identifikace označované jako molekulární markery (O'Malley a Whetten, R., 1997).

---

## 1.9 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 rozřadit do několika kategorií (Awise, 2012).

### 1.9.1 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 restrikčním štěpení DNA pomocí endonukleárních restriktáz, separaci restrikčních fragmentů pomocí elektroforézy a hybridizaci se specifickou sondou. Tato sonda má podobu palindromů (Peng, et al., 1994). Hybridizovaný produkt je následně analyzován pomocí Southernova přenosu (Awise, 2012).

### 1.9.2 Techniky založené na PCR reakci za použití univerzálních primerů

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

Mezi tyto metody zařazujeme především RAPD analýzu (Powell, et al., 1996). *Random Amplified Polymorphic DNA* představuje techniku, při které jsou jako primery používáme krátké náhodné hexamery až dekamery (Hadrys, et al., 1992). V tomto případě je používán pouze jeden primer, který nasedá na protiběžných řetězcích DNA. Amplifikované produkty jsou separovány na agarózovém gelu za přítomnosti ethidium bromidu 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), které jsou komplementární k adaptorům (Rademaker, et al., 1997). Primery využívající sekvence rozpoznávané restrikčními

---

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).

### **1.9.3 Amplifikace cílových sekvencí**

Nevýhodu metod založených na použití primerů o náhodném pořadí nukleotidů je nedostatek znalosti o charakteru markerů ve smyslu dominance a ve smyslu převodu alel do lokusu (Powel, et al. 1996). Tyto 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).

Jestliže jsou SSR lokusy klonovány a sekvenovány, potom také mohou být navrženy primery pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů STMS. Ty jsou obvykle označovány jako SSR markery (Powell, et al., 1996). Každý pár primerů identifikuje single-lokus, který díky vysoké proměnlivosti SSR lokusů může mít mnoho alel (Waeschenbach, et al., 2009).

Další metodou, která je hojně využívána je technika *Inter Simple Sequence Repeat* (Hartl a Clarck, 1997). Tato technika je založena na odhalování polymorfismu v oblastech ohraničených mikrosatelity (SSR) (Pradeep Reddy, et al., 2002), kde jako primer slouží mikrosatelitová sekvence 1–4 repetitivně se opakujících nukleotidů (Bornet a Branchard, 2001).

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

## **1.10 Techniky identifikace produktů molekulárních markerů**

Pro každý molekulární marker existuje vhodná metoda, která je používána pro vyhodnocení získaných výsledků (Ouellette a Baxevanis, 2001). V případě technik založených na hybridizaci, jsou získané fragmenty DNA separovány pomocí gelové elektroforézy (Gilbert a Feigon, 1999). Denaturovaná DNA je následně přenesena na nitrocelulóзовou či nylonovou membránu, která je přiložena ke gelu se separovanými molekulami, které jsou během nebo po přenosu denaturovány. Získaný produkt je označen sondou, odhalující požadované fragmenty. Fragmenty, které se se sondou nespojí, zůstanou při následném vyhodnocení neviditelné

---

(Marcadet, et al., 1989). Takto získané fragmenty jsou později exponovány na fotografický papír, ze kterého jsou odečteny výsledky hybridizace (Tanksley, et al., 1989).

Pro většinu molekulárních markerů je jako technika analýzy produktu používána elektroforéza za použití agarozového nebo polyakryamidového gelu (Brown, 2007). Využití agarozového gelu umožňuje rychlou a snadnou separaci produktů PCR, kdy separační schopnost gelu je určena jeho hustotou, a tím i velikostí pórů, kterými jsou fragmenty přenášeny (Lee, et al., 2012).

Všechny techniky gelové elektroforézy jsou následně exponovány pod UV světlem a produkt separace je vizualizován (Bier, 2013).

Jako stále více se rozšiřující technikou analýzy produktů molekulárních markerů se používají technologie založené na kapilární elektroforéze pomocí sekvenačních přístrojů (Grossman a Colburn, 2012). Tyto technologie umožňují rychlé a přesné vyhodnocení získaných produktů, díky použití speciálně označeného strojově čitelného primeru, který rovnou vyhodnocuje získaný produkt a převádí výsledky elektroforézy do digitální podoby (Harstad, et al., 2016).

---

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo stanovit genetickou diverzitu kolonií *Pectinatella magnifica* na území České republiky. Kromě hlavního cíle, byly stanoveny cíle vedlejší, a to monitoring průběžného stavu kolonií mechovky na vodních nádržích, stanovení vlivu délky skladování odebraných vzorků na množství a kvalitu DNA a stanovení vlivu mrazu na množství a kvalitu DNA u studovaných vzorků.

Hlavní hypotézou bylo, že celková genetická diverzita kolonií *Pectinatella magnifica* bude celkově velmi nízká, vzhledem k převažujícímu klonálnímu způsobu rozmnožování.

Další hypotézy byly metodického charakteru a týkaly se vlivu stáří a způsobu uchování vzorku na kvalitu/kvantitu DNA, se kterou bylo pracováno. Vzhledem k uchovávání vzorku v řízených podmínkách při -20 °C bez opakovaného zamrazování a rozmrazování, které by mohlo vzorek poškodit, byla stanovena hypotéza, že by délka zamražení vzorku neměla významně ovlivňovat výtěžnost DNA.

Jako třetí hypotéza byl zvolen vliv krátkodobého zamražení vzorku na výtěžnost DNA. Vzhledem k předpokladu, že uchovávání vzorku v řízených podmínkách -20 °C nebude výrazně ovlivňovat výtěžnost DNA, byl stanoven předpoklad, že při krátkodobém zmražení kolonie *Pectinatella magnifica* nebude ovlivněno množství ani kvalita vytěžené DNA.

---

### 3 Metodika

Experimentální část disertační práce vycházela z metodiky vypracované během předchozí diplomové práce na téma Studium genetické diverzity kolonií druhu *Pectinatella magnifica*. Živočišný materiál použitý pro diplomovou práci byl opětovně využit i v pokusech určených pro disertační práci, kde plnil účel referenčních vzorků, pro ověření správnosti získaných výsledků. Většina použitých vzorků byla odebrána na území Jihočeského kraje, se zvláštním zaměřením na CHKO Třeboňsko, kde dochází k dlouhodobému pravidelnému monitoringu druhu *Pectinatella magnifica*.

#### 3.1 Materiál

Materiál pro potřeby disertační práce byl odebrán na území Jihočeského kraje. Z tohoto důvodu byly v následující kapitole podrobně rozebrány přírodní podmínky spolu s hlavními hospodářskými faktory, které mohou přírodní podmínky ovlivňovat.

##### 3.1.1 Charakteristika Jihočeského kraje

Rozloha Jihočeského kraje je 1 005 800 ha, což činí zhruba 12,8 % rozlohy České republiky. V Jihočeském kraji žije okolo 637.047 obyvatel o hustotě zalidnění přibližně 64 obyvatel na km<sup>2</sup> (czso.cz). Administrativně je území rozděleno do 7 okresů: České Budějovice, Český Krumlov, Jindřichův Hradec, Písek, Prachatice, Strakonice a Tábor (Jeřábek, 1999).

Jihočeský kraj spadá z geomorfologického hlediska do Hercynského systému, provincie Česká vysočina. Tato provincie je rozdělena na území Jihočeského kraje na dvě hlavní soustavy – Šumavskou a Českomoravskou (Svoboda, 1964). Šumavská soustava je tvořena pouze podsoustavou Šumavská hornatina, zatímco v rámci Českomoravské soustavy se dále nachází tři podsoustavy, a to Středočeská pahorkatina, Českomoravská vrchovina a Jihočeské pánve, kdy průměrná nadmořská výška se pohybuje okolo 400 m n. m. (Bína a Demek, 2012). Třeboňská pánev, která je hlavním zdrojem genetického materiálu pro potřeby disertační práce, se rozprostírá v okolí města Třeboně. Její území zasahuje na jihovýchodě až k hranici s Rakouskem, severně zasahuje k Soběslavi a Bechyni (Demek, 1965).

Skalní podklad jihočeské oblasti tvoří především krystalinikum moldanubika. Charakteristická je především jeho poměrně složitá stavba a velká rozmanitost. Nejčastější druhy hornin jsou pararuly a migmatity a dále granulity a ortoruly. V rámci Jihočeských pánví se potom nachází kvartérní sedimenty především šterkopísky

---

a cihlářské suroviny (Němec, 2009). V menším rozsahu jsou zde zastoupeny i netypické suroviny jako žáruvzdorné a ostatní jíly, polodrahokamy (vltavíny, granáty, opály...), grafit a vzácné kovy jako stříbro či zlato (Svoboda a Beneš, 1964). Z hlediska půd jsou Jižní Čechy velmi pestré. Nachází se zde zástupci téměř všech půdních typů, s převahou různých variant kambizemě (Němec, 2001). V horských a podhorských oblastech potom převažují gleje, pseudogleje a podzoly. Okolo řek, v jejich údolních nivách, se nachází různé druhy fluvizemí (Kozák a Němeček, 2009).

Jihočeský kraj má podnebí přechodného středoevropského typu, se střídavým vlivem oceánu na západě a pevniny na východě, se značným vlivem místních poměrů. Významnou úlohu má zvláště expozice terénu vůči převládajícímu proudění vzduchu (Pokorný a Kučerová, 2000). Podle klasifikace klimatických oblastí spadá většina území Jihočeského kraje do mírně teplé a mírně vlhké nebo vlhké oblasti, která v nadmořských výškách kolem 750 m přechází v mírně chladnou oblast (Quitt, 1971).

Hydrologicky nejdůležitějším tokem v Jihočeském kraji je řeka Vltava, která zde pramení a protéká územím kraje od jihu na sever. Krom malých potoků jsou nejvýznamnějšími přítoky na území kraje z pravé strany Malše a Lužnice, nejvýznamnějšími levostrannými přítoky jsou pak Otava a Blanice. Tato přirozená kostra vodních toků je doplněna o umělé stavby vodních kanálů. Na Třeboňsku se jedná o dvě nejznámější vodní cesty, Zlatou stoku a Novou řeku, a v horském terénu Šumavy tzv. Schwarzenberský a Vchynicko – Tetovský plavební kanál (Culek a Grulich, 2010).

Na území Jihočeského kraje se také nachází velké množství vodních nádrží, z nichž pouze jediná nádrž má přirozený původ, a to Plešné jezero ledovcového původu s rozlohou 7,48 ha, zatímco ostatní vodní nádrže jsou produktem lidské činnosti (Heřmanová, 2012). Mezi umělé vodní nádrže patří především několik velkoplošných přehradních nádrží na Vltavě ale i na menších vodních tocích. K největším se řadí část Vltavské kaskády, skládající se z vodního díla Lipno I a Lipno II, Hněvkovice, Kořensko a Orlík. Na území Jihočeského kraje se pak nachází ještě důležitá vodárenská nádrž Římov na řece Malši a vodní nádrž Husinec regulující tok Blanice. Charakteristickým rysem krajinného rázu jižních Čech jsou pak rozsáhlé plochy umělých vodních nádrží rybníčního typu (Hule, 2003). Rybníky jsou uspořádány do několika nezávislých soustav, a to Třeboňské (393 rybníků nad 1 ha), Jindřichohradecké (437 rybníků nad 1 ha), Hlubocké (264 rybníků nad 1 ha), Novohradské (141 rybníků nad 1 ha), Blatenské (375 rybníků nad 1 ha) a Tábořské

---

(316 rybníků nad 1 ha). Mezi největší rybníky dle výměry patří v Jihočeském kraji Rožmberk (489 ha), Horusický rybník (416 ha), Bezdrev (394 ha), Dvořiště (337 ha), Velký Tisý (317 ha), Záblatý rybník (305 ha), Dehtář (246 ha), Staňkovský rybník (241 ha), Velká Holná (230 ha) a Svět (201,5 ha) (Němec, 2006).

Horské části Jihočeského kraje s mělkými a málo úživnými půdami a drsnějším rázem klimatu patří do oblasti poměrně chudé hercynské květeny. Pro nižší polohy v oblastech Jihočeských pánví jsou charakteristická rašeliniště (blata), mokřady a louky, lemuující břehy rybníků. Na blata často navazují sušší borové lesy s borůvkou a vřesem v podrostu (Neuhäuslová, 1998). Lesy v jihočeských pánvích byly přirozeně dubové a jedlové, dnes jsou však ve velké míře rovněž nahrazeny monokulturami smrku a borovice. Lesní porosty obecně pokrývají v současné době téměř 40 % celkové plochy Jihočeského kraje (Culek, 1996).

Na území Jihočeského kraje jsou vymezeny všechny typy zvláště chráněných území podle zákona 114/1991 Sb. O ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů, a to včetně lokalit NATURA 2000. Nejdůležitějším zvláště chráněným územím je pak na území Jihočeského kraje Národní park Šumava, který je zde vymezen od roku 1991. Jedná se o největší národní park České republiky, s rozlohou na území Jihočeského kraje 34. 294 ha (celková rozloha 68. 064 ha), který tvoří cca 3,41 % jeho území. V zájmovém území jsou dále vyhlášeny tři chráněné krajinné oblasti (16,36 % území kraje, 164. 543 ha), a to CHKO Šumava, CHKO Třeboňsko a CHKO Blanský les. Na území Jihočeského kraje je rovněž vymezeno 12 národních přírodních rezervací (0,36 % území kraje, 3. 625 ha), 11 národních přírodních památek (0,07 % území kraje, 682 ha), 100 přírodních rezervací (0,48 % území kraje, 4. 829 ha), 180 přírodních památek (0,51 % území kraje, 5. 139 ha), 69 evropsky významných lokalit (16,08 % území kraje, 161. 677 ha) a 7 ptačích oblastí (14,78 % území kraje, 148. 665 ha). V souvislosti s přístupem ČR do Evropské unie byla vymezena soustava chráněných území NATURA 2000 (Vorel, 2009).

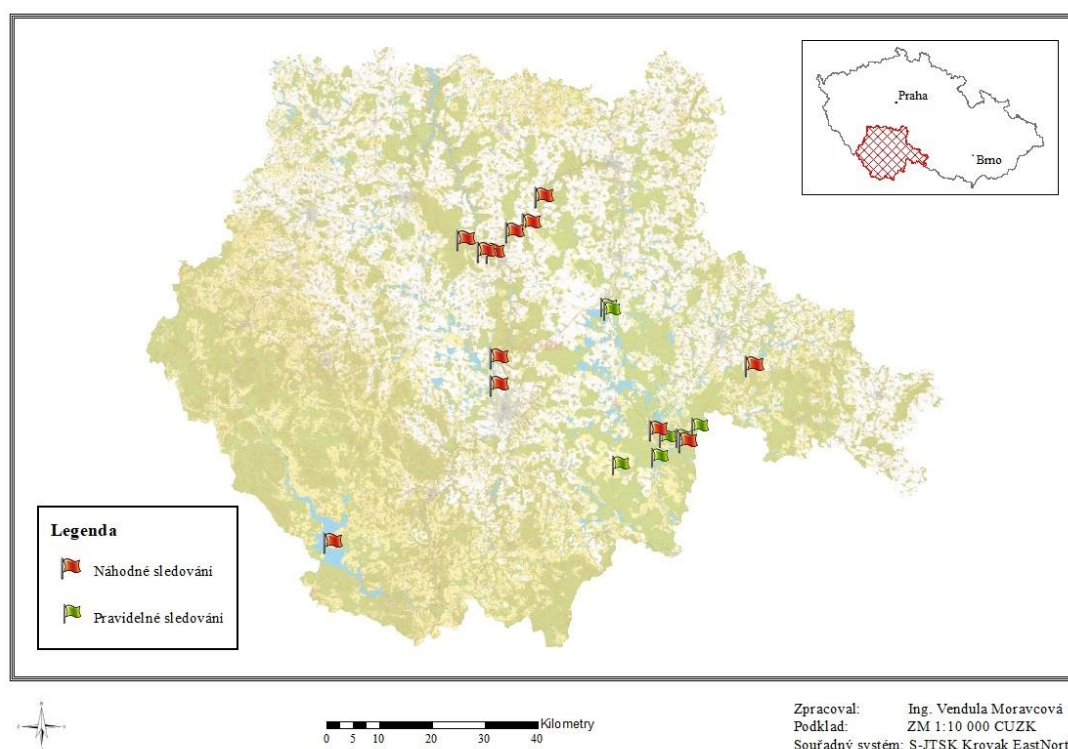
Významnou roli hraje v Jihočeském kraji zemědělská prvovýroba, kde je zaměstnáno téměř 9 % ekonomicky aktivního obyvatelstva kraje (druhé největší procento v rámci České republiky). Zemědělství se tradičně orientuje na rostlinnou výrobu v podobě pěstování obilovin (pšenice, ječmen), olejnin (řepka olejka), a ovoce (třešně, jablka, rybíz). Z živočišné produkce je pak významný chov skotu (v současné době převážně masných plemen), drůbeže (chov české husy na Nových Hradech)

a prasat. Dlouholetou tradici má v Jihočeském kraji rybníkářství. Produkce ryb pokrývá více jak polovinu všech ryb vyprodukovaných ročně v rámci celé republiky (Tlapák, et al., 1992). Z pohledu začlenění do výrobních oblastí se území Jihočeského kraje podle Němec (2001) zařazovalo až do roku 2003 do výrobní oblasti píceinářské, bramborářské a obilnářské. V současné době (po roce 2003) spadá jižní část území do výrobní oblasti horské a severní část kraje do výrobní oblasti bramborářské (Perlín, et al., 2010).

### 3.1.2 Seznam studovaných lokalit

Vzorky potřebné pro genetické analýzy byly odebrány na 23 lokalitách, z nichž 6 bylo sledováno dlouhodobě s pravidelnými odběry vzorků již od roku 2014 a zbytek byl odebírán náhodně, dle výskytu narostlých kolonií. Mezi pokusným materiálem se nacházejí 3 vzorky získané ze zahraničí, konkrétně z USA, Chorvatska a Finska.

Pro tvorbu map, vyobrazujících jednotlivé lokality byly použit program Gis Pro. Na obrázku 3.1 je vyobrazena mapa celkové studované oblasti jižních Čech.



Obrázek 3.1: Mapa lokalit jižní Čechy

**Tabulka 3.1: Seznam lokalit s odběrem vzorků druhu *Pectinatella magnifica***

| <b>Seznam lokalit s odběrem vzorků <i>Pectinatella magnifica</i></b> |              |                  |               |                   |
|----------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|---------------|-------------------|
| Lokalita                                                             | Počet vzorků | Pravidelný odběr | Náhodný odběr | Zahraniční vzorek |
| Bechyně                                                              | 7            |                  | •             |                   |
| Cep I                                                                | 15           | •                |               |                   |
| České Budějovice                                                     | 5            |                  | •             |                   |
| Dobronice                                                            | 5            |                  | •             |                   |
| Finsko                                                               | 1            |                  |               | •                 |
| Hejtmán                                                              | 22           | •                |               |                   |
| Hluboká nad Vltavou                                                  | 5            |                  | •             |                   |
| Chorvatsko                                                           | 1            |                  |               | •                 |
| Kačležský                                                            | 5            |                  | •             |                   |
| Komárov                                                              | 5            |                  | •             |                   |
| Kořensko                                                             | 20           |                  | •             |                   |
| Lipno I                                                              | 12           |                  | •             |                   |
| Neznášov                                                             | 5            |                  | •             |                   |
| Nový Hospodář                                                        | 14           |                  | •             |                   |
| Nový Kanclíř                                                         | 23           | •                |               |                   |
| Nuzice                                                               | 5            |                  | •             |                   |
| Podřezanský                                                          | 24           | •                |               |                   |
| Staňkovský                                                           | 22           | •                |               |                   |
| USA                                                                  | 1            |                  |               | •                 |
| Vápenský                                                             | 9            |                  | •             |                   |
| Veselí I                                                             | 24           | •                |               |                   |

---

|         |    |   |   |  |
|---------|----|---|---|--|
| Vlkov   | 21 | • |   |  |
| Vydymač | 19 |   | • |  |

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Způsob sběru vzorků *Pectinatella magnifica*

Na stanovených lokalitách byly vytipovány plochy, na kterých rostlo dostatečné množství pobřežních rostlin, zejména vrb, které mají sklon tvořit převisy větví, které jsou následně ponořeny pod vodní hladinu, a tvoří tak ideální substrát pro uchycení jedinců mechovců, kteří dávají základ budoucím koloniím. V případě lokalit, které byly sledovány již dříve jako součást projektu GAČR P503/12/0337 Invazní mechovka *Pectinatella magnifica* v České republice: její biologie a sekundární metabolity, byla zvolena odběrová místa v návaznosti na tento projekt. Na těchto lokalitách bylo prováděno průběžné pozorování stavu populace *Pectinatella magnifica* po celou vegetační sezonu. Během samotného odběru biologického materiálu byl zhodnocen celkový výskyt kolonií, jejich množství, hmotnost, velikost a celkový stav. Tyto parametry byly následně použity pro vyhodnocení vývoje výskytu invazního druhu *Pectinatella magnifica* v závislosti na vývoji počasí, zejména na vlivu teplot a množství srážek během letní sezony.

Z odebraných kolonií byly zvoleny takové, které již byly ve fázi uvolňování statoblastů, a byly tak vhodné pro genetické analýzy druhu *Pectinatella magnifica*. V případě, že se v dané období na dané lokalitě takové kolonie nenacházely, byly odebrány vzorky nezralých kolonií. Odběr vzorků určených pro genetické analýzy byl proveden sběrem kolonií rostlých na jednotlivých lokalitách a seškrábnutím povrchové vrstvy, obsahující směs zooidů a statoblastů (Příloha 1). Seškrábnuté vzorky byly následně rozděleny do mikrozkmavek o objemu 1,5 ml nebo 2 ml, a doplněny vodou. Takto odebrané vzorky byly uchovávány při -20 °C až do dalšího zpracování.

---

### 3.2.2 Vyhodnocení vývoje výskytu *Pectinatella magnifica*

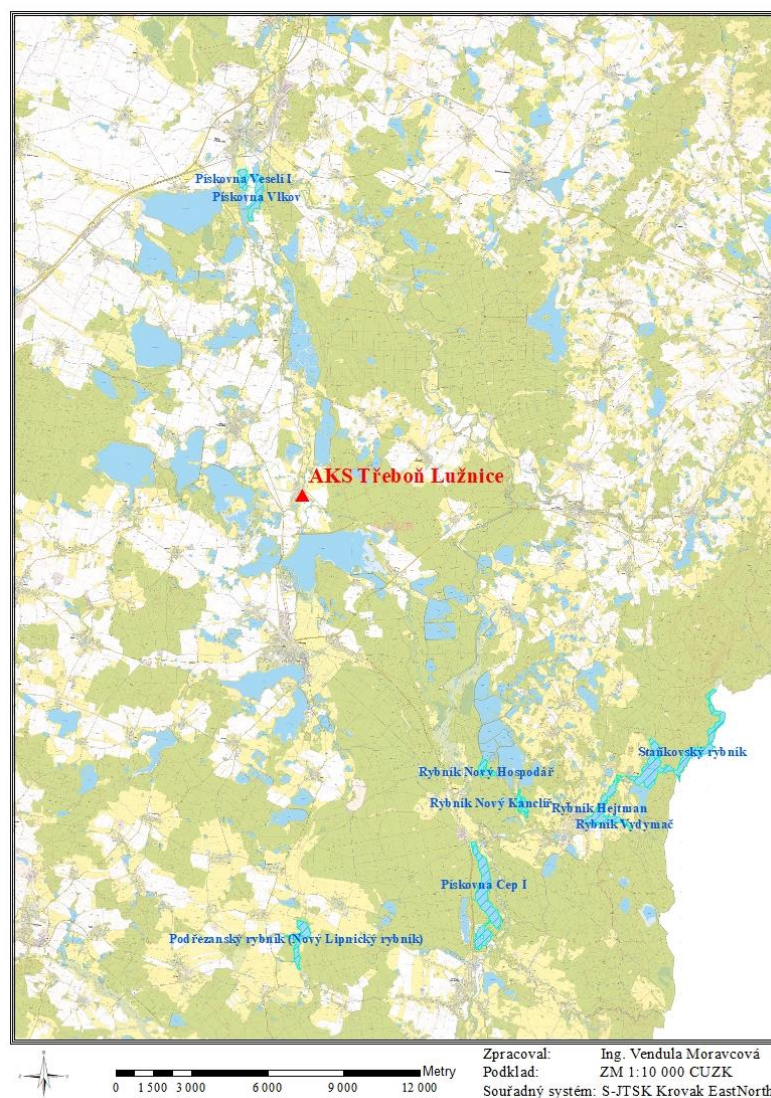
Na základě dat, získaných terénním pozorováním na lokalitách s pravidelným sledováním byl sledován vývoj kolonií druhu *Pectinatella magnifica*. Zejména se jednalo o změny v nástupu vegetačního období, změny ve velikosti kolonií, v době dozrávání kolonií a v době útlumu jejich růstu. Kromě pravidelného pozorování kolonií byl zjištěn průběh počasí na studované lokalitě Třeboňsko. Na základě pravidelného pozorování bylo stanoveno zastoupení kolonií *Pectinatella magnifica* v oblasti Třeboňska. Hodnocení bylo provedeno v období mezi červnem a září v letech 2014-2021, kdy celá sezona byla hodnocena 100 % a pro jednotlivé měsíce bylo přiřazeno procento, které reprezentovalo poměrnou část výskytu kolonií *Pectinatella magnifica* vůči celé sezóně.

Údaje pro stanovení průběhu počasí byly získány z portálu ČHMÚ ([www.chmi.cz](http://www.chmi.cz)), kde jsou k dispozici data od roku 1961 až po rok 2021. Pro potřeby disertační práce byly zvoleny údaje z meteorologické stanice Třeboň Lužnice, konkrétně průběh teplot a srážek během vegetační sezony 2014–2021, kdy docházelo k odběrům vzorků *Pectinatella magnifica* pro studium stavu a průběhu vývoje kolonií v oblasti CHKO a BR Třeboňsko. Vzhledem ke studiu stavu kolonií během hlavní vegetační sezony byly meteorologické údaje sebrány za období června až září. Pro stanovení průběhu počasí během vegetačních sezon byla použita průměrná měsíční teplota, maximální měsíční teploty, měsíční úhrny srážek a celkový počet dnů, ve kterých přšelo.

Potřebné hodnoty jsou měřeny na meteorologické stanici, a to denně. Pro stanovení průměrné denní teploty jsou prováděny čtyři měření, a to v 7, 14, 21 s opakovaným měřením v 21 hodin. Tyto naměřené hodnoty se následně zprůměrují. Díky znalosti průměrných denních teplot pak bylo možné stanovit průměrné měsíční teploty za jednotlivá studovaná období. Pro stanovení průběhu srážek a počtu dní bez srážek jsou k dispozici rovněž denní hodnoty, které jsou stanovovány meteorologickou stanicí jednou za 24 hodin, a které byly použity jako data pro stanovení průběhu průměrných měsíčních srážek na lokalitě během sledovaných období. Zjištěné meteorologické údaje byly korelovány s úrovní výskytu kolonií *Pectinatella magnifica*.

K tomuto účelu byl použit statistický program STATISTICA 12.0. Výsledky získané v programu STATISTICA byly dále převedeny do programu Microsoft Excel, kde byly vytvořeny výsledné grafy.

Obrázek 3.2 znázorňuje lokalizaci meteorologické stanice Třeboň-Lužnice a její pozici vůči studovaným vodním nádržím.



Obrázek 3.2: Pozice meteorologické stanice Třeboň-Lužnice

### 3.2.3 Příprava vzorků *Pectinatella magnifica* pro genetické analýzy

Vzorky odebrané pro genetické analýzy byly v laboratorních podmínkách vyjmuty z odběrných mikrozkmavek a pod binokulární lupou umístěny na Petriho misku (Příloha 2), kde byly za pomoci laboratorní špachtle, jehly a jemného štětečku očištěny od kontaminantů v podobě gelové matrix druhu *Pectinatella magnifica*, řas, sinic či zástupců zooplanktonu (Příloha 3). Takto připravené vzorky *Pectinatella magnifica* byly umístěny do čistých mikrozkmavek, doplněny destilovanou vodou a uskladněny v  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Před samotnou izolací DNA byly vzorky vyjmuty z mrazáku a ponechány při pokojové teplotě, dokud plně neroztály a nebyly připraveny pro další použití.

---

Po roztátí veškerého ledu byly po dobu 30 sekund centrifugovány při 1 000 rpm, aby se vzorky zachytily na dně zkumavky a bylo snazší odebrat potřebné množství materiálu. Pro izolaci DNA byla použita navážka 1 mg vzorku, což je množství odpovídající cca 20 statoblastům.

### 3.2.4 Izolace DNA

DNA vzorků o připravené navážce cca 1mg byla izolovány pomocí metody izolační techniky využívající CTAB-PVP. Podrobný protokol této izolační techniky je dostupný v publikaci Metodika detekce a molekulární selekce auto inkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.) (Čurn, et al., 2012). Tato metoda byla zvolena na základě série pokusů zpracovaných v předešlé diplomové práci, kdy byly srovnávány techniky izolace pomocí techniky CTAB-PVP a izolace izolačními kity DNeasy Plant Mini (QIAGEN) a Nucleo Spin (Marcherey-Nagel). Metoda izolace pomocí CTAB-PVP se během těchto pokusů ukázala jako nejefektivnější. Podrobný výsledek srovnání těchto izolačních metod je k nalezení v kapitole Přílohy (Příloha 4-6).

Protokol izolace CTAB-PVP dává dvě možnosti media pro rozpuštění získané DNA. První možností je sterilní H<sub>2</sub>O, druhou možností je roztok pufru 1xTE. Jako medium pro vzorky získané během izolace DNA byl zvolen pufr 1xTE.

### 3.2.5 Analýza izolované DNA

DNA potřebná pro populační analýzy musí splňovat kritéria jak z hlediska dostatečného množství, ale musí mít i odpovídající kvalitu. Z tohoto důvodu byly izolované vzorky podrobeny analýze, která měla za úkol stanovit množství a čistotu vytěžené DNA.

První technikou, která byla využívána okamžitě po provedené izolaci, byla analýza pomocí spektrofotometru BioSpec Nano (SHIMADZU, Obrázek 3.3). Tento analyzátor stanovuje množství a čistotu DNA v roztoku 1 µl vzorku za pomoci spektrofotometrie, čímž dává rychlý a dostatečně kvalitní výsledek a současně šetří vzorek z hlediska spotřebovaného objemu.

Jako slepý vzorek pro spektrofotometrickou analýzu musí být vždy použito stejné medium jako pro rozpuštění získané DNA, v tomto případě byl použit pufr 1xTE. Během samotného nanášení vzorku je nutné klást zvláštní důraz na použití dobře promíchaného vzorku bez mikro bublin a současně se vyhnout jakémukoliv kontaktu mezi špičkou pipety a nanášecím místem spektrofotometru.



**Obrázek 3.3: Spektrofotometr BioSpec Nano (THERMO SCIENTIFIC, 2015)**

Spektrofotometr BioSpec Nano udává výsledky měření v ng/μl pro množství získané DNA a v hodnotách OD 260/280 a OD 260/230 pro čistotu DNA. Tyto hodnoty byly stanoveny přístrojem, kdy se jedná o poměry absorbancí OD 260, OD 280, OD 230 a OD 320 naměřených při optické vzdálenosti 0,209 mm.

Pro vzorky, u nichž nebyly nalezeny dospělé kolonie, které by byly schopny vypouštět zralé statoblasty bylo následně ověřeno, zda se jedná o DNA druhu *Pectinatella magnifica* za pomoci druhově specifického primeru pro oblast kódující část úseku genu 28S rRNA. Tyto primery byly navrženy na základě informací dostupných v GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Pro analýzu 28S rRNA byla připravena reakce PCR dle následujících parametrů.

PCR mix:

|                                        |       |
|----------------------------------------|-------|
| 1x master Mix                          | 10 μl |
| PCR H <sub>2</sub> O                   | 7 μl  |
| 0,5 μM 28S–F<br>(CTTTTCAGCCAAGCACATGA) | 1 μl  |
| 0,5 μM 28S–R<br>(AAACCTCGCGTAGAGCAAAA) | 1 μl  |
| DNA                                    | 1 μl  |

---

Nastavení reakce PCR:

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

Výsledky PCR reakce byly vyhodnoceny na 3 % agarózovém gelu po dobu 1,5 hodiny při napětí 150 V.

### 3.2.6 Analýza vlivu stáří použitého vzorku na DNA

Během zpracování předešlé diplomové práce se u izolovaných vzorků projevoval výrazný vliv stáří studovaného vzorku na množství vytěžené DNA a současně i na její kvalitu. Z tohoto důvodu bylo během izolací DNA sledováno, jak se tato vlastnost projeví na studovaných vzorcích. Pro analýzy genetické struktury populace *Pectinatella magnifica* byly použity vzorky o stáří <1 rok, které byly izolovány neprodleně po odběru, až po vzorky starší 5 let (stáří 5, 6, 7, 9, 10). Měřené vzorky byly rozděleny do kategorií, vzorky mladší 1 roku (<1), jednoleté, dvouleté, tříleté, čtyřleté a starší pěti let (>5). U jednotlivých kategorií bylo stanoveno průměrné množství získané DNA a její průměrná čistota, na základě hodnot získaných pomocí spektrofotometru BioSpec Nano. Na základě těchto dat byl vyhodnocen vliv stáří vzorku na množství a kvalitu vytěžené DNA.

### 3.2.7 Vliv zmražení vzorku na kvalitu a množství DNA

Vzhledem k výsledkům analýzy vlivu stáří vzorku na kvalitu a množství vytěžené DNA byl dodatečně navržen experiment, který měl za úkol stanovit vliv mrazu na množství a kvalitu DNA. K tomuto experimentu byly použity výhradně zralé statoblasty druhu *Pectinatella magnifica*, odebrané na lokalitě pískovna Veselí I. Tato lokalita byla zvolena pro dostatečné množství kolonií, které mohly uvolnit značné množství statoblastů, které mohly následně přezimovat, a současně je zde dobrý přístup k vodě.

Během letní sezony, konkrétně v červenci 2021, byly odebrány zralé statoblasty kolonií *Pectinatella magnifica*. Část těchto statoblastů byla izolována ihned po odběru a zbylá část byla uskladněna v –20 °C do následujícího roku. Na začátku následující

---

sezony, v době, kdy ze statoblastů z předešlého roku vznikají noví jedinci, období květen-červen, byly na zvolené lokalitě odebrány statoblasty, které se nacházejí ve velkých shlucích (Obrázek 3.4) plovoucích u břehů vodních nádrží, a ty byly následně spolu se vzorky uskladněnými v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vyizolovány. Na základě dat získaných pomocí spektrofotometru BioSpec Nano byly porovnány vzorky izolované ihned po odběru se vzorky uskladněnými v umělých podmínkách při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vzorky ponechanými k přirozenému přezimování ve vodní nádrži a odebranými až v následujícím roce.



Obrázek 3.4: Shluk statoblastů (Foto: vlastní)

### 3.2.8 Analýza AFLP

Pro vyhodnocení genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* byly použity dvě analytické metody. První metodou byla analýza AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), která byla použita již v diplomové práci, kde byla ověřena její funkčnost vzhledem k faktu, že se jedná o druh na pokraji zájmu a dosud nebyl její genom plně osekvenován. Jako druhá technika byla zvolena metoda ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), která má při správně volbě primeru dobrou vypovídající hodnotu.

Analýza AFLP je molekulární marker, který je založen na PCR reakci za použití primerů, rozpoznávajících sekvenční DNA, které byly připraveny za pomoci cíleného štěpení DNA. Získané vlákno DNA je naštěpeno dvěma restriktivními endonukleázami s danou cílovou sekvencí (Vos, et al., 1995). Na takto vytvořené takzvané „lepivé konce“ jsou naligovány adaptory a následně je provedena PCR reakce s primery, které

---

nejen že mají sekvenci rozpoznávající příslušný adaptor, ale současně obsahují selektivní bázi, která umožňuje provedení samotné analýzy (Mueller a Wolfenbarger, 1999; Powell, et al., 1996). Za značnou výhodu metody AFLP lze považovat skutečnost, že i u organismů, jejichž celková sekvence DNA není stanovena, lze provádět populační analýzy s poměrně vysokou přesností. Díky této metodě je možné rozlišit i dva jedince jednoho druhu, avšak bez možnosti rozlišení heterozygotních alel, jelikož se jedná pouze o dominantní marker.

Pro analýzy AFLP byla zvolena primerová kombinace *EcoRI*+ACG/*MseI*+AGT, která byla zvolena na základě předcházející diplomové práce, během které byly testovány čtyři primerové kombinace (*EcoRI*+ACG/*MseI*+ACC, *EcoRI*+ACG/*MseI*+AGT, *EcoRI*+ACG/*MseI*+ATT, *EcoRI*+ACG/*MseI*+AAC), z nichž tato kombinace poskytla nejlepší výsledky, co do počtu amplifikovaných variabilních fragmentů (Příloha 7). Primer ACG, použitý v reakční směsi, byl fluorescenčně označený, za účelem zpracování výsledků pomocí kapilární elektroforézy na sekvenačním přístroji.

Samotná technika probíhá ve dvou dnech a je rozdělena na několik fází, restrikci DNA, ligaci adaptorů, pre-amplifikaci, kdy dochází k předselekcí získaných fragmentů a samotné selekci, kdy jsou z celkového množství za pomoci primerů vybrány a amplifikovány cílové fragmenty, které budou následně vyhodnoceny pomocí fragmentační analýzy. Diagram znázorňující techniku AFLP je k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 23.

### **Den 1. Restrikce DNA**

Pro potřeby restrikce DNA byla namíchána směs DNA o objemu 40 µl obsahující 35 µl 1xTE pufru a 5 µl DNA o koncentraci 25 ng/µl. Dále byl namíchán restrikční mix o objemu 10 µl/vzorek, skládající se z 4,25 µl PCR H<sub>2</sub>O, 5 µl R/L pufru (10x), 0,25 µl restriktázy *EcoRI* (10 U/µl) a 0,5 µl restriktázy *MseI* (10 U/µl). Takto připravený restrikční mix byl přidán ke směsi DNA a celková restrikční směs byla umístěna do hybridizační pícky, kde byla inkubována po dobu 16 hodin při 37 °C.

---

## Den 2. Ligace adaptorů

Pro potřeby ligace adaptorů byl připraven ligační mix o objemu 10  $\mu$ l na vzorek, který se skládal z 6,2  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l R/L pufru (10x), 0,1  $\mu$ l EcoRI 3' (50 pmol/ $\mu$ l), 0,1  $\mu$ l EcoRI 5' (50 pmol/ $\mu$ l), 0,2  $\mu$ l MseI 3' (250 pmol/ $\mu$ l), 0,2  $\mu$ l MseI 5' (250 pmol/ $\mu$ l), 1,2  $\mu$ l ATP (10 mM) a 1  $\mu$ l T4 ligázy (1 U/ $\mu$ l). Připravený ligační mix byl přidán k hotové restriční směsi a celý objem nově vzniklé ligační směsi byl krátce centrifugován při maximální rychlosti 800rpm. Hotová ligační reakce byla následně inkubována po dobu 3 hodin při teplotě 37°C.

Během probíhající ligace adaptorů byl připraven T01E pufr, ve kterém byly následně hotové vzorky naředěny v poměru 1:10 (60  $\mu$ l vzorku + 540  $\mu$ l T01E pufru).

## Pre-amplifikace

Pro potřeby pre-amplifikace byl připraven pre-amplifikační mix (45  $\mu$ l/vzorek), ke kterému bylo následně přidáno 5  $\mu$ l DNA ředěné 1:10 v T01E pufru.

Pre-amplifikační mix/1 vzorek:

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| PCR H <sub>2</sub> O      | 5 $\mu$ l    |
| PCR Buffer (10x)          | 5 $\mu$ l    |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM) | 2 $\mu$ l    |
| dNTP's (10 mM)            | 1 $\mu$ l    |
| EcoRI-A (500 ng/ $\mu$ l) | 0,15 $\mu$ l |
| MseI-A (500 ng/ $\mu$ l)  | 0,15 $\mu$ l |
| Taq (5 U/ $\mu$ l)        | 0,2 $\mu$ l  |

Připravené vzorky byly umístěny do thermocycleru, kde byl spuštěn přednastavený pre-amplifikační program (PREAMP). Po ukončení pre-amplifikaci byly vzorky naředěny 20x v TE pufru (40  $\mu$ l vzorku + 760  $\mu$ l TE pufru). Část vzorku byla použita pro průběžnou kontrolu úspěšné pre-amplifikace pomocí gelové elektroforézy na 3 % agarózovém gelu.

---

Nastavení reakce PCR:

Víčko předeheřt na 99 °C

1. 94 °C 2 min
2. 94 °C 30 sek
3. 60 °C 30 sek
4. 72 °C 1 min

Krok 2-4 opakovat 29x

5. 72 °C 9 min
6. 4 °C ∞

### **Selektivní amplifikace**

Pro potřeby selektivní amplifikace bylo použito 2,5µl DNA připravené ve fázi selektivní amplifikace a ředěné 20x v TE pufru. K nachystaným vzorkům byl přidán amplifikační mix o objemu 7,5 µl na jeden vzorek.

Amplifikační mix/1 vzorek:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| PCR H <sub>2</sub> O   | 6,018 µl |
| PCR Buffer (10x)       | 1 µl     |
| dNTP's (10 mM)         | 0,2 µl   |
| EcoRI-ACG (10000 pmol) | 0,087 µl |
| MseI-AGT (316 ng/µl)   | 0,095 µl |
| Taq (5 U/µl)           | 0,1 µl   |

Připravená amplifikační směs, skládající se z amplifikačního mixu a studované DNA, byla umístěna do thermocycleru, kde byl nastaven amplifikační program (SELAMP).

---

Nastavení reakce PCR:

Víčko předeřhřát na 99 °C

- |    |       |        |
|----|-------|--------|
| 1. | 94 °C | 2 min  |
| 2  | 94 °C | 30 sek |
| 3. | 65 °C | 30 sek |
| 4. | 72 °C | 1 min  |

Krok 2-4 opakovat 10x, při každém opakování snížit teplotu annealingu o 1 °C

- |    |       |        |
|----|-------|--------|
| 5. | 94 °C | 30 sek |
| 6. | 56 °C | 30 sek |
| 7. | 72 °C | 1 min  |

Krok 5-7 opakovat 24x

- |    |       |        |
|----|-------|--------|
| 8. | 72 °C | 15 min |
| 9. | 4 °C  | ∞      |

Po ukončení reakce byly vzorky připraveny pro provedení samotné fragmentační analýzy. Pro ověření úspěšně proběhlé amplifikace bylo několik zvolených vzorků otestováno pomocí gelové elektroforézy na přítomnost amplifikovaných fragmentů. Pro toto ověření byl použit 3 % agarózový gel.

### 3.2.9 Metoda ISSR

Jako druhá technika byla zvolena analýza ISSR, která je založena na použití mikrosatelitových sekvencí v pozici primeru. Mikrosatelity jsou krátké sekvence, nejčastěji o délce 16-25 bp, ve kterých dochází k opakování několika nejčastěji 1–4 nukleotidů. Výhodou této metody je, že se jedná o sekvence DNA, které se náhodně vyskytují v genomu všech eukaryontních organismů. Díky tomu je možné odhalit různě dlouhé řetězce DNA, ohraničené těmito úseky, které následně slouží ke stanovení genetické diverzity mezi jednotlivými jedinci studovaného druhu. Další výhodou této metody je poměrně nízká finanční náročnost, jelikož produkty amplifikace lze poměrně snadno vizualizovat pomocí gelové elektroforézy na 2 % agarózovém gelu. Nevýhodou metody je, pokud není cílový organismus osekvenován a není tudíž znám jeho podrobný genom, je volba primerů použitých pro genetickou analýzu spíše náhodná na základě zkušeností s podobnými druhy. Podrobné schéma techniky ISSR je k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 24.

---

Pro potřeby disertační práce byly zvoleny 4 primery na základě zkušenosti práce s nimi, jako dobře fungují kombinace pro širokou škálu eukaryotních organismů. Tyto primery byly primer UBC 810, UBC 881, UBC 890 a UBC 825. Pro samotnou reakci byl použit 1 µl DNA o minimální koncentraci 25 ng/µl, ke kterému bylo přidáno 19 µl PCR mixu.

PCR mix/1 vzorek:

|                      |        |
|----------------------|--------|
| PCR H <sub>2</sub> O | 8,1 µl |
| Master Mix           | 10 µl  |
| BSA                  | 0,4 µl |
| Primer               | 0,5 µl |

U všech primerových kombinací byla otestována klasická amplifikační reakce, příslušná danému primeru.

Nastavení reakce PCR pro UBC 810:

Víčko předeřhřát na 99 °C

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 sek
3. 54 °C 45 sek
4. 72 °C 45 min

Krok 2-4 opakovat 35x

5. 72 °C 10 min
6. 4 °C ∞

Nastavení reakce PCR pro UBC 810:

Víčko předeřhřát na 99 °C

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 sek
3. 54 °C 45 sek
4. 72 °C 45 min

Krok 2-4 opakovat 35x

5. 72 °C 10 min
6. 4 °C ∞

---

Nastavení reakce PCR pro UBC 881 a UBC 890:

Víčko předeřhřát na 99 °C

- |    |       |        |
|----|-------|--------|
| 1. | 94 °C | 5 min  |
| 2. | 94 °C | 30 sek |
| 3. | 56 °C | 45 sek |
| 4. | 72 °C | 45 min |

Krok 2-4 opakovat 35x

- |    |       |        |
|----|-------|--------|
| 5. | 72 °C | 10 min |
| 6. | 4 °C  | ∞      |

Nastavení reakce PCR pro UBC 825:

Víčko předeřhřát na 99 °C

- |    |       |        |
|----|-------|--------|
| 1. | 94 °C | 2 min  |
| 2. | 93 °C | 20 sek |
| 3. | 52 °C | 60 sek |
| 4. | 72 °C | 20 sek |

Krok 2-4 opakovat 35x

- |    |       |       |
|----|-------|-------|
| 5. | 72 °C | 6 min |
| 6. | 4 °C  | ∞     |

### 3.2.10 Fragmentační analýza vzorků

Fragmentační analýza byla provedena na vzorcích, které byly připraveny pomocí metody AFLP.

Před provedením fragmentační analýzy bylo nezbytné provést krok denaturace vzorků. K denuraci, tedy rozpletení vlákna dvoušroubovice DNA a vytvoření dvou samostatných vláken, čitelných kapilární elektroforézou, posloužila denaturační směs složená z 11 µl formamidu, 0,4 µl GeneScan 500 LIZ Dye Size Standard (Life Technologies) a 1 µl vzorku vzniklého při selektivní amplifikaci. Během přípravy vzorku pro denuraci byly připravované vzorky důkladně promíchány a pečlivě zbaveny všech bublinek, které by mohly výsledek kapilární elektroforézy zkreslit či přímo znehodnotit. Samotná denaturace vzorků proběhla v thermocycleru při teplotě 95 °C po dobu 4 minut. Po uplynutí denaturační doby byly vzorky neprodleně vloženy do chladicího bloku předem vychlazeného na -20° C.

---

Samotná separace amplifikačních produktů probíhala na sekvenčním přístroji ABI 3500 (Applied Biosystems) za pomoci kapilární elektroforézy s použitím velikostního standardu GS500 (Life Technologies). Nezbytným prvkem kapilární elektroforézy bylo použití fluorescenčně značeného strojově čitelného primeru EcoRI+ACG, který byl použit pro amplifikaci studovaných vzorků.

### 3.2.11 Vyhodnocení dat po fragmentační analýze

Signály produktů, které byly separovány během fragmentační analýzy, byly vyhodnoceny pomocí programu Gene Mapper 5.0 (Life Technologies) a převedeny do systému binární matice (1;0), v níž 1 zastupuje přítomnost amplifikovaného fragmentu o dané velikosti a 0 naopak značí jeho nepřítomnost. Takto vzniklá matice dále sloužila pro další statistické zpracování. Pro snazší práci se statistickými daty a přesnějšímu vyhodnocení vzájemných vztahů mezi jednotlivými vzorky, zastupujícími jednotlivé kolonie druhu *Pectinatella magnifica*, byly pro další vyhodnocení použity pouze ty alely, které vykazovaly polymorfní charakter alespoň v jednom případě. Pokud byly nalezeny alely, u kterých všechny vzorky vykazovaly pouze přítomnost či nepřítomnost polymorfismu, byly z následných statistik vyloučeny.

K vyhodnocení struktury zkoumané populace byla použita UPMGA analýza dle Everitt (1974). Tato statistická metoda, odhalující způsoby shlukování a tím i genetickou podobnost mezi jednotlivými vzorky, je využívána k odhalení genetické variability v populaci (Anderberg, 2014). Nejdříve byla aplikována na celkovém množství analyzovaných vzorků. Vzhledem k množství rozdílných lokalit byly výsledky fragmentační analýzy následně roztřizeny dle jednotlivých lokalit a metoda UPGMA byla použita i na jednotlivé dílčí lokality, na kterých byla otestována genetická podobnost v rámci jednotlivých vodních nádrží. Pro statistickou metodu UPGMA byl použit statistický program R. Váhou pro vyhodnocení analýzy byla procenta odlišnosti mezi jednotlivými vzorky, kde 0 reprezentovala 0% odlišnost (100% podobnost) vzorků, zatímco 1 reprezentovala 100% odlišnost (0% podobnost) mezi studovanými vzorky.

---

### 3.2.12 Gelová elektroforéza po ISSR

Výsledky reakce ISSR byly vizualizovány na 2 % agarózovém gelu za použití 100 bp Ladderu. Pro přípravu 2 % agarozového gelu bylo použito na 100 ml agarozového gelu cca 3,5 µl Ethidium Bromide pro následnou viditelnost studovaných vzorků. Samotná elektroforetická analýza probíhala v prostředí 1xTBE pufru při napětí 80 V po dobu 3 hodin, aby došlo k lepší separaci amplifikovaných fragmentů.

Po uběhlé době byly vzorky vyfoceny pomocí specializovaného fotoaparátu pod UV zářením, za účelem vizualizace separovaných fragmentů. Takto získaná obrazová dokumentace výsledků analýz ISSR byla následně použita jako materiál pro vyhodnocení genetické struktury populace *Pectinatella magnifica*. Gel se separovanými vzorky byl následně zlikvidován jako nebezpečný odpad, vzhledem k obsahu nebezpečného karcinogenu Ethidium Bromide.

### 3.2.13 Vyhodnocení gelové elektroforézy ISSR

Po vytvoření obrazového materiálu separovaných fragmentů ISSR byly obrazy za pomoci grafického programu vyrovnány do vodorovné pozice a byl u nich upraven kontrast a jas. Na takto získaných obrazech byla následně stanovena přítomnost či nepřítomnost amplifikovaného fragmentu.

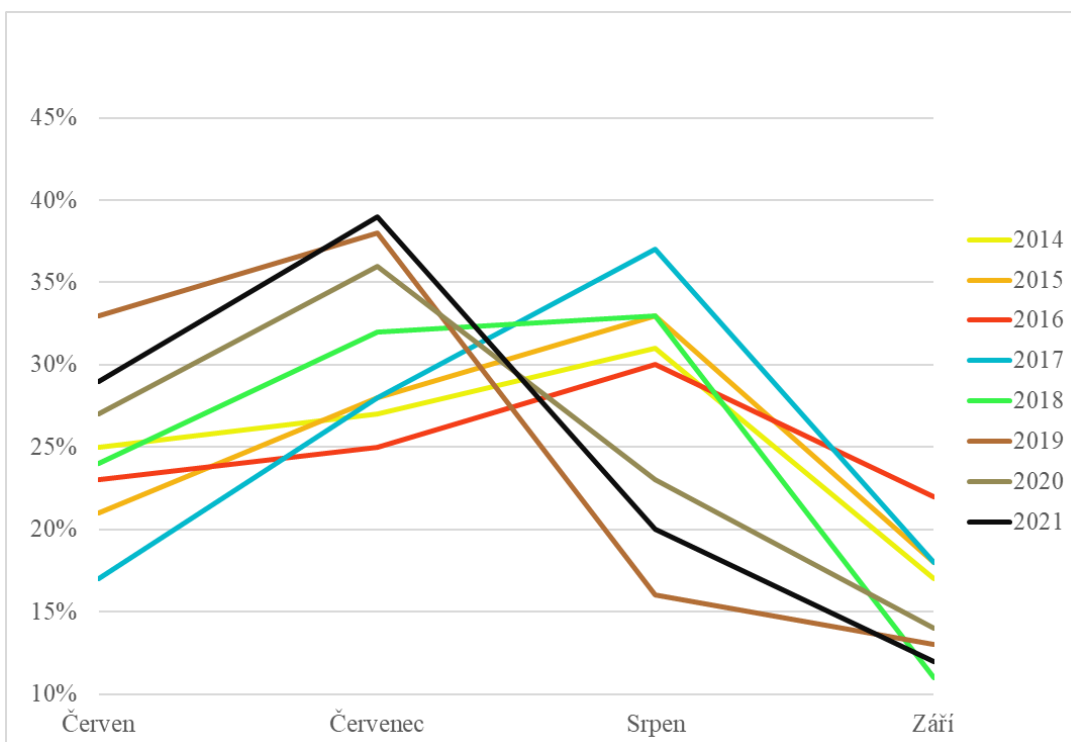
Ze získaných dat byla následně vytvořena binární matice (1;0), kde 1 značila přítomnost a 0 nepřítomnost studovaného fragmentu. Výsledná data byla vyhodnocena statistickými metodami, stejně jako data získaná kapilární elektroforézou po analýzách AFLP.

## 4 Výsledky

### 4.1 Výsledky pravidelného pozorování kolonií *Pectinatella magnifica*

Na 6 zvolených lokalitách, které byly dlouhodobě pozorovány, byl v průběhu studia druhu *Pectinatella magnifica* sledován výskyt a stav kolonií. Ačkoliv se jedná o poměrně jednoduchý organismus, je závislý na široké škále podmínek, které musí být splněny, aby mohl na dané lokalitě prosperovat. Především samotný výskyt v aktuálním roce je závislý na podmínkách roku předešlého, kdy možná absence vhodných podmínek zapříčiňuje sníženou produkci statoblastů koloniemi a tím i nižší potenciální množství zooidů, které mohou vytvořit kolonie na začátku sezony příští.

U všech pravidelně pozorovaných lokalit došlo mezi roky 2014-2021 k průběžnému snižování výskytu kolonií *Pectinatella magnifica* z hlediska četnosti, ale i velikosti. Pro poměření velikosti je nejvíce vypovídající měřítko hmotnost kolonie. Na začátku monitoringu se na lokalitách hojně nacházely kolonie o hmotnosti okolo 5–10 kg, doplněné o četné menší kolonie o velikosti okolo 1 kg, zatímco v posledních dvou letech se jejich průměrná velikost snížila na cca 0,5-3 kg a větší kolonie jsou spíše výjimečné.



Obrázek 4.1: Průběh vývoje množství kolonií

---

Dalším pozorovaným jevem je posun ve vegetačním období mezi roky 2014-2021 (Obrázek 4.1). Na tomto obrázku je vyjádřeno procentuální zastoupení kolonií *Pectinatella magnifica* v průběhu jednotlivých sezón. V období mezi roky 2014-2018 se četnost kolonií postupně zvyšovala až do období srpna a následně jejich počet na lokalitách prudce poklesl. Naopak mezi lety 2018-2021 kolonie zaznamenaly masivní rozvoj v období června a července a se srpnem nastal prudký pokles v množství kolonií na jednotlivých lokalitách.

Během pozorování bylo zjištěno, že v letech 2014-2018 postupně narůstaly mladé kolonie až do období srpna, kdy vegetační sezóna druhu *Pectinatella magnifica* zaznamenala své maximum a poté počet kolonií rychle ubýval, zatímco mezi lety 2019–2021 narůstaly kolonie především ze začátku léta, kdy voda velmi rychle dosáhne požadované teploty, zvláště díky denním teplotním maximům, ale s nástupem letních měsíců došlo ke stagnaci v růstu a postupnému odumírání kolonií. Mladé kolonie, které se vytvořily během června dosáhly svého maxima v období července a poté začaly ubývat. Příčinou tohoto jevu může být časté střídání teplot, kdy rychlý pokles zapříčiní ochlazení vody a zpomalení životních funkcí kolonií, zatímco krátká období s vysokými teplotami netrvají tak dlouho, aby se mohly kolonie plně vyvíjet. Ty z výše popsanych důvodů vyprodukují méně zralých statoblastů, které by mohly v následující sezóně vyklíčit.

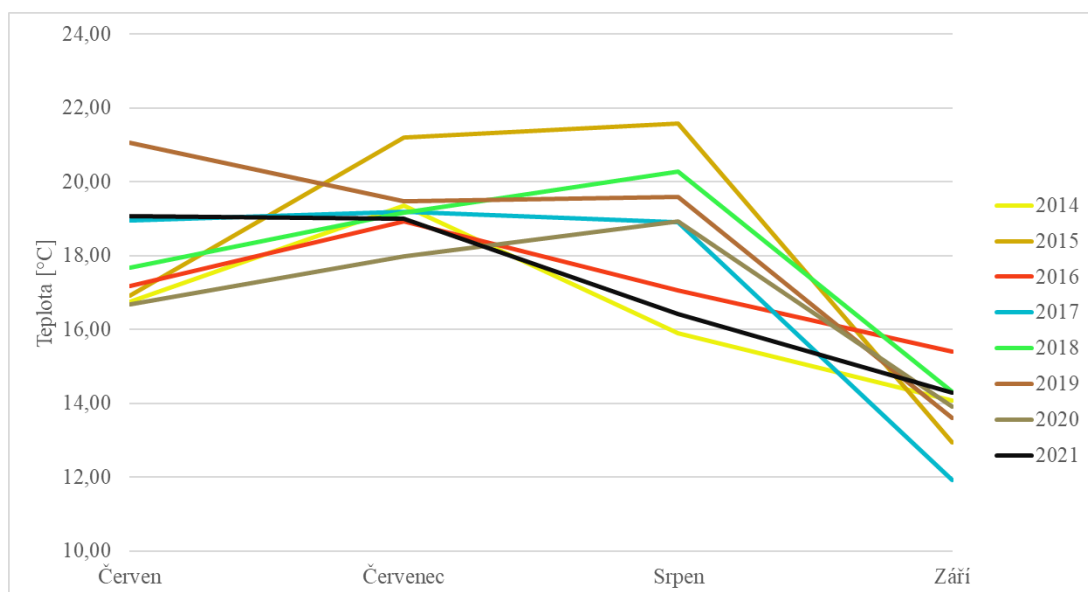
Nízké srážkové úhrny současné sušší periody způsobují pokles hladiny až o 15–20 cm oproti normálu, což způsobuje vynoření větví pobřežních porostů nad hladinu a snížení množství potenciálního ponořeného substrátu pro uchycení nových kolonií. Tento jev může být důvodem proč na malých vodních nádržích v oblasti Třebońska populace *Pectinatella magnifica* stagnuje či mírně ustupuje ale na vodní nádrži Lipno, která má uměle udržovanou hladinu na relativně stálém stavu, se v posledních letech masivně rozvíjí.

Vzhledem k tomu, že je druh *Pectinatella magnifica* organismem převážně oligotrofních vod, je v našich podmínkách výrazně ovlivněna porosty sinic. Zejména na vodních nádržích Staňkovský a Nový Kanclíř dochází v hlavním vegetačním období k rozvoji výrazného vodního květu a tím potlačení živých kolonií, které jsou velice náročné na množství kyslíku obsaženého ve vodě, který je odčerpáván právě populací sinic. Z tohoto důvodu je hlavní vegetační období kolonií posunuté do června a července, s ohledem na skutečnost, že srpen bývá vrcholem období tvorby vodního květu.

Příčinou úbytku kolonií *Pectinatella magnifica* na písčivých a malých vodních nádržích může být i masivní turismus, kdy vývoj posledních let přinesl do oblasti Třeboňska více turistů. Nadměrné vystavení látkám obsaženým v kosmetice, zejména v oblastech kempů, může být pro mechovky škodlivé.

#### 4.1.1 Vývoj teplot Třeboňsko

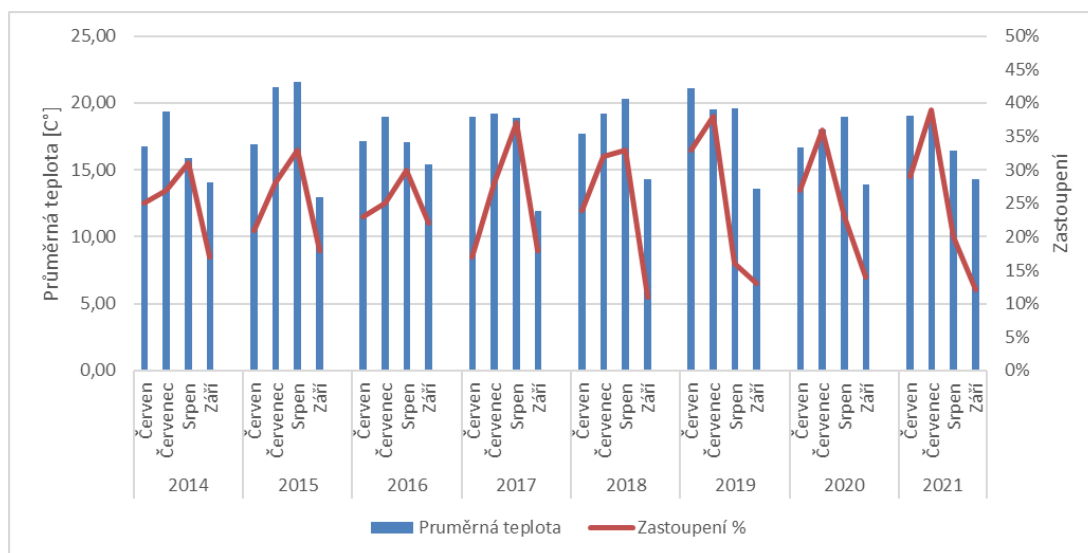
Na studovaných lokalitách, kde byly pozorovány kolonie *Pectinatella magnifica* byly, pomocí údajů naměřených Českým hydrometeorologickým ústavem, stanoveny průměrné teploty za jednotlivé měsíce sledovaných let a následně korelovány se zjištěným stavem mechovek v oblasti Třeboňska.



Obrázek 4.2: Průběh průměrných teplot Třeboňsko

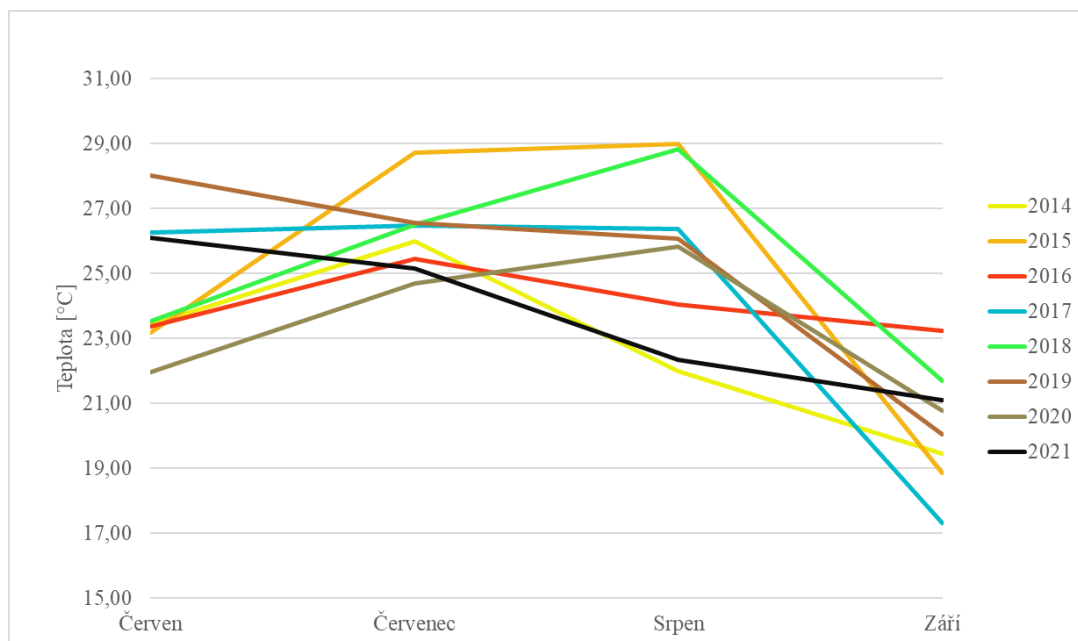
Graf na obrázku 4.2 představuje průběh průměrných teplot vzduchu mezi červnem a zářím v letech 2014-2021, kdy jednotlivé roky jsou od sebe odlišeny jednotlivými barvami. Z výsledků grafu je patrné, že roky 2014 a 2016 měly velmi podobný průběh, kdy na počátku vegetační sezony dosahovaly průměrné teploty k 17,0 °C, během července dosáhly více než 19,0 °C a po zbytek sezony zaznamenávaly trvalý pokles. Podobný průběh mají ještě teploty roku 2021, ve kterém červnové teploty vystoupaly na 19,0 °C a po zbytek roku postupně klesaly. Podobnost v teplotách vykazují vzorky za roky 2017, 2018 a 2020. Teploty vzduchu v těchto letech dosahovaly během června hodnot 16,5 °C (2020), 17,7 °C (2018) a 19,0 °C (2017). I přes rozmezí naměřených hodnot je u všech tří roků patrný podobný průběh, kdy teploty pozvolna stoupaly o 1-2 °C až do období srpna, kdy došlo k prudkému ochlazení. Ze získaných hodnot

se vyčleňují roky 2015 a 2019. V roce 2015 byly teploty v červnu na úrovni 16,9 °C následně prudce vzrostly na 21,2 °C, kde vydržely až do srpna a poté velmi prudce poklesly na 12,9 °C. V roce 2018 naopak v červnu dosahovaly teploty nejvyšší úrovně 28,0 °C a pak během sezony pozvolna klesaly nejdříve na 26,5 °C, kde se udržely až do srpna a v září poklesly až na 13,6 °C.



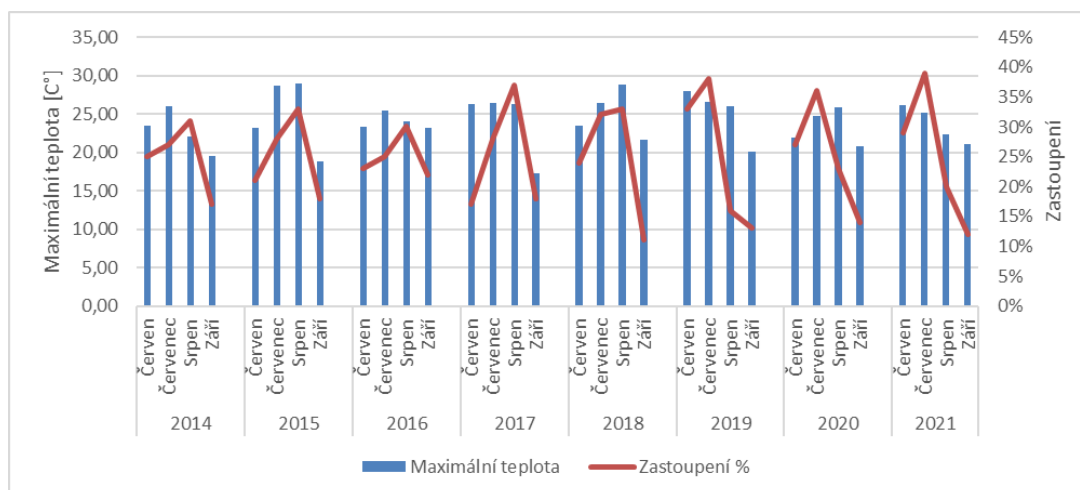
**Obrázek 4.3: Vývoj kolonií v závislosti na průměrné teplotě**

Obrázek 4.3 vyjadřuje vývoj kolonií *Pectinatella magnifica* na studovaných lokalitách v závislosti na vývoji průměrných měsíčních teplot vzduchu mezi lety 2014-2021. Dle naměřených hodnot v porovnání s údaji získanými z archivu Českého hydrometeorologického ústavu je patrná korelace ve vývoji kolonií na průměrných měsíčních teplotách. Koeficient determinace byl stanoven na  $R^2 = 0,6766$ , avšak je třeba počítat s časovým posunem, během kterého dojde k prohrátí vodního sloupce a reakci statoblastů a zooidů na změnu teplotních podmínek.



**Obrázek 4.4: Průběh maximálních teplot Třeboňsko**

Z grafu maximálních teplot v oblasti Třeboňska (Obrázek 4.4) je patrný vývoj odlišný pro každý rok. V roce 2014 maximální teploty dosahovaly průměrně 23,4 °C, v červenci vzrostly na 26 a pak postupně začaly klesat až na 19,5 °C. V roce 2015 dosahovaly maximální teploty rovněž 23,2 °C, avšak během července a srpna prudce stouply, až na 29 °C, kde vydržely po celé léto a až v období září poklesly na 18,9 °C. Během sezony 2016 dosahovaly červnové hodnoty 23,4 °C, v červenci vzrostly na 25,4 °C a poté začaly postupně klesat až na úroveň 23,2 °C. V roce 2017 dosahovaly teploty na začátku sezony 26,3 °C, během července vzrostly na 26,5 °C, ke se udržely i v průběhu srpna a poté poklesly na 17,3 °C. V sezoně roku 2018 začínaly teploty na 23,5 °C, poté postupně vzrostly až na 28,8 °C v období srpna a poté začaly klesat až na zářijových 21,7 °C. Roku 2019 dosahovaly teploty na počátku letní sezony nejvyšších hodnot 28,0 °C a poté začaly zvolna klesat až na 20,0 °C. V létě 2020 byly maximální teploty na začátku sezony nejnižší po celou dobu sledování a dosahovaly úroveň 22,0 °C. Během července a srpna vzrostly až na 25,9 °C a během září klesly na 20,8 °C. V sezoně 2021 dosahovaly maximální teploty během června nejvyšší hodnoty z celého roku a to 26,1 °C a během sezony postupně klesaly až na 21,1 °C.



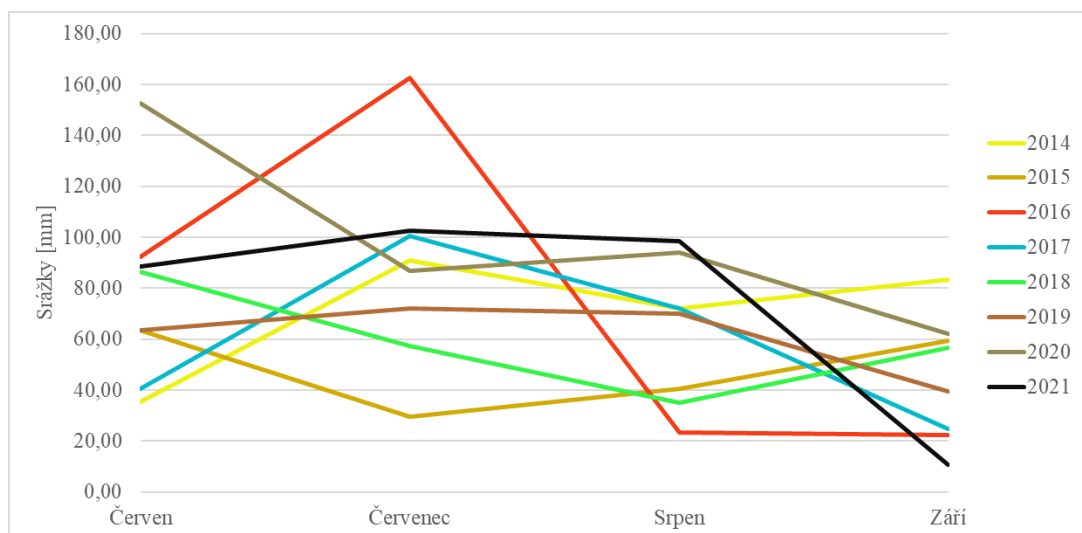
**Obrázek 4.5: Vývoj kolonií v závislosti na maximální teplotě**

Obrázek 4.5 vyjadřuje vývoj kolonií *Pectinatella magnifica* na studovaných lokalitách v závislosti na vývoji maximálních měsíčních teplot vzduchu mezi lety 2014–2021. Dle naměřených hodnot v porovnání s údaji získanými z archivu Českého hydrometeorologického ústavu je patrná korelace ve vývoji kolonií a maximálních měsíčních teplotách vzduchu. Koeficient determinace byl stanoven na  $R^2 = 0,6442$ , avšak i zde je, stejně jako u průměrné teploty, třeba počítat s časovým posunem, během kterého dojde k prohřátí vodního sloupce a reakci statoblastů a zooidů na změnu teplotních podmínek. Závislost v případě maximálních teplot je mírně nižší z důvodu nárazového nárůstu měsíčních teplot a krátkodobého maxima, kterého dosahují.

Ze zjištěných hodnot průměrných a maximálních teplot v korelaci s výskytem kolonií *Pectinatella magnifica* by se, s ohledem na náročnost tohoto organismu na podmínky prostředí, dalo usuzovat, že závislost na naměřených teplotách vyšla průkazně. Tuto skutečnost potvrzuje, že teplota je hlavní, ale ne jediný limitující faktor, na němž výskyt kolonií mechovek závisí.

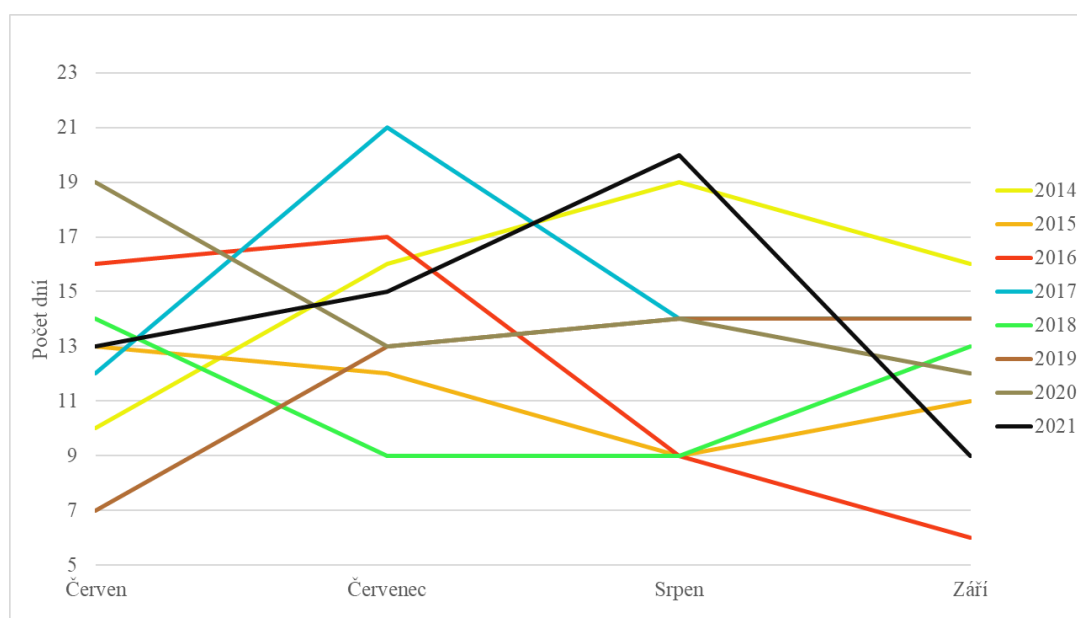
#### 4.1.2 Vývoj srážek Třeboňsko

Kromě teplotních charakteristik byly v oblasti Třeboňska zjištěny i srážkové charakteristiky, konkrétně množství srážek spadlých v jednotlivých měsících a celkový počet dní bez srážek.



Obrázek 4.6: Průběh průměrných srážek Třeboňsko

Graf na obrázku 4.6 vyjadřuje průběh průměrných srážek na lokalitě Třeboňsko v období roků 2014-2021.

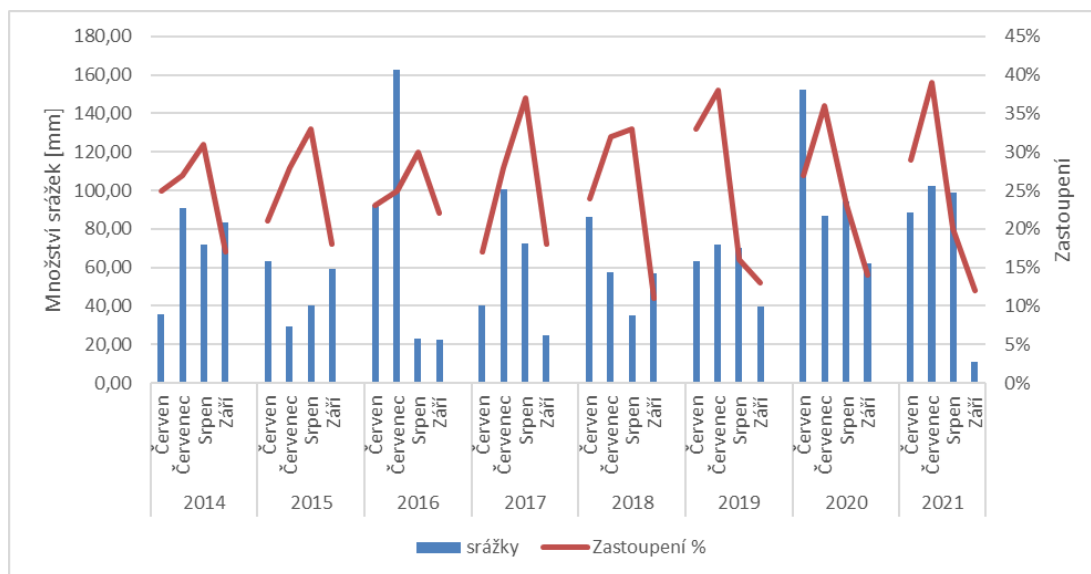


Obrázek 4.7: Průběh dní bez srážek Třeboňsko

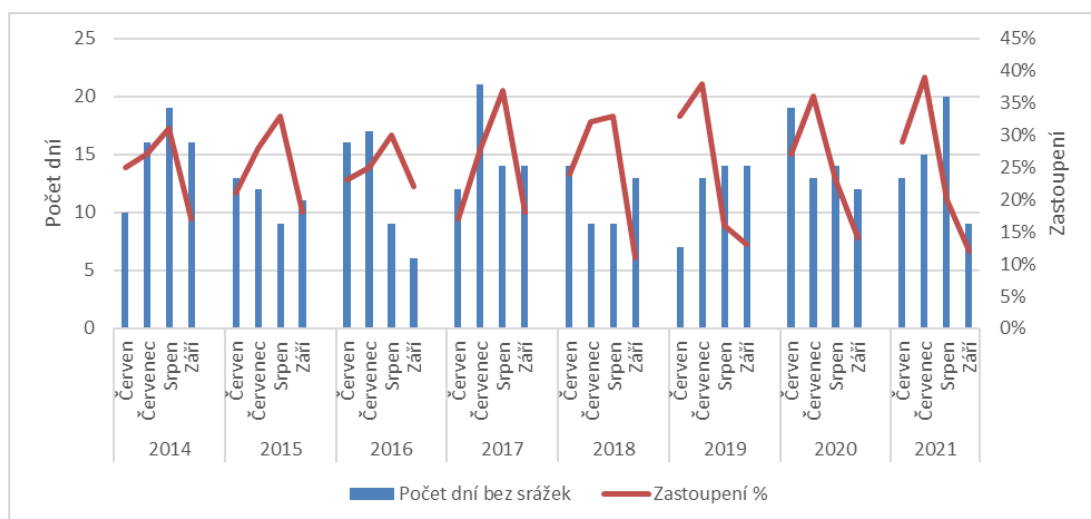
Obrázek 4.7 vyjadřuje průměrný počet dní bez srážek za jednotlivé měsíce v sezonách 2014-2021.

---

Nejsušším měsícem roku 2014 byl červen, kdy měsíční srážky dosahovaly 35,5 mm a počet dnů srážek dosáhl 10, během zbývajících měsíců byly srážkové úhrny 90,8 mm o 16 dnech srážek, 72,1 mm o 19 dnech srážek a 83,5 mm spadlých během 16 dnů. V roce 2015 byl naopak červen nejdeštivějším měsícem sezony, kdy spadlo 63,5 mm srážek během 13 dnů. Další průběh sezony odpovídal 29,5 mm spadlým během 12 dnů měsíce července, 40,4 mm během 9 dnů v srpnu a 55,5 mm za 11 dnů měsíce září. Srážkové úhrny první poloviny sezony 2016 byly o vyšší, kdy v červnu napršelo celkem 92,3 mm během 16 dnů, v červenci až 162,5 mm za 16 dnů, v srpnu 23,3 mm během 9 dnů a zářijový srážkový úhrn činil 22,3 mm během 6 dnů. Srážky v červnu 2017 činily 40,4 mm během 12 dnů, v červenci zaznamenaly nárůst na 100,7 mm během 21 dnů a poté pozvolna klesaly na 72,2 mm ve 14 dnech v srpnu a 24,7 mm ve 14 dnech v září. Sezona 2018 byla ze srážkových poměrů vyrovnaná, kdy v červnu napršelo 86,5 mm během 14 dnů, v červenci 57,5 mm v 9 dnech, v srpnu 35 mm v 9 dnech a v září 56,7 mm v 13 dnech. Během sezony 2019 napršelo v měsíci červnu 63,5 mm srážek během 7 dnů, v červenci 72,1 mm během 13 dnů, v srpnu 70 mm za 14 dnů a v září 39,6 mm během 14 dnů. Rok 2020 byl z hlediska srážek bohatší, kdy červen byl nejdeštivějším měsícem sezony s celkovým úhrnem srážek 152,5 mm spadlých během 19 dnů. V dalších měsících tohoto roku spadlo 86,8 mm srážek během 13 dnů měsíce července, 94,1 mm v 14 dnech měsíce srpna a 62,3 mm za 12 zářijových dnů. V roce 2021 byl nejdeštivějším měsícem sezony červenec. V červnu tohoto roku spadlo 88,4 mm ve 13 dnech, v červenci 102,5 mm za 15 dnů, v srpnových dnech spadlo 98,6 mm během 20 dnů a v září činil celkový úhrn 10,7 mm spadlých během 9 dnů.



Obrázek 4.8: Vývoj kolonií v závislosti na množství srážek



Obrázek 4.9: Vývoj kolonií v závislosti na počtu dní bez srážek

Stejně jako pro teplotní charakteristiky i pro srážky byla vytvořena korelace mezi množstvím srážek spadlých během jednotlivých měsíců (Obrázek 4.8) a pro počet dní bez srážek (Obrázek 4.9). Obě tyto hodnoty se však ukázaly jako statisticky neprůkazné.

Z výsledků korelace pro srážkové charakteristiky vyplývá, že množství srážek a počet dní bez srážek není pro výskyt druhu *Pectinatella magnifica* přímo limitující, avšak i tak je velmi důležitý. V horkých suchých letech, kdy je množství srážek minimální, dochází k výraznému odparu z vodní hladiny nádrží, které mechovky osidlují, a poklesu vodní hladiny. Z tohoto důvodu klesá množství potenciálního

substrátu v podobě ponořených větví a tím i šance na uchycení se mladých zooidů, které by vybudovaly základ pro nové kolonie.

## 4.2 Výsledky izolací DNA *Pectinatella magnifica*

Pro potřeby genetických analýz bylo vybráno 270 vzorků kolonií *Pectinatella magnifica*, které zahrnovaly jak lokality pravidelně pozorované a odebírané již od roku 2014, ale i lokality, na nichž docházelo k náhodným odběrům. U náhodných lokalit došlo k odběru při náhodném objevu vzorku během jiných pozorování, byl náhodně zaznamenán během pohybu v dané lokalitě, či byl nahlášen od náhodných pozorovatelů z řad veřejnosti, kteří byli o dané problematice informováni prostřednictvím článků v tisku či prostřednictvím internetových zdrojů.

### 4.2.1 Výsledky izolace DNA pomocí spektrofotometrie

Výsledky izolace DNA a následné spektrofotometrické analýzy byly shrnuty v tabulce 4.1.

**Tabulka 4.1: Výsledky izolace DNA**

| Číslo vzorku | Lokalita | Stáří vzorku v době izolace | DNA (ng/μl) | OD 260/280 | OD 260/230 | Vlnová délka | Množství měřeného vzorku (μl) |
|--------------|----------|-----------------------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------------------------|
| 1            | Veselí I | 5                           | 49,07       | 1,55       | 4,17       | 0,209        | 1                             |
| 2            | Veselí I | 6                           | 44,28       | 1,73       | 7,59       | 0,209        | 1                             |
| 3            | Veselí I | 4                           | 77,48       | 1,59       | 2,39       | 0,209        | 1                             |
| 4            | Veselí I | 5                           | 42,65       | 2,12       | 4,00       | 0,209        | 1                             |
| 5            | Veselí I | 7                           | 35,17       | 1,67       | 2,20       | 0,209        | 1                             |
| 6            | Hejtman  | 6                           | 35,36       | 1,62       | 5,83       | 0,209        | 1                             |
| 7            | Hejtman  | 6                           | 50,17       | 1,51       | 3,81       | 0,209        | 1                             |
| 8            | Hejtman  | 4                           | 87,36       | 1,66       | 2,26       | 0,209        | 1                             |
| 9            | Hejtman  | 6                           | 48,59       | 1,74       | 3,81       | 0,209        | 1                             |
| 10           | Hejtman  | 7                           | 28,83       | 1,70       | 3,27       | 0,209        | 1                             |
| 11           | Cep I    | 8                           | 34,78       | 1,53       | 4,93       | 0,209        | 1                             |
| 12           | Cep I    | 7                           | 68,81       | 1,65       | 1,57       | 0,209        | 1                             |
| 13           | Cep I    | 9                           | 29,18       | 1,36       | 4,28       | 0,209        | 1                             |

|    |              |    |        |      |      |       |   |
|----|--------------|----|--------|------|------|-------|---|
| 14 | Cep I        | 10 | 122,19 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 15 | Cep I        | 7  | 61,09  | 1,74 | 3,81 | 0,209 | 1 |
| 16 | Staňkovský   | 6  | 26,02  | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 17 | Staňkovský   | 5  | 77,06  | 2,21 | 2,86 | 0,209 | 1 |
| 18 | Staňkovský   | 7  | 113,46 | 1,69 | 2,90 | 0,209 | 1 |
| 19 | Staňkovský   | 6  | 27,98  | 2,11 | 2,57 | 0,209 | 1 |
| 20 | Staňkovský   | 4  | 462,22 | 2,20 | 2,44 | 0,209 | 1 |
| 21 | Nový Kanclíř | 6  | 47,72  | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 22 | Nový Kanclíř | 5  | 52,65  | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 23 | Nový Kanclíř | 6  | 37,92  | 1,55 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 24 | Nový Kanclíř | 4  | 265,98 | 1,72 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 25 | Nový Kanclíř | 6  | 27,63  | 1,90 | 1,42 | 0,209 | 1 |
| 26 | Podřezanský  | 5  | 63,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 27 | Podřezanský  | 7  | 45,68  | 1,74 | 3,81 | 0,209 | 1 |
| 28 | Podřezanský  | 6  | 67,80  | 1,70 | 3,27 | 0,209 | 1 |
| 29 | Podřezanský  | 5  | 44,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 30 | Podřezanský  | 4  | 137,96 | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 31 | USA          | 9  | 47,72  | 1,33 | 4,17 | 0,209 | 1 |
| 32 | Vlkov        | 6  | 52,65  | 2,01 | 7,59 | 0,209 | 1 |
| 33 | Vlkov        | 5  | 37,92  | 1,56 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 34 | Vlkov        | 3  | 265,98 | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 35 | Vlkov        | 4  | 27,63  | 2,59 | 2,21 | 0,209 | 1 |
| 36 | Vlkov        | 3  | 363,8  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 37 | Vydymač      | 3  | 245,68 | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 38 | Vydymač      | 4  | 167,80 | 1,91 | 2,36 | 0,209 | 1 |
| 39 | Vydymač      | 1  | 640,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 40 | Vydymač      | 4  | 137,96 | 1,68 | 2,15 | 0,209 | 1 |
| 41 | Vydymač      | 5  | 47,72  | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 42 | Vápenský     | 1  | 512,65 | 2,17 | 2,11 | 0,209 | 1 |
| 43 | Vápenský     | 5  | 37,92  | 1,63 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 44 | Vápenský     | 3  | 265,98 | 1,69 | 2,90 | 0,209 | 1 |
| 45 | Vápenský     | 5  | 27,63  | 1,42 | 4,28 | 0,209 | 1 |
| 46 | Vápenský     | 3  | 363,80 | 1,88 | 2,70 | 0,209 | 1 |

|    |                  |    |        |      |       |       |   |
|----|------------------|----|--------|------|-------|-------|---|
| 47 | Nový<br>Hospodář | 2  | 445,68 | 2,22 | 2,44  | 0,209 | 1 |
| 48 | Nový<br>Hospodář | 2  | 567,80 | 2,21 | 2,86  | 0,209 | 1 |
| 49 | Nový<br>Hospodář | 3  | 240,16 | 1,66 | 2,75  | 0,209 | 1 |
| 50 | Nový<br>Hospodář | 3  | 137,96 | 1,94 | 2,46  | 0,209 | 1 |
| 51 | Nový<br>Hospodář | 6  | 47,72  | 1,45 | 13,53 | 0,209 | 1 |
| 52 | Kořensko         | 1  | 512,65 | 2,20 | 2,28  | 0,209 | 1 |
| 53 | Kořensko         | 5  | 37,92  | 1,67 | 4,93  | 0,209 | 1 |
| 54 | Kořensko         | 3  | 265,98 | 1,61 | 2,86  | 0,209 | 1 |
| 55 | Kořensko         | 6  | 27,63  | 1,66 | 4,28  | 0,209 | 1 |
| 56 | Kořensko         | 2  | 463,80 | 1,69 | 2,90  | 0,209 | 1 |
| 57 | Kořensko         | 2  | 545,68 | 2,11 | 2,57  | 0,209 | 1 |
| 58 | Kořensko         | <1 | 67,80  | 1,91 | 1,28  | 0,209 | 1 |
| 59 | Kořensko         | 1  | 440,16 | 1,66 | 2,75  | 0,209 | 1 |
| 60 | Kořensko         | 3  | 137,96 | 1,73 | 1,70  | 0,209 | 1 |
| 61 | Hluboká n. Vlt.  | 4  | 67,72  | 1,36 | 2,23  | 0,209 | 1 |
| 62 | Hluboká n. Vlt.  | 4  | 92,65  | 1,52 | 2,09  | 0,209 | 1 |
| 63 | Bechyně          | 5  | 37,92  | 1,71 | 4,93  | 0,209 | 1 |
| 64 | Bechyně          | 3  | 265,98 | 2,11 | 2,57  | 0,209 | 1 |
| 65 | Neznášov         | 5  | 27,63  | 1,49 | 4,28  | 0,209 | 1 |
| 66 | Veselí I         | 7  | 63,80  | 1,41 | 4,28  | 0,209 | 1 |
| 67 | Veselí I         | 5  | 45,68  | 1,70 | 3,27  | 0,209 | 1 |
| 68 | Veselí I         | 6  | 27,80  | 1,91 | 1,28  | 0,209 | 1 |
| 69 | Veselí I         | 5  | 44,16  | 1,66 | 2,75  | 0,209 | 1 |
| 70 | Veselí I         | 4  | 137,96 | 1,74 | 3,81  | 0,209 | 1 |
| 71 | Veselí I         | 3  | 247,72 | 1,93 | 2,42  | 0,209 | 1 |
| 72 | Lipno I          | 4  | 82,65  | 1,61 | 5,83  | 0,209 | 1 |
| 73 | Lipno I          | 5  | 57,92  | 1,79 | 4,93  | 0,209 | 1 |
| 74 | Lipno I          | 5  | 65,98  | 1,81 | 2,19  | 0,209 | 1 |

|     |            |    |         |      |      |       |   |
|-----|------------|----|---------|------|------|-------|---|
| 75  | Lipno I    | 5  | 27,63   | 1,71 | 4,28 | 0,209 | 1 |
| 76  | Staňkovský | 6  | 33,80   | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 77  | Staňkovský | 5  | 45,68   | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 78  | Staňkovský | 3  | 267,80  | 1,49 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 79  | Staňkovský | 5  | 44,16   | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 80  | Staňkovský | 2  | 537,96  | 2,11 | 2,57 | 0,209 | 1 |
| 81  | Staňkovský | 3  | 247,72  | 2,05 | 4,17 | 0,209 | 1 |
| 82  | Cep I      | 3  | 312,65  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 83  | Cep I      | 6  | 37,92   | 1,54 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 84  | Cep I      | 5  | 65,98   | 1,99 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 85  | Cep I      | 7  | 27,63   | 1,51 | 4,28 | 0,209 | 1 |
| 86  | Cep I      | 6  | 63,80   | 1,36 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 87  | Cep I      | 6  | 45,68   | 1,54 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 88  | Cep I      | 7  | 37,80   | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 89  | Kanál ČB   | 1  | 840,16  | 1,91 | 1,97 | 0,209 | 1 |
| 90  | Kanál ČB   | <1 | 137,96  | 1,03 | 1,42 | 0,209 | 1 |
| 91  | Kanál ČB   | <1 | 47,72   | 1,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 92  | Kanál ČB   | 1  | 512,65  | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 93  | Kanál ČB   | <1 | 37,92   | 1,91 | 1,97 | 0,209 | 1 |
| 94  | Bechyně    | <1 | 65,98   | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 95  | Bechyně    | <1 | 27,63   | 1,22 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 96  | Bechyně    | 1  | 763,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 97  | Bechyně    | 1  | 645,68  | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 98  | Bechyně    | 1  | 967,80  | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 99  | Nuzice     | 1  | 1440,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 100 | Nuzice     | 1  | 537,96  | 1,67 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 101 | Nuzice     | 1  | 467,72  | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 102 | Nuzice     | <1 | 52,65   | 1,31 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 103 | Nuzice     | <1 | 37,92   | 1,23 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 104 | Dobronice  | <1 | 65,98   | 1,02 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 105 | Dobronice  | 1  | 927,63  | 1,82 | 1,92 | 0,209 | 1 |
| 106 | Dobronice  | 1  | 1363,80 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 107 | Dobronice  | 1  | 745,68  | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |

|     |              |    |         |      |      |       |   |
|-----|--------------|----|---------|------|------|-------|---|
| 108 | Dobronice    | 1  | 1167,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 109 | Kořensko     | 1  | 640,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 110 | Kořensko     | 1  | 437,96  | 2,21 | 2,02 | 0,209 | 1 |
| 111 | Kořensko     | 2  | 471,72  | 1,82 | 1,92 | 0,209 | 1 |
| 112 | Kořensko     | 1  | 512,65  | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 113 | Kořensko     | 1  | 537,92  | 2,21 | 2,86 | 0,209 | 1 |
| 114 | Kořensko     | 2  | 265,98  | 2,11 | 2,57 | 0,209 | 1 |
| 115 | Finsko       | 2  | 297,63  | 1,67 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 116 | Lipno        | 1  | 563,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 117 | Lipno I      | 2  | 345,68  | 1,91 | 1,97 | 0,209 | 1 |
| 118 | Lipno I      | 2  | 567,80  | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 119 | Lipno I      | 2  | 440,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 120 | Lipno I      | 1  | 637,96  | 1,69 | 2,90 | 0,209 | 1 |
| 121 | Hejtman      | 2  | 417,72  | 2,22 | 2,44 | 0,209 | 1 |
| 122 | Hejtman      | 1  | 512,65  | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 123 | Hejtman      | 1  | 379,92  | 2,12 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 124 | Hejtman      | <1 | 165,98  | 1,21 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 125 | Hejtman      | 2  | 270,63  | 2,21 | 2,86 | 0,209 | 1 |
| 126 | Hejtman      | 2  | 363,80  | 2,11 | 2,57 | 0,209 | 1 |
| 127 | Nový Kanclíř | 2  | 345,68  | 1,67 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 128 | Nový Kanclíř | 1  | 1167,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 129 | Nový Kanclíř | 1  | 440,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 130 | Nový Kanclíř | <1 | 137,96  | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 131 | Cep I        | 6  | 47,72   | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 132 | Cep I        | 7  | 52,65   | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 133 | Cep I        | 6  | 37,92   | 2,27 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 134 | Komárov      | 2  | 265,98  | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 135 | Komárov      | 3  | 217,63  | 1,96 | 2,36 | 0,209 | 1 |
| 136 | Komárov      | 2  | 363,80  | 1,67 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 137 | Komárov      | 1  | 545,68  | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 138 | Komárov      | 2  | 167,80  | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 139 | Neznášov     | <1 | 44,16   | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 140 | Neznášov     | <1 | 37,96   | 1,38 | 3,11 | 0,209 | 1 |

|     |                  |    |         |      |      |       |   |
|-----|------------------|----|---------|------|------|-------|---|
| 141 | Neznášov         | <1 | 97,72   | 1,13 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 142 | Neznášov         | 1  | 512,65  | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 143 | Kačležský        | 1  | 397,92  | 2,22 | 2,44 | 0,209 | 1 |
| 144 | Kačležský        | 2  | 265,98  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 145 | Kačležský        | 1  | 298,63  | 2,59 | 4,28 | 0,209 | 1 |
| 146 | Kačležský        | 1  | 363,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 147 | Kačležský        | <1 | 245,68  | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 148 | Vlkov            | 1  | 1167,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 149 | Vlkov            | 1  | 440,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 150 | Vlkov            | 1  | 837,96  | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 151 | Vlkov            | <1 | 47,72   | 1,95 | 1,44 | 0,209 | 1 |
| 152 | Vlkov            | <1 | 52,65   | 1,42 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 153 | Vlkov            | 1  | 370,92  | 2,20 | 1,92 | 0,209 | 1 |
| 154 | Vlkov            | 2  | 265,98  | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 155 | Vlkov            | 2  | 274,63  | 1,90 | 1,42 | 0,209 | 1 |
| 156 | Vlkov            | 1  | 363,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 157 | Vlkov            | 1  | 645,68  | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 158 | Podřezanský      | 1  | 967,80  | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 159 | Podřezanský      | 2  | 440,16  | 1,67 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 160 | Podřezanský      | 2  | 237,96  | 1,82 | 1,92 | 0,209 | 1 |
| 161 | Kořensko         | 2  | 470,72  | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 162 | Kořensko         | 2  | 512,65  | 1,94 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 163 | Kořensko         | 1  | 537,92  | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 164 | Kořensko         | 1  | 265,98  | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 165 | Kořensko         | 1  | 627,63  | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 166 | Nový<br>Hospodář | 2  | 363,80  | 1,84 | 2,21 | 0,209 | 1 |
| 167 | Nový<br>Hospodář | 2  | 345,68  | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 168 | Nový<br>Hospodář | 3  | 167,80  | 1,70 | 3,27 | 0,209 | 1 |
| 169 | Nový<br>Hospodář | 1  | 440,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |

|     |                    |    |        |      |      |       |   |
|-----|--------------------|----|--------|------|------|-------|---|
| 170 | Nový<br>Hospodář   | 2  | 337,96 | 1,69 | 2,90 | 0,209 | 1 |
| 171 | Nový<br>Hospodář   | 2  | 427,72 | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 172 | Hluboká<br>n. Vlt. | 2  | 512,65 | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 173 | Hluboká<br>n. Vlt. | 1  | 537,92 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 174 | Hluboká<br>n. Vlt. | 1  | 765,98 | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 175 | Vápenický          | 1  | 627,63 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 176 | Vápenický          | 1  | 363,80 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 177 | Vápenický          | 2  | 345,68 | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 178 | Vápenický          | 2  | 467,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 179 | Hejtman            | 1  | 440,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 180 | Nový Hospodář      | 1  | 837,96 | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 181 | Hejtman            | <1 | 47,72  | 1,65 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 182 | Hejtman            | 1  | 512,65 | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 183 | Vydymač            | 1  | 397,92 | 2,17 | 2,11 | 0,209 | 1 |
| 184 | Vydymač            | 1  | 265,98 | 2,19 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 185 | Vydymač            | 1  | 727,63 | 1,91 | 1,97 | 0,209 | 1 |
| 186 | Vydymač            | 1  | 363,80 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 187 | Nový Kanclíř       | 2  | 345,68 | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 188 | Nový Kanclíř       | 2  | 467,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 189 | Nový Kanclíř       | 1  | 640,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 190 | Nový Kanclíř       | 1  | 537,96 | 1,82 | 1,92 | 0,209 | 1 |
| 191 | Hejtman            | 1  | 470,72 | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 192 | Nový Kanclíř       | 1  | 512,65 | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 193 | Podřezanský        | 2  | 370,92 | 2,21 | 2,86 | 0,209 | 1 |
| 194 | Podřezanský        | 2  | 265,98 | 1,53 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 195 | Podřezanský        | 1  | 627,63 | 1,82 | 1,92 | 0,209 | 1 |
| 196 | Podřezanský        | 1  | 363,80 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 197 | Podřezanský        | 1  | 345,68 | 1,97 | 1,53 | 0,209 | 1 |

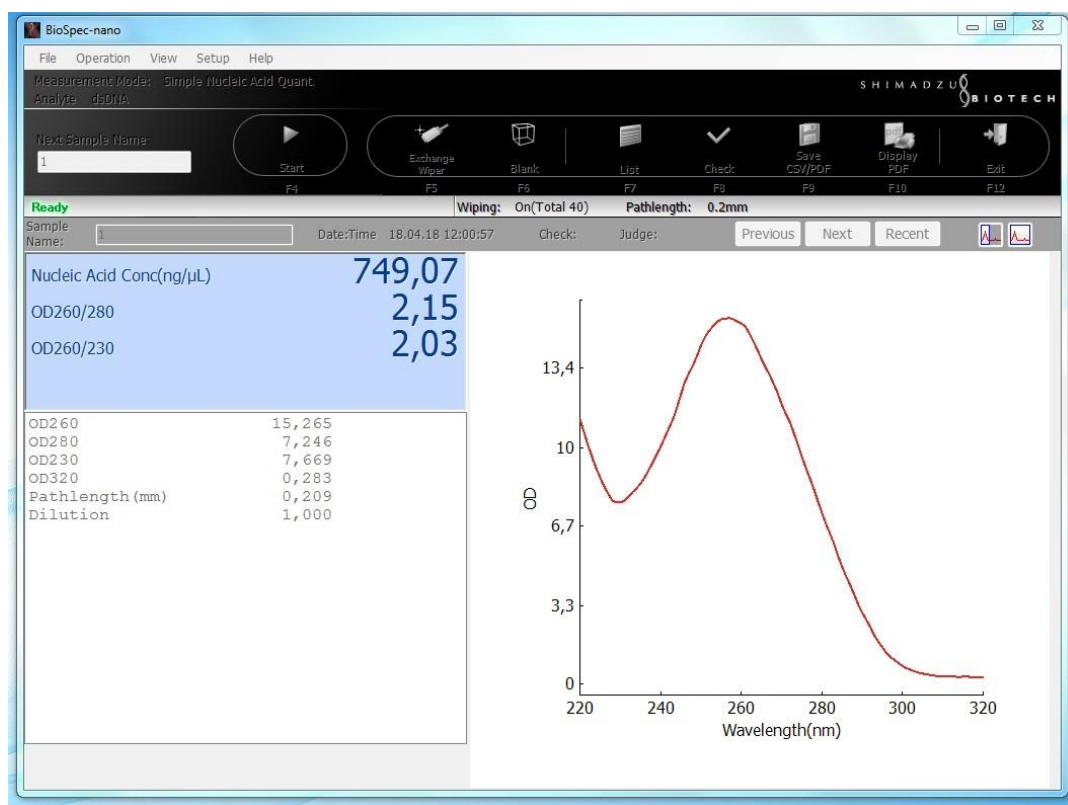
|     |              |    |        |      |      |       |   |
|-----|--------------|----|--------|------|------|-------|---|
| 198 | Nový Kanclíř | 1  | 567,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 199 | Staňkovský   | 1  | 440,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 200 | Staňkovský   | 1  | 637,96 | 2,12 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 201 | Staňkovský   | 1  | 547,72 | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 202 | Nový Kanclíř | 5  | 52,65  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 203 | Veselí I     | <1 | 37,92  | 1,12 | 1,42 | 0,209 | 1 |
| 204 | Veselí I     | <1 | 165,98 | 1,52 | 1,42 | 0,209 | 1 |
| 205 | Veselí I     | 1  | 527,63 | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 206 | Veselí I     | 1  | 363,80 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 207 | Podřezanský  | 2  | 345,68 | 1,97 | 2,66 | 0,209 | 1 |
| 208 | Veselí I     | 2  | 167,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 209 | Veselí I     | 5  | 144,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 210 | Staňkovský   | 5  | 137,96 | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 211 | Vlkov        | 1  | 547,72 | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 212 | Vlkov        | 3  | 212,65 | 1,74 | 3,81 | 0,209 | 1 |
| 213 | Veselí I     | 3  | 327,92 | 1,56 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 214 | Vlkov        | 3  | 265,98 | 1,81 | 4,00 | 0,209 | 1 |
| 215 | Vlkov        | 6  | 27,63  | 1,57 | 2,53 | 0,209 | 1 |
| 216 | Vlkov        | 6  | 36,80  | 1,70 | 3,27 | 0,209 | 1 |
| 217 | Vlkov        | 5  | 145,68 | 1,46 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 218 | Veselí I     | <1 | 167,80 | 1,05 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 219 | Nový Kanclíř | <1 | 44,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 220 | Nový Kanclíř | 4  | 137,96 | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 221 | Nový Kanclíř | 4  | 97,72  | 1,70 | 3,27 | 0,209 | 1 |
| 222 | Nový Kanclíř | 4  | 72,65  | 1,53 | 2,89 | 0,209 | 1 |
| 223 | Staňkovský   | <1 | 37,92  | 1,13 | 1,42 | 0,209 | 1 |
| 224 | Staňkovský   | <1 | 165,98 | 1,36 | 1,44 | 0,209 | 1 |
| 225 | Staňkovský   | <1 | 27,63  | 1,89 | 1,57 | 0,209 | 1 |
| 226 | Vlkov        | 5  | 63,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 227 | Staňkovský   | 3  | 245,68 | 1,54 | 1,80 | 0,209 | 1 |
| 228 | Chorvatsko   | 1  | 567,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 229 | Hejtman      | 2  | 440,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 230 | Hejtman      | 5  | 137,96 | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |

|     |                  |    |        |      |      |       |   |
|-----|------------------|----|--------|------|------|-------|---|
| 231 | Hejtman          | 5  | 47,72  | 1,59 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 232 | Hejtman          | 5  | 52,65  | 1,72 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 233 | Hejtman          | 6  | 37,92  | 1,63 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 234 | Vydymač          | <1 | 65,98  | 1,53 | 0,83 | 0,209 | 1 |
| 235 | Staňkovský       | <1 | 27,63  | 1,59 | 1,19 | 0,209 | 1 |
| 236 | Vydymač          | 5  | 63,80  | 1,66 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 237 | Vydymač          | 5  | 45,68  | 1,33 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 238 | Vydymač          | 6  | 37,80  | 1,69 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 239 | Vydymač          | 6  | 44,16  | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 240 | Podřezanský      | 1  | 637,96 | 2,21 | 2,86 | 0,209 | 1 |
| 241 | Podřezanský      | 1  | 547,72 | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 242 | Podřezanský      | 5  | 52,65  | 1,50 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 243 | Podřezanský      | 6  | 37,92  | 1,36 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 244 | Podřezanský      | 5  | 65,98  | 1,51 | 2,19 | 0,209 | 1 |
| 245 | Podřezanský      | 6  | 27,63  | 1,59 | 1,19 | 0,209 | 1 |
| 246 | Nový<br>Hospodář | 1  | 363,80 | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 247 | Nový<br>Hospodář | 3  | 245,68 | 2,21 | 2,86 | 0,209 | 1 |
| 248 | Nový<br>Hospodář | 2  | 467,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 249 | Vydymač          | 1  | 440,16 | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 250 | Staňkovský       | 1  | 537,96 | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 251 | Lipno I          | 1  | 547,72 | 2,16 | 1,46 | 0,209 | 1 |
| 252 | Lipno I          | 1  | 512,65 | 2,20 | 2,28 | 0,209 | 1 |
| 253 | Lipno I          | 2  | 337,92 | 1,72 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 254 | Veselí           | <1 | 65,98  | 1,82 | 1,11 | 0,209 | 1 |
| 255 | Podřezanský      | <1 | 27,63  | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 256 | Veselí I         | 5  | 63,80  | 1,84 | 1,74 | 0,209 | 1 |
| 257 | Veselí I         | 6  | 34,68  | 1,70 | 3,27 | 0,209 | 1 |
| 258 | Hejtman          | 6  | 67,80  | 1,45 | 7,59 | 0,209 | 1 |
| 259 | Hejtman          | 6  | 44,16  | 1,66 | 2,75 | 0,209 | 1 |
| 260 | Podřezanský      | <1 | 37,96  | 1,12 | 1,44 | 0,209 | 1 |

---

|     |              |    |        |      |      |       |   |
|-----|--------------|----|--------|------|------|-------|---|
| 261 | Podřezanský  | <1 | 47,72  | 1,59 | 1,19 | 0,209 | 1 |
| 262 | Podřezanský  | 6  | 52,65  | 1,67 | 2,20 | 0,209 | 1 |
| 263 | Podřezanský  | 5  | 137,92 | 1,54 | 4,93 | 0,209 | 1 |
| 264 | Nový Kanclíř | 3  | 265,98 | 1,69 | 2,90 | 0,209 | 1 |
| 265 | Nový Kanclíř | 4  | 97,63  | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |
| 266 | Nový Kanclíř | 4  | 89,34  | 1,70 | 3,02 | 0,209 | 1 |
| 267 | Vydymač      | 2  | 345,68 | 1,84 | 1,53 | 0,209 | 1 |
| 268 | Vydymač      | 2  | 467,80 | 1,91 | 1,28 | 0,209 | 1 |
| 269 | Vydymač      | 3  | 240,16 | 2,08 | 1,99 | 0,209 | 1 |
| 270 | Vydymač      | 4  | 97,96  | 1,68 | 3,11 | 0,209 | 1 |

V tabulce 3.1 je shrnutý výčet jednotlivých vzorků izolovaných pomocí izolační metody CTAB-PVP, u jednotlivých vzorků je možné zjistit lokalitu, na které byl daný vzorek odebrán, počet let, které uběhly od odběru vzorku po čas jeho izolace, množství vytěžené DNA v ng/μl, čistotu DNA stanovenou dvěma parametry stanovenými spektrofotometrem, optickou délku měření a množství vzorku, ze kterého byly předešlé parametry, tedy množství a čistota DNA stanoveny. V případě parametrů vyjadřujících čistotu DNA je nezbytná znalost škály, která určuje rozmezí hodnot, kterých „čistá“ DNA dosahuje. Dle THERMO SCIENTIFIC (2015) se rozmezí čisté DNA pohybuje pro parametr OD 260/280 mezi 1,8 – 2,0, kdy nižší naměřené hodnoty mohou indikovat přítomnost proteinů, fenolů či jiných kontaminantů. Hodnoty vyšší než stanovené optimum, dle návodu k obsluze, neznačí žádný problém v čistotě vzorku. V případě hodnoty OD 260/230 se rozmezí čisté DNA pohybuje mezi 2,0 - 2,2. Nižší hodnoty v tomto případě mohou značit znečištění DNA, vyšší hodnoty naopak mohou znamenat znečištění nanášecí plotny či slepého vzorku. Oba parametry pak mohou být rovněž zkresleny přítomností vzduchových bublin v měřeném vzorku (THERMO SCIENTIFIC, 2015). Obrázek 4.10 vyobrazuje protokol vytvořený spektrofotometrem BioSpec Nano.



**Obrázek 4.10: Výsledek analýzy pomocí spektrofotometru BioSpec Nano (vlastní)**

Během izolace DNA a následného měření vzorků pomocí spektrofotometru bylo nutné cca 10 % izolací opakovat z důvodu příliš vysokých odchylek od „čisté“ DNA nebo nedostatečného množství vytěžené DNA. Jako minimální množství přípustného výtěžku DNA bylo stanoveno 25,0 ng/μl, vzhledem k dalšímu použití vzorků pro genetické analýzy.

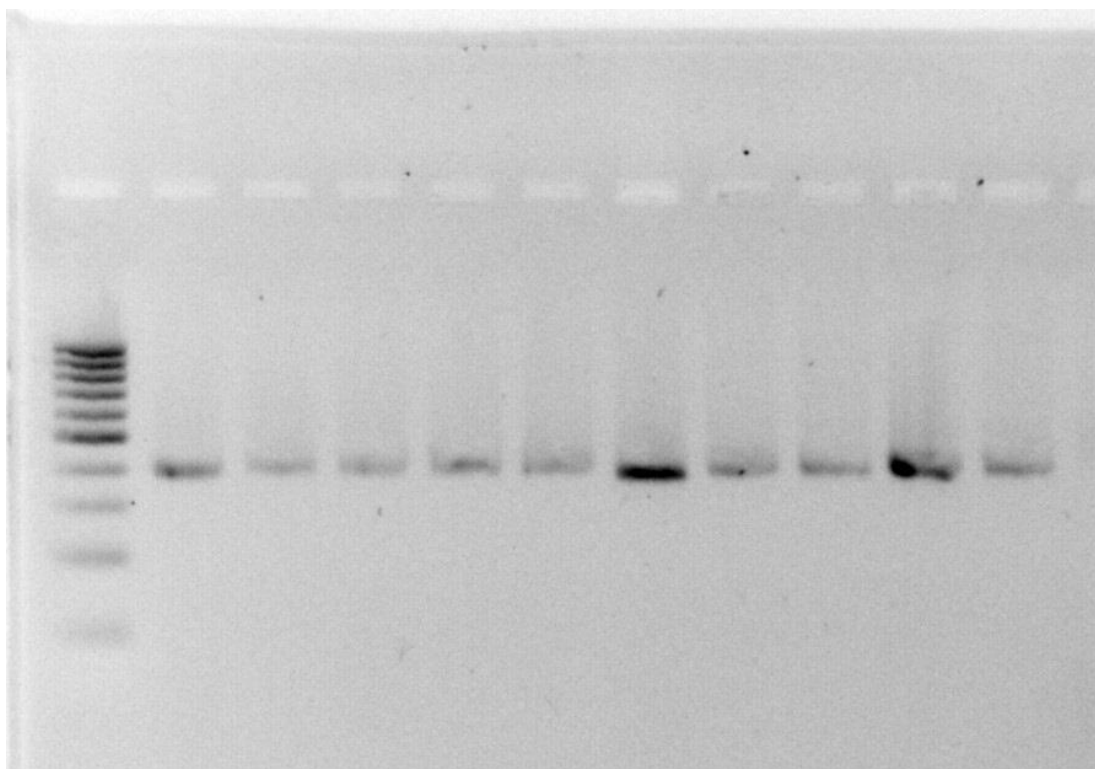
Z hodnot získaných na základě měření pomocí spektrofotometru BioSpec Nano lze stanovit průměrnou hodnotu vytěžené DNA 279,30 ng/μl vzorku, kdy nejnižší hodnota dosahuje 26,02 ng/μl (č. 16) a nejvyšší vytěžené množství DNA má hodnotu 1440,16 ng/μl (č. 99). Z hlediska čistoty DNA, izolované vzorky dosahují průměrné hodnoty 1,8 pro OD 260/280 a 2,6 pro OD 260/230. Vyšší hodnota, zvláště u druhého parametru může být způsobena kontaminací vzorků zásobními látkami obsaženými ve statoblastech druhu *Pectinatella magnifica*. Během homogenizace vzorků, která je počáteční fází izolační metody CTAB-PVP, se do izolačního media uvolňovalo značné množství látek, které pravděpodobně mají za účel sloužit jako počáteční potrava pro líhnoucí se zooid. Tyto látky jsou z velké části tukového charakteru a vytvářejí na hladině izolačního media mastnou vrstvu, která velmi snadno ulpívá

---

na povrchu mikrozkupek a pipetovacích špiček. Ukázalo se, že k snížení jejich množství velmi dobře pomáhá centrifugace za nízkých teplot (4 °C), kdy dochází k jejich ztuhnutí a lze je poté snáze stáhnout z hladiny izolačního roztoku.

#### 4.2.2 Výsledky gelové elektroforézy pro 28 S

V případě vzorků, které nevyprodukovaly dostatečné množství zralých statoblastů, které by byly vhodné pro izolaci DNA, bylo přikročeno k izolaci DNA ze samotných zooidů. Vzhledem k nemožnosti dokonalého očištění zooidů z důvodu značného rizika jejich poškození a tím i ztráty biologického materiálu vhodného pro izolaci DNA, bylo potenciální riziko, že izolovaná DNA by mohla místo genetické informace druhu *Pectinatella magnifica* obsahovat DNA jiných vodních organismů, např. řas, sinic, zástupců zooplanktonu, či kontaminaci DNA vlivem zbytků potravy obsažené v trávicím traktu zooidu. Z tohoto důvodu bylo přikročeno k ověření, zda je vytěžená DNA druhově příslušná organismu *Pectinatella magnifica*. K tomuto účelu byla provedena zkouška pomocí druhově specifického primeru pro oblast kódující 28S rRNA.



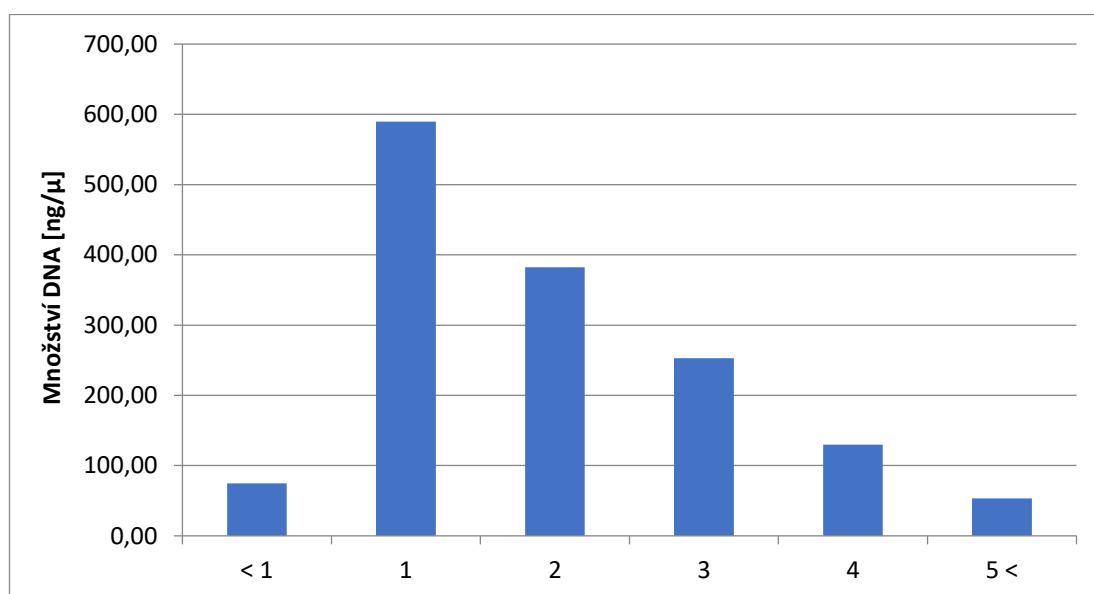
Obrázek 4.11: Výsledek analýzy 28 S rRNA

Z výsledků gelové elektroforézy (Obrázek 4.11) je patrné, že testované vzorky odpovídají druhu *Pectinatella magnifica*. U všech vzorků se jednalo o mladé kolonie

odebírané na pravidelně sledovaných lokalitách v první polovině vegetační sezony, kdy kolonie druhu *Pectinatella magnifica* nebyly ještě dost staré na to, aby mohly produkovat zralé statoblasty, které by bylo možné odebrat pro genetické analýzy. V tomto případě se jedná o vzorky (zleva doprava) Ladder 100 bp, Veselí I (71), Veselí I (206), Cep (82), Vlkov (148), Nový Kanclíř (127), Nový Kanclíř (191), Staňkovský (201), Podřezanský (197), Hejtman (121), Hejtman (179).

### 4.3 Vliv stáří vzorku na množství a kvalitu DNA

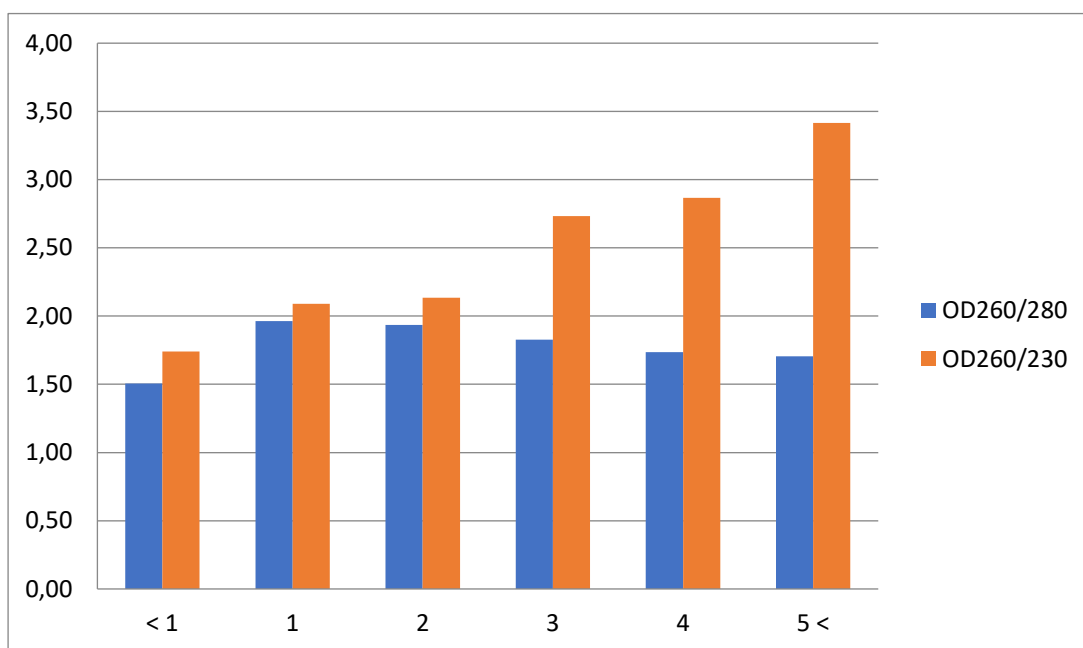
Během izolace a analýzy DNA z kolonií *Pectinatella magnifica* bylo zjištěno, že stáří použitého vzorku ovlivňuje množství (Obrázek 4.12) a kvalitu DNA (Obrázek 4.13), ze vzorku získané.



Obrázek 4.12: Vliv stáří vzorku na koncentraci DNA

Z analýzy naměřených hodnot je patrné, že nejvyšší výtěžnosti DNA bylo dosaženo v jednom roce stáří izolovaného vzorku, poté co byl nějakou dobu uskladněn při -20 °C, a s rostoucím stářím vzorku výtěžnost DNA postupně klesá. Jako zajímavost se ukázala skutečnost, že i u vzorků mladších jednoho roku, které byly izolovány ihned po odběru z lokality, je výtěžnost DNA velmi malá. Tato skutečnost by mohla být zapříčiněna nedostatečně vyvinutým zooidem, či přítomností látek inhibujících DNA, obsažených v odebraných statoblastech. U vzorků mladších jednoho roku dosahovala průměrná výtěžnost DNA 74,75 ng/μl (min. 27,63 ng/μl, max. 245,68 ng/μl), v jednom roce dosahovala průměrná výtěžnost DNA hodnoty 589,74 ng/μl (min. 26,98 ng/μl, max. 1440,16 ng/μl), ve dvou letech je průměrná

výtěžnost 382,28 ng/μl (min. 168,80 ng/μl, max. 567,80 ng/μl), ve třech letech dosahuje výtěžnost DNA v průměru 252,98 ng/μl (min. 137,96 ng/μl, max. 363,80 ng/μl), ve čtyřech letech 129,92 ng/μl (min. 27,63 ng/μl, max. 462,22 ng/μl) a u vzorků starších pěti let dosahovala celková výtěžnost DNA průměrných hodnot 53,10 ng/μl (min. 26,02 ng/μl, max. 145,68 ng/μl). Snižující se množství DNA s rostoucím stářím vzorku může být zapříčiněna postupným rozpadem DNA, způsobeným dlouhodobým skladováním v podmínkách nepříznivých pro přežití zárodku zooidu uvnitř statoblastu.



**Obrázek 4.13: Vliv stáří vzorku na kvalitu DNA**

Z výsledků izolací bylo patrné, že s rostoucím stářím vzorku se výtěžnost i kvalita vyizolované DNA snižuje. Současně s tím bylo zjištěno, že u vzorků, které byly izolovány ihned po odběru z přirozeně rostoucích kolonií nebo byly krátkodobě skladovány při 4 °C, byla výtěžnost a kvalita získané DNA rovněž nižší. V případě těchto vzorků by mohla být zhoršená kvalita vytěžené DNA zapříčiněna vyšším obsahem zásobních látek, určených pro vyvíjející se zárodek zooidu, které budou odčerpány v období líhnutí. Naopak zhoršení kvality DNA u starších vzorků může být zapříčiněno rozkladem DNA a zásobních látek z nitra statoblastu, způsobeného poškozením struktur statoblastu a zárodku zooidu, zapříčiněného dlouhodobým působením nízkých teplot během skladování vzorků při -20 °C. Z grafu je patrné, že průměrné hodnoty určující čistotu DNA jsou u vzorků mladších 1 roku

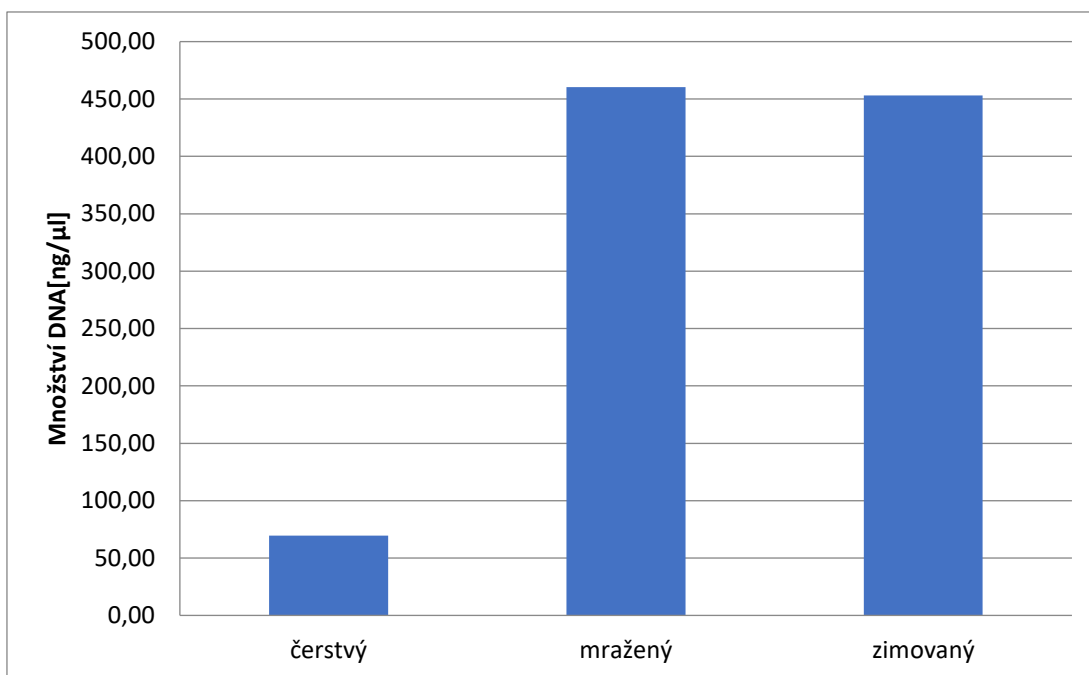
1,51 OD 260/280 a 1,74 OD 260/230, u ročních vzorků 1,96 OD 260/280 a 2,09 OD 260/230, u 2letých 2,93 OD 260/280 a 2,13 OD 260/230, u 3letých 1,83 OD 260/280 a 2,73 OD 260/230, u 4letých 1,74 OD 260/280 a 2,8 OD 260/230 a u vzorků starších 5 let dosahují průměrné hodnoty čistoty DNA 1,71 OD 260/280 a 3,42 OD 260/230.

Z výsledků analýzy čistoty DNA je patrné, že vzhledem k doporučeným parametrům, který by „čistá“ DNA měla splňovat, nejlepších hodnot dosahují vzorky o stáří 1 až 2 let

Hypotéza, že stáří vzorku nemá výrazný vliv na množství a kvalitu vyizolované DNA, byla, s ohledem na výsledky izolací DNA vzorků užitých v disertační práci, úspěšně vyvrácena.

#### 4.4 Výsledek vlivu mrazu na kvalitu a množství DNA

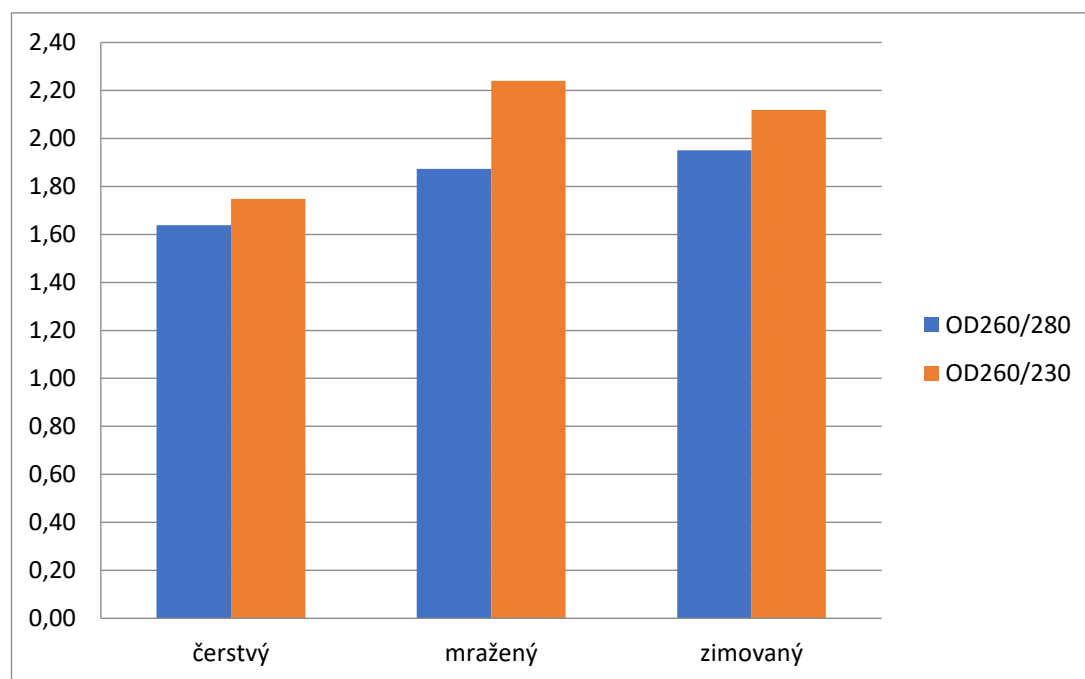
Na základě výsledků izolace DNA byl sestaven a proveden pokus, který měl stanovit vliv mrazu na množství (Obrázek 4.14) a kvalitu (Obrázek 4.15) vytěžené DNA.



Obrázek 4.14: Vliv mrazu na koncentraci DNA

Z výsledků izolací je patrné, že vzorky izolované ihned po odebrání z vodní nádrže mají velmi malou výtěžnost, která dosahuje průměrně 69,53 ng/μl (min. 17,48 ng/μl, max. 148,59 ng/μl), zatímco vzorky uchovávané v umělých podmínkách při -20 °C dosahují hodnot srovnatelných se vzorky, které byly ponechány k přirozenému přezimování. V případě vzorků uchovávaných v mrazáku byla průměrná výtěžnost DNA 460,33 ng/μl (min. 24,78 ng/μl, max. 1625,36 ng/μl).

U vzorků, které byly ponechány přirozenému vývoji, a byly odebrány až na počátku nadcházející sezony, dosahovala průměrná výtěžnost DNA 453,00 ng/μl (min. 27,63 ng/μl, max. 2462,22 ng/μl). Tento jev by mohl potvrzovat předchozí domněnku, že u vzorků izolovaných ihned po odběru u kolonie *Pectinatella magnifica* statoblasty obsahují ještě nedovyvinuté zooidy, které nejsou připraveny pro vylíhnutí, případně že obsahují látky inhibující jejich líhnutí. Proces zmrazení vzorků v laboratorních podmínkách tak mohl simulovat přirozený vývoj statoblastu, kdy k jeho líhnutí dochází až s nástupem následující sezony, tedy po přemrznutí v průběhu zimy a tím i po uplynutí období dormance, kdy zárodek zooidu není schopen vylíhnutí ze statoblastu. Tento výsledek by mohl značit, že pro vývoj zooidu je nutný vliv mrazu, čímž by mohl být vysvětlen přesun druhu *Pectinatella magnifica* do horských poloh a chladnějších oblastí severní a východní Evropy.



**Obrázek 4.15: Vliv mrazu na čistotu DNA**

U výsledků měření „čistoty“ DNA k tak výrazným rozdílům jako u výtěžnosti DNA nedošlo, avšak i zde jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými skupinami vzorků. V případě vzorků izolovaných ihned po odběru z kolonie *Pectinatella magnifica* je patrné mírné znečištění DNA vzhledem k dosaženým hodnotám 1,64 OD 260/280 a 1,75 OD 260/230. Toto znečištění by mohlo být zapříčiněno zvýšeným obsahem zásobních látek, pravděpodobně tukového charakteru, koncentrovaných uvnitř statoblastu a sloužících jako výživa pro zárodek zooidu. Ze vzorků podrobených vlivu

---

mrazu, lepších hodnot dosahují vzorky, které přezimovaly v přirozeném prostředí. Tyto vzorky dosáhly hodnot 1,95 OD 260/280 a 2,12 OD 260/230, které dle THERMO SCIENTIFIC (2015) dokonale splňují podmínky „čisté“ DNA. U vzorků uchovávaných v řízených podmínkách při -20 °C bylo dosaženo naměřených hodnot 1,87 OD 260/280 a 2,24 OD 260/230. Tyto hodnoty jsou na hranici čistoty DNA, zejména u parametru OD 260/230, avšak stále mohou být považovány za „čistou“ DNA. Drobné znečištění vzorků mohlo být způsobeno právě umělými podmínkami, kdy statoblasty byly drženy po celou dobu zimy při -20 °C a mohly tak být částečně poškozeny vlivem mrazu, na rozdíl od přirozeně přezimujících vzorků, kdy denní teploty dosáhly -20 °C v horizontu pouze několika dní, po kterých následovalo oteplení a mrazy neklesly pod -10 °C.

Hypotéza, že zamrazení statoblastů v teplotách -20 °C nemá vliv na množství a kvalitu vyizolované DNA, byla pomocí pokusu zaměřeného pouze na tuto otázku, vyvrácena.

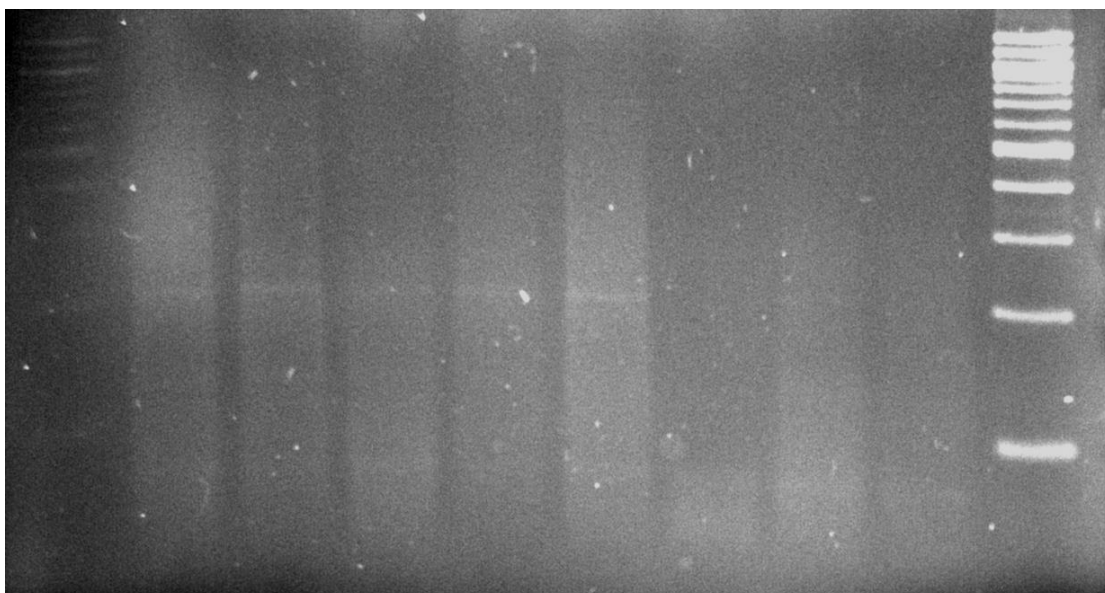
#### **4.5 Výsledky analýzy AFLP**

Na vzorcích získaných izolací DNA byla provedena analýza AFLP a následně i fragmentační analýza. Během samotného zpracování analýzy AFLP nedošlo k žádným obtížím ani komplikacím. Vždy před inkubací byly všechny mikrozkušavky důkladně dočerpány a následně obaleny hliníkovou folií, aby bylo předejito případnému odparu vzorku vlivem teploty, k inkubaci vzorků potřebné.

##### **4.5.1 Výsledky gelové elektroforézy**

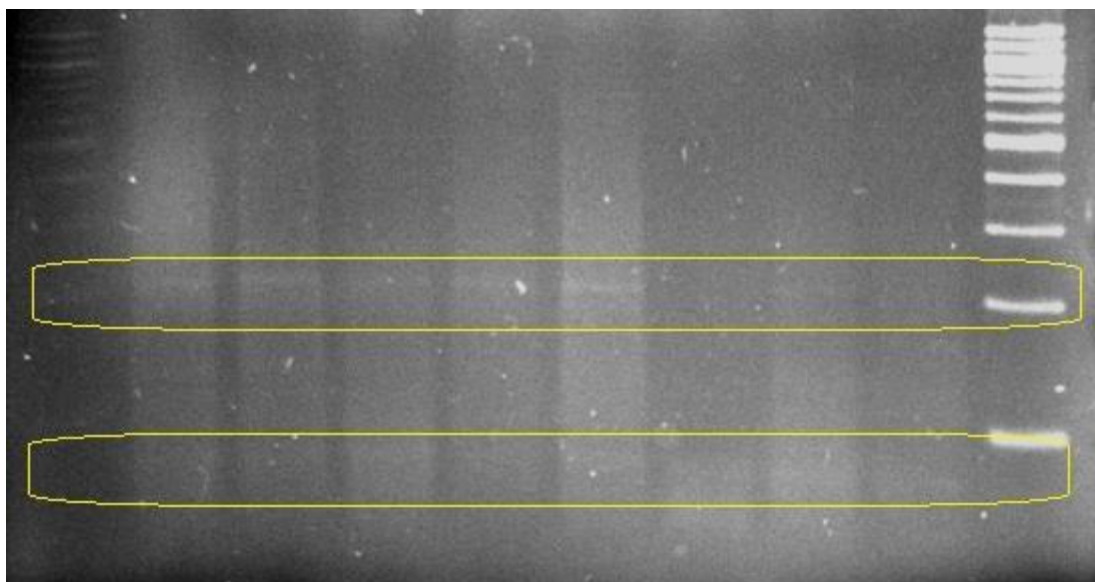
Po jednotlivých fázích procesu AFLP byla část vzorků překontrolována pomocí gelové elektroforézy (Obrázek 4.16), která měla za účel ověřit, zda došlo ke správnému průběhu daného procesu.

K tomuto kroku jak v případě pre-selektivní amplifikace tak i následné selektivní amplifikace bylo přikročeno nejen z důvodů průběžné kontroly, která znamenala úsporu času v případě, že by dílčí kroky nebyly úspěšné, ale především z důvodů úspory materiálu a finančních nákladů, potřebných pro nákladný a časově náročný proces fragmentační analýzy. Oproti fragmentační analýze provedené pomocí kapilární elektroforézy představuje gelová elektroforéza poměrně levnou a rychlou metodu, jak zkontrolovat úspěšnost zpracování techniky AFLP.



**Obrázek 4.17: Kontrolní měření výsledků preamplifikace fragmentů**

Z výsledku gelové elektroforézy pro fázi pre-amplifikace je viditelné naštěpení DNA na jednotlivé fragmenty, které jsou rovnoměrně rozprostřeny po celé délce elektroforetického produktu, který z tohoto důvodu působí dojem nepřerušované linie. Současně zde lze rozlišit několik výraznějších fragmentů, které se již amplifikovaly s preselektivním nukleotidem A (Obrázek 4.17). Tyto fragmenty jsou viditelné v několika výraznějších řádcích, které mezi celým amplifikovaným spektrem vynikají.

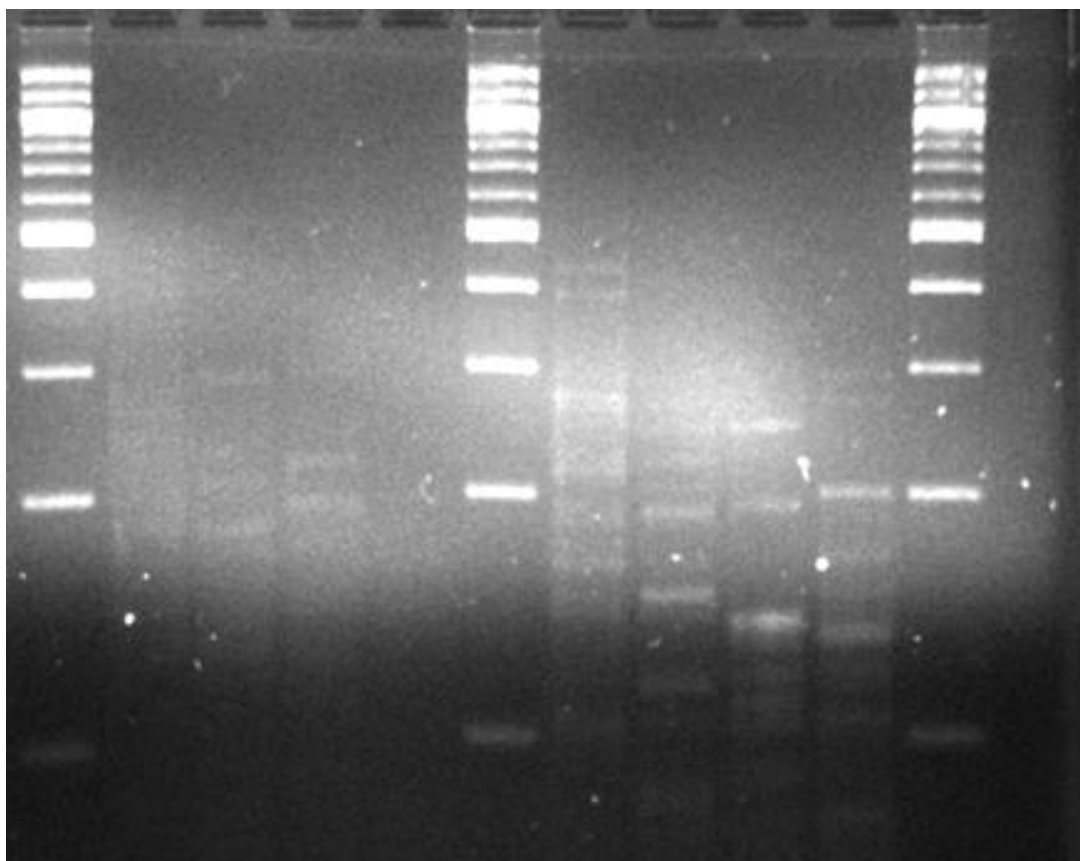


**Obrázek 4.16: Kontrolní měření výsledků preamplifikace fragmentů – zvýraznění produktu**

---

K otestování úspěšnosti pre-selektivní amplifikace bylo zvoleno 8 zástupců, které byly zvoleny napříč lokality i věkovou struktury studovaných vzorků. Konkrétně byly zvoleny (zleva doprava): Veselí I (5), Vlkov (34), Staňkovský (80), Nový Kanclíř (128), Podřezanský (159), Nový Hospodář (168), Hejtman (181) a Lipno I (253). Posledním sloupečkem, viditelným na výsledku gelové elektroforézy, je 100 bp Ladder, přidáný pro kontrolu a možnost stanovení velikosti separovaných fragmentů.

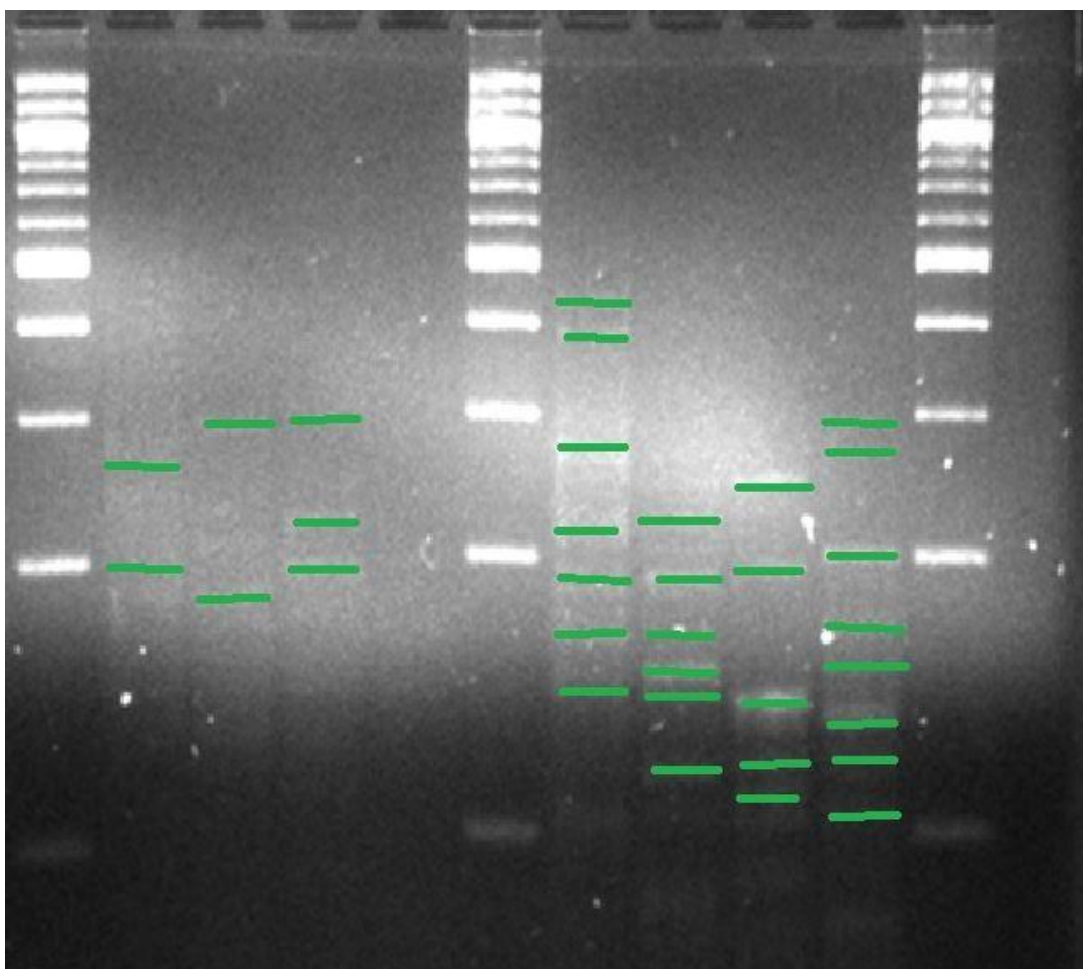
Na základě pozitivních výsledků gelové elektroforézy pro pre-selektivní amplifikaci bylo následně přistoupeno k samotné selektivní amplifikaci s použitím primerové kombinace *EcoRI*-ACG, *MseI*-AGT. I tento krok byl po dokončení amplifikace kontrolován pomocí gelové elektroforézy. Za tímto účelem bylo opět zvoleno 8 zástupců vzorků *Pectinatella magnifica*, které odpovídaly vzorkům použitým pro testování úspěšnosti fáze pre-amplifikace.



**Obrázek 4.18: Kontrolní měření výsledků selektivní amplifikace fragmentů**

Z výsledku gelové elektroforézy pro selektivní amplifikaci (Obrázek 4.18) je zřejmé, že proces amplifikace selektovaných fragmentů proběhl úspěšně a vzorky tak splnily podmínku pro podstoupení fragmentační analýzy pomocí sekvenačního

přístroje. Systém umístění vzorků na agarózovém gelu je následující (zleva doprava): 100 bp Ladder, Veselí I (5), Vlkov (34), Staňkovský (80), Nový Kanclíř (128), 100 bp Ladder, Podřezanský (159), Nový Hospodář (168), Hejtman (181) a Lipno I (253), 100 bp Ladder. Ladder byl v tomto případě mezi vzorky vložen opakovaně, aby bylo možné lépe porovnat přítomnost či nepřítomnost amplifikovaných fragmentů.



**Obrázek 4.19: Kontrolní měření výsledků selektivní amplifikace fragmentů – zvýraznění produktu**

Na výsledcích gelové elektroforézy (Obrázek 4.19) jsou patrné amplifikované fragmenty, získané selektivní amplifikací (vyznačeny zeleně). Již na těchto fragmentech jsou viditelné drobné rozdíly mezi jednotlivými jedinci druhu *Pectinatella magnifica*. U čtvrtého vzorku zleva (Nový Kanclíř - 128) není patrný žádný proužek, což by napovídalo chybě během selektivní amplifikace, případně signálu tak slabému, že není vzhledem ke kvalitě fotografie patrný. V případě špatného rozlišení elektroforetických produktů se proto doporučuje výsledné fotografie přeexponovat, aby byla zvýšena pravděpodobnost vizualizace i méně zřetelných

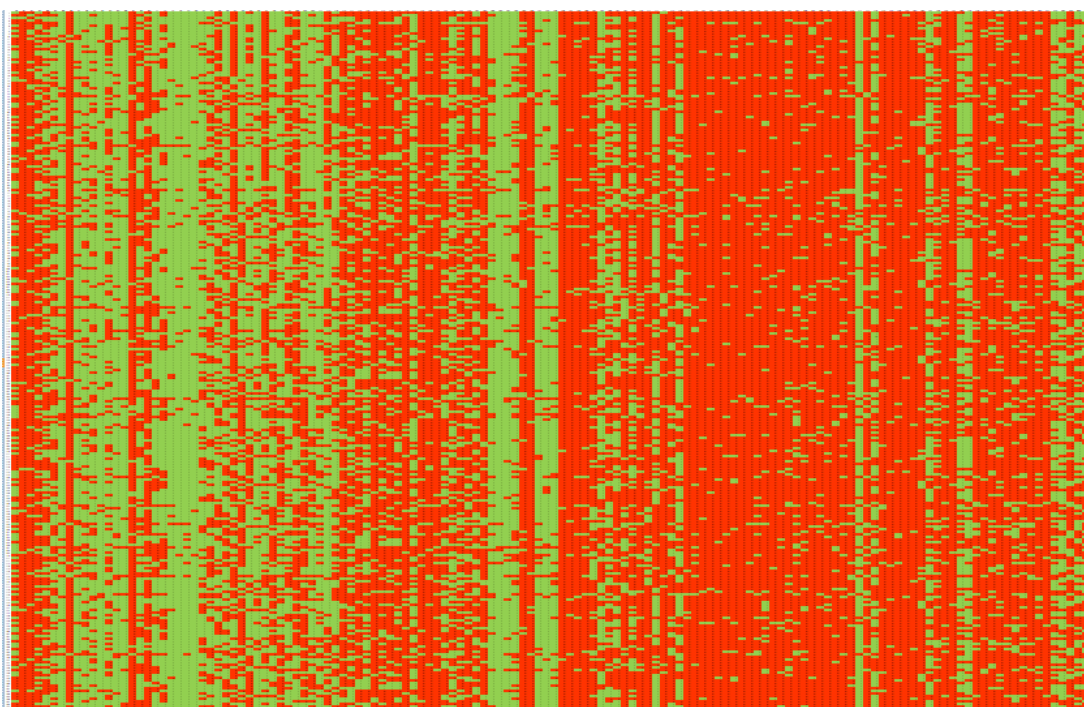
---

produktů. V případě nedostupnosti sekvenačního přístroje disponujícího kapilární elektroforézou bylo možné využít technik gelové elektroforézy pro ruční odečtení amplifikovaných fragmentů a následné vytvoření binární matice, kdy je výskyt amplifikovaného fragmentu vyznačen zeleně, pokud se na dané pozici fragment nenachází, je označen červeně (Příloha 9). K těmto účelům však nebývá používána horizontální gelová elektroforéza za použití agarozového gelu, ale elektroforéza vertikální s využitím polyakryamidového gelu, který disponuje lepšími separačními vlastnostmi.

#### **4.5.2 Výsledky fragmentační analýzy – celkový stav**

Pro potřeby studie genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* bylo zpracováno a následně vyhodnoceno 270 vzorků. Zhruba u 2 % vzorků bylo nutné provést opakované měření, kdy došlo ke špatnému nasednutí primerů během fáze selektivní amplifikace a tím i ztrátě produktu, případně se i přes veškerá opatření v analyzovaném produktu objevila vzduchová bublina, která celkové měření vzorku pomocí kapilární elektroforézy znehodnotila.

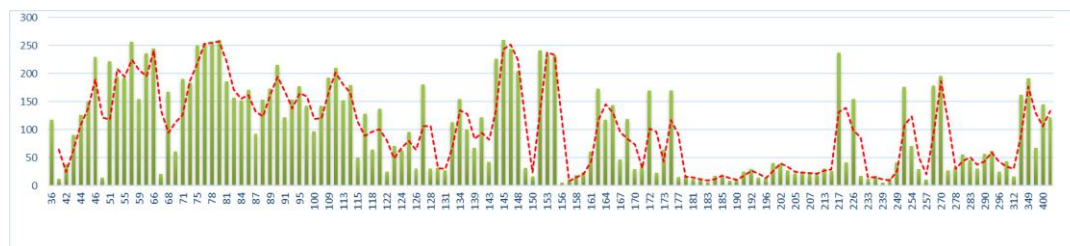
Díky technice kapilární elektroforézy, která pracuje na základě přítomnosti či nepřítomnosti signálu, vyzařovaném fluorescenčním primerem přítomným v amplifikovaném produktu, je ušetřen značný díl práce na vytvoření binární matice (1;0), kdy není třeba matici vytvářet manuálně, ale byla sestavena na základě elektroforetického produktu kapilární elektroforézy za použití programu Gene Mapper.



**Obrázek 4.20: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – celkový popis, pozice vzorků**

Obrázek 4.20 zobrazuje výsledky kapilární elektroforézy po vytvoření binární matice (1;0). Pro lepší vyhodnocení výsledků byla vytvořená matice obarvena, zelená barva představuje přítomnost amplifikovaného fragmentu (1), zatímco barva červená zastupuje jeho nepřítomnost (0).

Již barevné vyobrazení amplifikovaných fragmentů napovídá, že celková struktura amplifikovaných fragmentů se mezi jednotlivými vzorky značně podobá. Vzhledem k výsledkům předchozích studií byla pro genetické analýzy zvolena primerová kombinace E-ACG/M-AGT, na základě nejvyššího množství amplifikovaných fragmentů ze všech testovaných primerových kombinací. Ačkoliv v předešlé studii, na jejímž základu byla tato kombinace zvolena, byl počet amplifikovaných variabilních fragmentů 132 ze 157 v rozmezí 36–414 bp, v případě analýz pro disertační práci bylo získáno 139 variabilních fragmentů ze 159 v téže rozmezí velikostí, tedy 36–414 bp. Ze srovnání výsledků obou analýz za pomoci téže primerové kombinace je patrné, že se počet amplifikovaných variabilních fragmentů liší o 7. Tento rozdíl je možné přisoudit rozdílu v počtu analyzovaných vzorků, kdy vyšší počet vzorků umožňuje, že se variabilní fragment objeví alespoň u jednoho vzorku, a z tohoto důvodu s ním je pracováno.



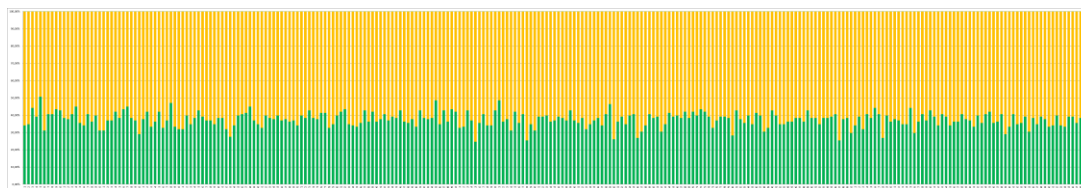
**Obrázek 4.21: Rozložení polymorfních fragmentů – celkový**

Na obrázku 4.21 je vyobrazeno rozložení amplifikovaných polymorfních fragmentů v DNA profilu. Jedná se o součet získaných variabilních fragmentů pro všechny vzorky, kdy osa X vyobrazuje velikost příslušného fragmentu, na jehož pozici se variabilní fragment vyskytoval a osa Y vyobrazuje sumu všech variabilních fragmentů, které se na dané pozici amplifikovaly. Čím vyšší získané číslo je, tím více vzorků má na dané pozici amplifikovaný polymorfní fragment. Pokud nějaký vzorek dosahuje hodnoty 1, pak se jedná o unikátní fragment v celém profilu fingerprintingu a může mít vliv na výpočet celkové diverzity studovaných vzorků. Z výsledků celkového fingerprintingu je patrné, že největší koncentrace variabilních fragmentů se objevuje v první polovině DNA fingerprintingu, kdy větší rozdíly mezi jednotlivými vzorky se začínají projevovat v druhé polovině grafu. Největší zastoupení variabilních fragmentů se vyskytuje na pozicích 51–65, 75–80 a 145–148 a okolo 153. Nejnižší zastoupení polymorfních fragmentů je možné zaznamenat na pozicích 40, 50, 67, 156, 177–196, 257 a 312.

Na základě dat získaných pomocí fragmentační analýzy a binární matice byly sestaven graf pro srovnání procentického zastoupení jednotlivých fragmentů u jednotlivých vzorků. Pro hlavní genetickou analýzu získaných výsledků byla dále vytvořena matice vzdáleností a stromový graf, vyjadřující genetickou vzdálenost analyzovaných vzorků.

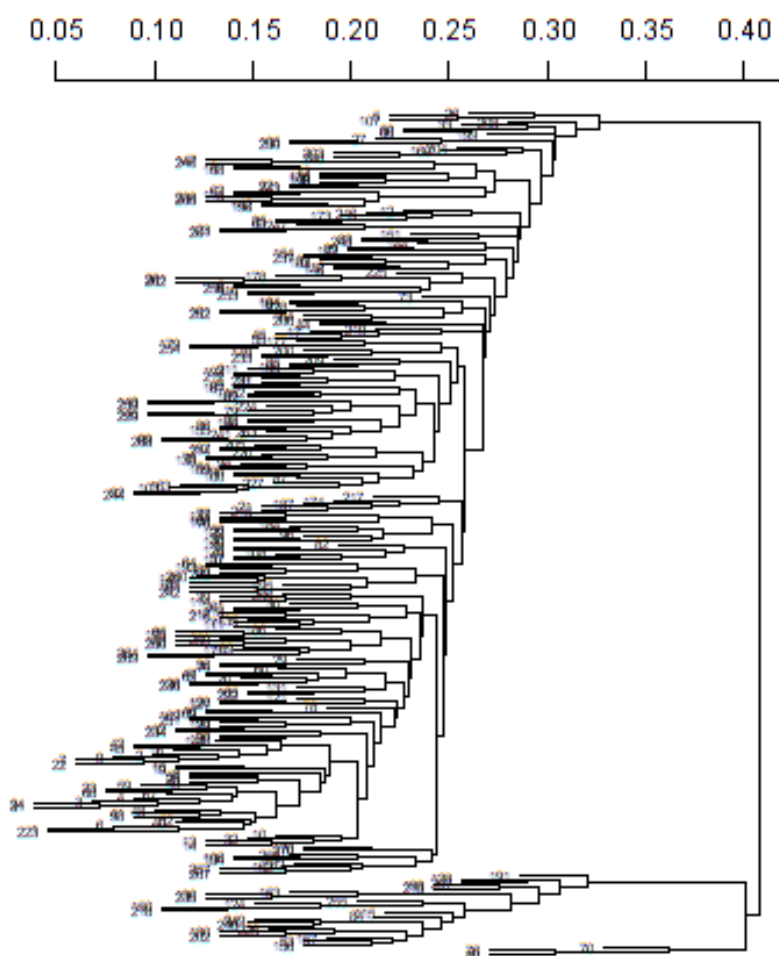
Pro lepší přehlednost a větší porozumění genetické struktury populace *Pectinatella magnifica* byl vytvořen nejdříve graf vyjadřující celkový stav populace, zastoupené analyzovanými vzorky. V dalším kroku byly vzorky a jím příslušné výsledky fragmentační analýzy roztrženy dle jednotlivých lokalit a znovu pro ně byla vytvořena matice vzdáleností a stromový graf, vyjadřující genetickou strukturu jednotlivých odběrových míst. Do těchto lokalit byly zahrnuty nejvýznamnější odběrová místa s dostatečným množstvím vzorků. Minimální počet vzorků použitých

do samostatné analýzy byl 9, a to u lokality Vápenský. Lokality Komárov (zastoupen 5 vzorky), USA (1 vzorek) a Finsko (1 vzorek) do dílčích analýz zahrnuty nebyly.



**Obrázek 4.22: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – celkové**

Z výsledků porovnání procentického zastoupení jednotlivých fragmentů (Obrázek 4.22) je patrné, že počet přítomných amplifikovaných variabilních fragmentů se u jednotlivých vzorků vyskytuje v rozmezí od 24,64 % po 50,72 % z celkového množství získaných fragmentů. Nejčastěji se vyskytující hodnotou v rámci celkového zastoupení variabilních fragmentů je 38,41 % amplifikovaných variabilních fragmentů u jednoho vzorku.



**Obrázek 4.23: Výsledky shlukovací analýzy – celkové**

---

Výsledky celkové shlukovací analýzy (Obrázek 4.23) zahrnovaly všech 270 vzorků, hodnocených pomocí techniky AFPL. Na diagramu je patrné shlukování vzorků do jednotlivých skupin, kdy každý z uzlů představuje jednu fázi shlukovacího procesu. Zvětšenina diagramu, včetně barevného roztržení dle jednotlivých lokalit se nachází v kapitole Přílohy jako Příloha 25 a 26.

Z výsledků shlukovací analýzy plyne, že většina analyzovaných vzorků se dělí do dvou hlavních klastrů ( $K=2$ ), kdy se převážná většina vzorků shlukuje do jedné početné velmi rozvětvené skupiny. Oproti tomu menší skupina, oddělující se od celku je tvořena 26 vzorky z celkového počtu 270. Do této skupiny patří vzorky pocházející z lokalit: Vlkov (34, 150, 153, 156, 157, 226), Veselí I (70, 202, 207, 210, 213, 218, 255), Staňkovský (76, 80, 235), Kořensko (53), Cep I (84), Finsko (115), Hejtman (124, 191), Nový Hospodář (180), Nový Kanclíř (128, 130, 198), Vydymač (249). Zjímavostí je, že vzorky odebrané v lokalitách USA (stát Oregon; vzorek č. 31) a v Chorvatsku (228) se shlukují ve větším z klastrů a vykazují celkově nízkou genetickou diverzitu v porovnání s ostatními analyzovanými vzorky, odebranými na území České republiky.

V případě druhého menšího klastru se jedná o vzorky různého stáří i původu. Do této skupiny patří vzorky ve stáří od méně než 1 roku až po vzorky 6leté. DNA vzorků 70 (Veselí I), 202 (Nový Kanclíř) a 76 (Staňkovský) pochází se stejného zásobního vzorku kolonií *Pectinatella magnifica* jako vzorky v původní pilotní studii, zpracovávané v předchozí diplomové práci. I v předešlé analýze tyto vzorky vykazovaly obdobnou míru genetické diverzity a stejný způsob shlukování vůči ostatním vzorkům získaným v rámci studovaných lokalit. Mezi vzorky spadajícími do skupiny druhého menšího klastru se nacházejí zástupci kolonií, které již během odběrů vykazovaly jistou míru odlišnosti oproti běžným vzorkům odebíraným na lokalitách. Častým jevem zaznamenaným u těchto kolonií byly odlišnosti ve struktuře gelovité matrix, kdy převážná skupina vzorků vytvářela měkký více vodnatý gel, zatímco u malého procenta vzorků byla gelovitá hmota pevná a tuhá, strukturně připomínající mozkovou tkáň (Příloha 10). Současně u některých vzorků kolonií *Pectinatella magnifica* byly pozorovány odlišnosti v teplotě vody, potřebné pro život kolonií. Ačkoliv je uváděno, že minimální teplota vodního prostředí pro životní procesy druhu *Pectinatella magnifica* je 20 °C, během odběrů byly zaznamenány kolonie, které úspěšně prosperovaly i ve vodě dosahující 13 °C.

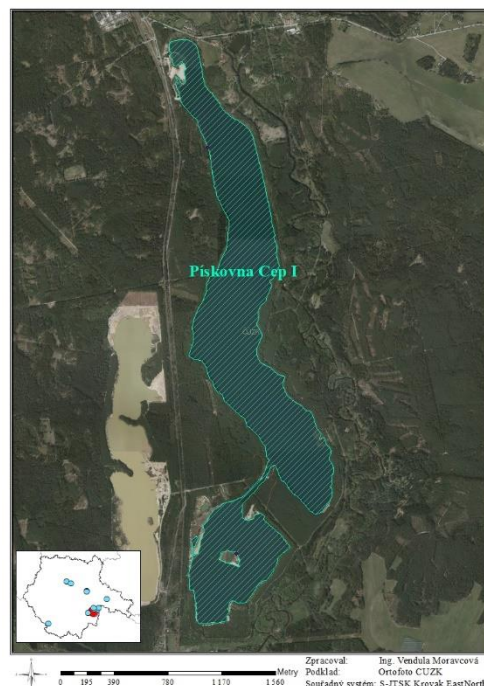
Pro srovnání výsledků s původní studií je v kapitole Přílohy umístěn stromový graf získaný analýzou AFLP obsaženou v diplomové práci (Moravcová, 2015) (Příloha 8).

#### 4.5.3 Výsledky fragmentační analýzy – pískovna Cep I

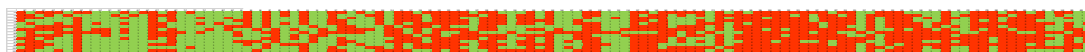
Vodní nádrž Cep I (Obrázek 4.24) je plocha pískovny nedaleko Suchdola nad Lužnicí o celkové ploše 2,25 ha a nadmořské výšce 461 m. n. m. Tato vodní nádrž v současné době slouží především k turistickým účelům díky čisté vodě, která se v letních měsících velmi rychle ohřívá a je tak vyhledávána jako lokalita ke koupání.

Lokalita Cep I byla zastoupena 15 vzorky, které se pohybovaly ve věku mezi 5 – 10 lety. Novější vzorky nemohly být do analýzy zahrnuty, z důvodu úplného vymizení kolonií *Pectinatella magnifica* ze studované lokality. Jedním z možných

vlivů na stav populace *Pectinatella magnifica* na lokalitě Cep I, je rozvoj povlaku na povrchu větví, který vytvořil značné konkurenční prostředí pro statoblasty a z nich se vyvíjející zooidy, kteří nebyli schopni se přichytit k podkladu a tím byl i znemožněn plnohodnotný vývoj životaschopných kolonií.

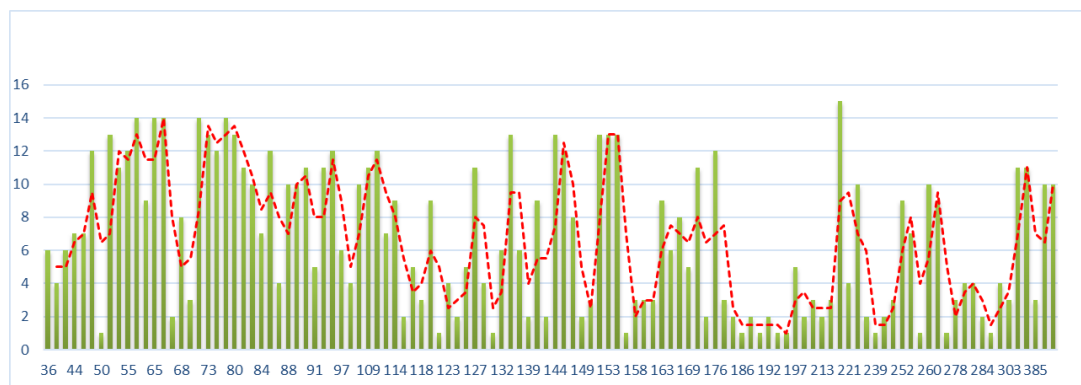


Obrázek 4.24: Mapa – pískovna Cep I



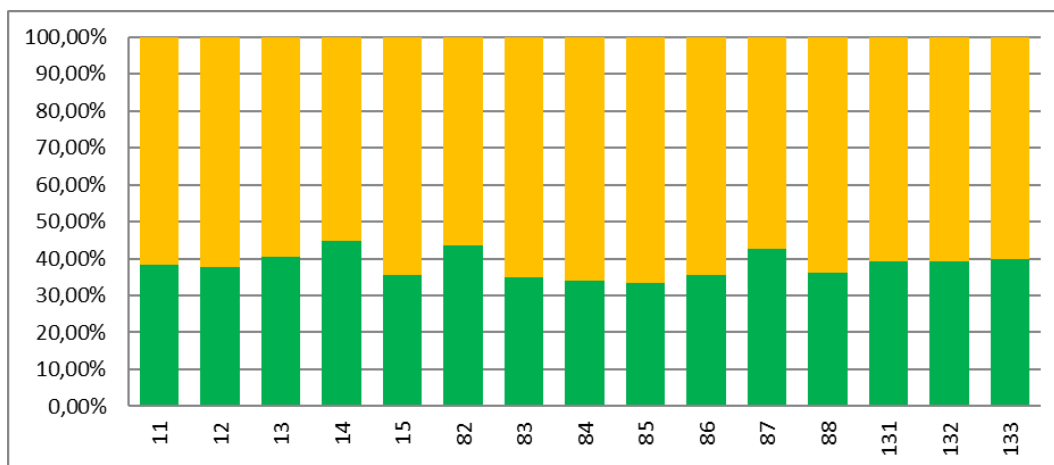
Obrázek 4.25: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – pískovna Cep I

Výsledky fragmentační analýzy a podrobný DNA fingerprinting pro vzorky odebrané na lokalitě Cep I jsou vyobrazeny na Obrázku 4.25. Jedná se o vzorky 11, 12, 13, 14, 15, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 131, 132 a 133. Při vyhodnocení výsledků DNA fingerprintingu pro lokalitu Cep bylo zjištěno, že oproti 139 variabilním fragmentům, které byly amplifikovány v kompletním DNA fingerprintingu všech vzorků bylo pro lokalitu Cep I získáno variabilních fragmentů pouze 114.



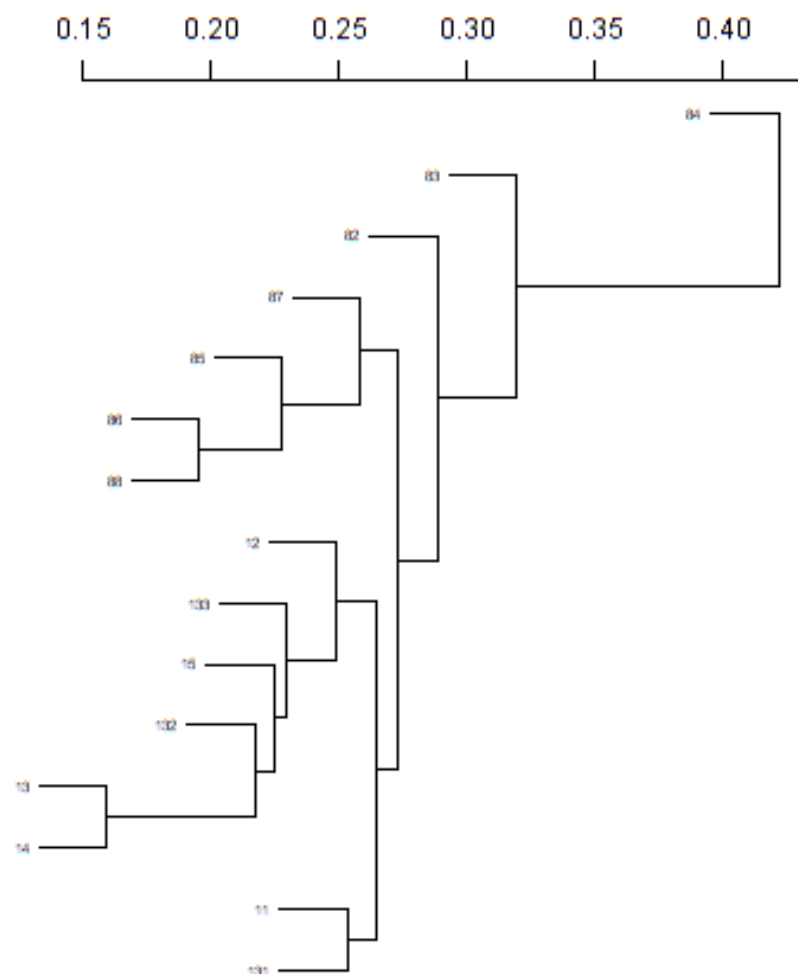
**Obrázek 4.26: Rozložení polymorfních fragmentů – pískovna Cep I**

Na Obrázku 4.26 je znázorněno rozložení polymorfních fragmentů vůči jednotlivým pozicím amplifikovaných fragmentů. Oproti celkovému obrazu jsou patrné větší proluky mezi fragmenty vyskytujícími se u téměř všech vzorků a těmi, které jsou zastoupeny pouze řídce. Na lokalitě Cep I jsou často se vyskytující fragmenty poměrně četné a rozložené po celé šířce fingerprintingu.



**Obrázek 4.27: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – pískovna Cep I**

Z výsledků procentického zastoupení amplifikovaných variabilních fragmentů (Obrázek 4.27) je patrná velmi nízká diverzita mezi jednotlivými vzorky. Všechny vzorky získané na pískovně Cep I vykazují hodnotu amplifikovaných fragmentů na úrovni 33,33 % - 44,93 %, avšak pouze 3 vzorky přesahují množství 40,00 % amplifikovaných variabilních fragmentů, jedná se o vzorky 14, 82 a 87. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 11.



**Obrázek 4.28: Výsledky shlukovací analýzy – pískovna Cep I**

Ze shlukovací analýzy pro lokalitu Cep I (Obrázek 4.28) je patrná vysoká podobnost mezi jednotlivými vzorky, kdy se z celkového shluku vzorků vyčlenily tři, které vykazují zvýšenou genetickou diverzitu oproti ostatním zbývajícím 12. Jedná se o vzorky 82, 83 a 84. Vzorek 84, který je v této skupině nejodlišnější, vykazuje vyšší genetickou diverzitu i v rámci analýz celkového množství vzorků, ostatní vzorky vykazují odlišnosti v rámci lokality, avšak v celkovém pohledu je jejich genetická diverzita nízká a shlukují se v rámci většího klastru. V případě odlišných vzorků se pravděpodobně jedná o drobné odchylky mezi jedinci v rámci lokality, avšak v celkovém pohledu je jejich odlišnost zanedbatelná a spíše se řadí mezi běžné zástupce kolonií *Pectinatella magnifica*, které osidlují oblast České republiky.

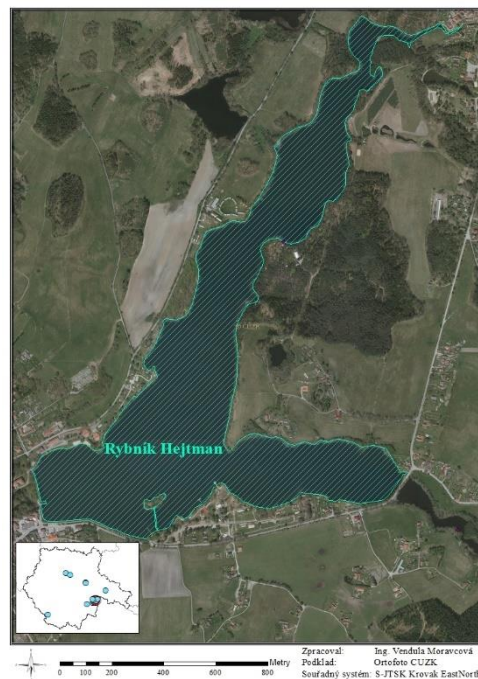
Nejodlišnější vzorek, tedy 84, je z celé skupiny vzorků, pocházejících z lokality Cep I, nejmladším a je tak jedním z posledních vzorků, které bylo možné na této

lokalitě odebrat před vymizením kolonií *Pectinatella magnifica* v této oblasti. Odebírané kolonie nevykazovaly žádnou významnou odlišnost, a pravděpodobně se jedná pouze o drobné odchylky v genomu jednotlivých jedinců, které se neprojevily na venek.

#### 4.5.4 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Hejtmán

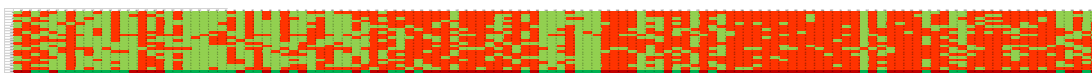
Rybník Hejtmán (Obrázek 4.29) je vodní nádrž v Chlumu u Třeboně o celkové výměře 80 ha v nadmořské výšce 492 m. n. m. Tento rybník je lokalitou hojně vyhledávanou jak z důvodu letní rekreace, kdy se na břehu nachází několik rozsáhlých kempů, ale především z důvodů rybaření.

Lokalita Hejtmán byla reprezentována 23 vzorky o stáří méně než jednoho roku až po vzorky staré 6 let. Na této lokalitě docházelo k pravidelnému pozorování, kdy z počátku byly kolonie *Pectinatella magnifica* objemnější a častěji pozorovatelné, zejména na hrázi rybníka v oblasti Chlumu



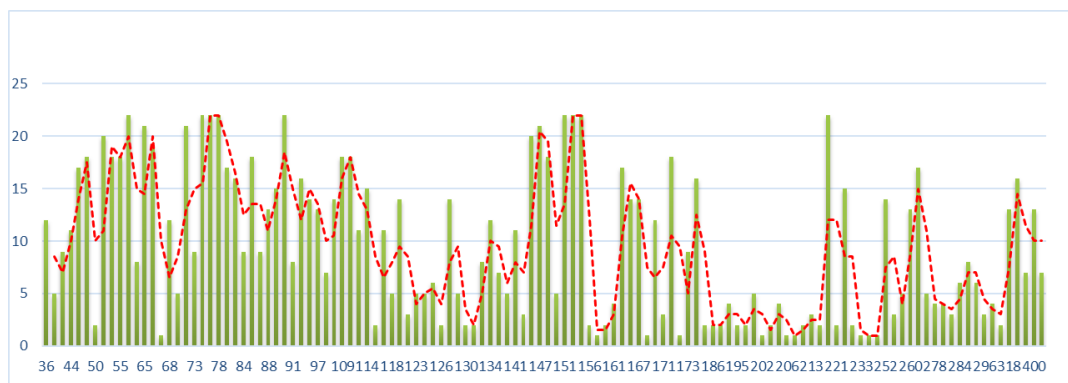
Obrázek 4.29: Mapa – rybník Hejtmán

u Třeboně. V posledních letech došlo ke zmenšení počtu kolonií i jejich objemu, pravděpodobně vlivem zvýšeného turistického ruchu a navýšením pH vody, kdy během pozorování pH vody v rybníce Hejtmán narůstalo během letní sezony až na 8,6.



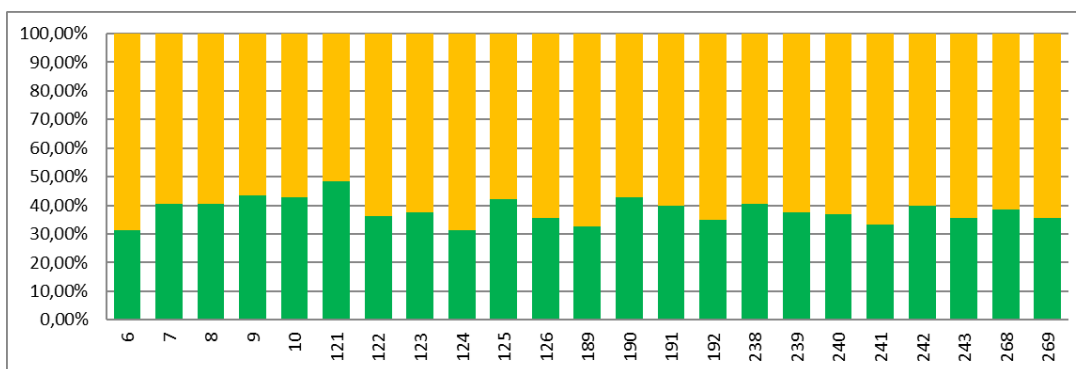
Obrázek 4.30: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Hejtmán

Obrázek 4.30 znázorňuje kompletní fingerprinting pro vzorky 6, 7, 8, 9, 10, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 189, 190, 191, 192, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 268 a 269. Při vyhodnocení výsledků DNA fingerprintingu bylo zjištěno, že oproti 139 variabilním fragmentům, které byly amplifikovány v kompletním DNA fingerprintingu všech vzorků, bylo pro lokalitu Hejtmán získáno variabilních fragmentů 122.



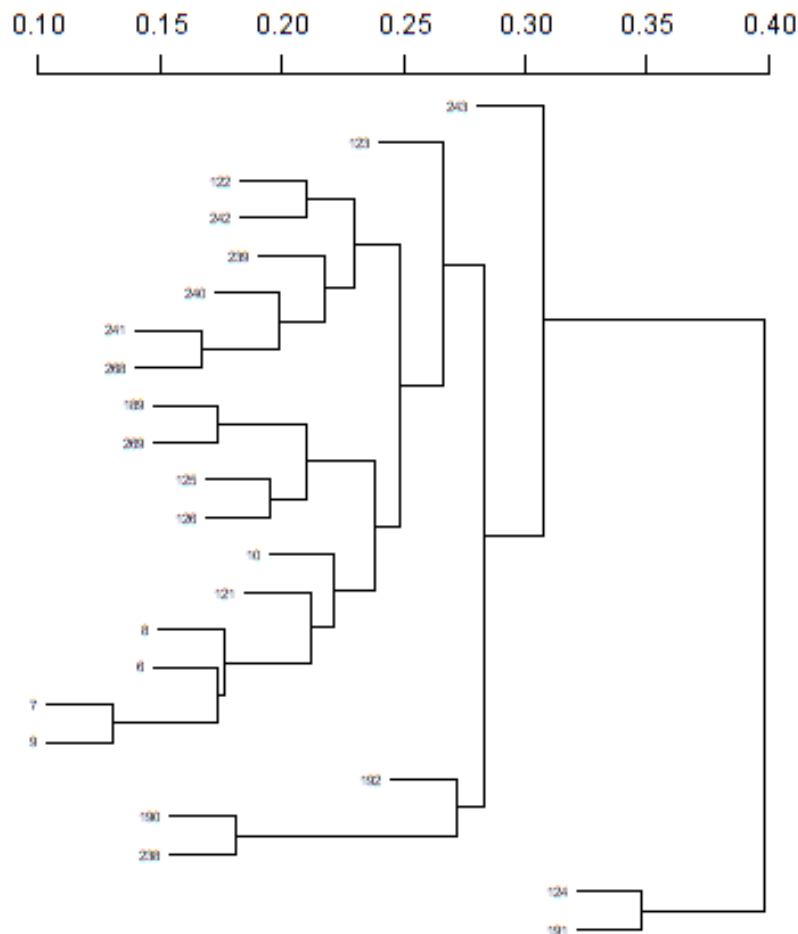
**Obrázek 4.31: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Hejtman**

Obrázek 4.31 vyobrazuje strukturu amplifikovaných polymorfních fragmentů na lokalitě Hejtman. Na grafu je patrné střídavé narůstání počtu variabilních fragmentů a jejich opětovný pokles. V první polovině grafu jsou amplifikované fragmenty četnější, zatímco v druhé polovině se začínají prosazovat spíše méně zastoupené fragmenty.



**Obrázek 4.32: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Hejtman**

Z procentického zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Hejtman (Obrázek 4.32) je patrná drobná rozkolísanost v počtu amplifikovaných variabilních fragmentů, kdy největší odchylku vykazují vzorky 6 (31,16 %), 124 (31,16 %) a 121 (48,55 %). V případě ostatních vzorků se průměrné množství amplifikovaných variabilních fragmentů pohybuje mezi 35,00 – 42,00 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 12.



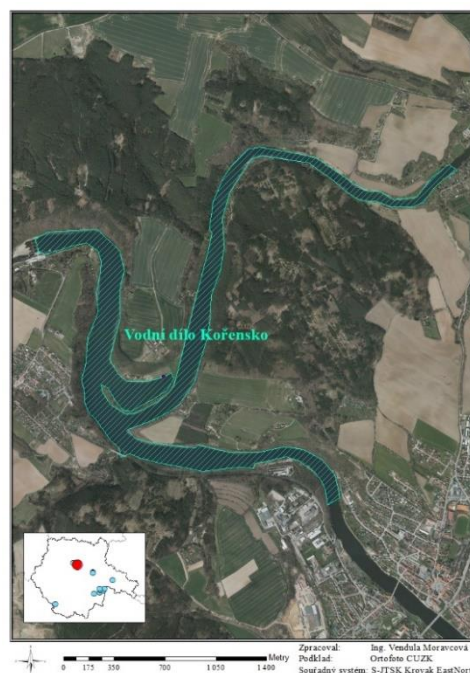
**Obrázek 4.33: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Hejtman**

Ze shlukovací analýzy pro lokalitu Hejtman (Obrázek 4.33) je patrná vysoká podobnost mezi jednotlivými vzorky, kdy se z celkového shluku vzorků vyčlenily tři vzorky, které vykazují v rámci lokality zvýšenou genetickou diverzitu oproti zbytku. Jedná se o vzorky 124, 191 a 243. Vzorky 124 a 191, které jsou v této skupině nejodlišnější vykazují vyšší genetickou diverzitu i v rámci analýz celkového množství vzorků. Tyto vzorky patří mezi mladší ze vzorků. V době jejich izolace bylo stáří těchto vzorků okolo 1 roku a je tak vysoce pravděpodobné, že kvalita DNA z těchto vzorků byla na velmi dobré úrovni. Samotné vzorky byly odebírány v letním období, po krátkém období přivalových srážek, kdy teplota vod krátkodobě klesla pod požadovanou úroveň a gelovitá matrix těchto vzorků byla spíše vodnatá, již značně osídlená koloniemi červených a modrozelených sinic. Ačkoliv byl stav kolonií, které začínaly mírně odumírat, přisuzován zhoršení životních podmínek, důvod by mohl být ve stáří kolonie, čemuž by i napovídala obsazenost gelovité matrix.

Přestože vzorek 243 vykazuje jistou míru odlišnosti v rámci studované lokality, v celkovém pohledu je jeho genetická diverzita nižší a shlukuje se v rámci většího klastru. Z toho by se dalo usuzovat na mírné odlišnosti v genetické struktuře, avšak ne tak zásadní, aby se projevil v celkovém obrazu české populace mechovky.

#### 4.5.5 Výsledky fragmentační analýzy – vodní dílo Kořensko

Vodní dílo Kořensko (Obrázek 4.34) se nachází nedaleko Týna nad Vltavou a dosahuje rozlohy 130 ha v nadmořské výšce 330 m. n. m. Kořensko je lokalita vyhledávána jako oblast vhodná ke koupání a rybolovu, s omezeními kvůli lodní dopravě a přítomnosti zdymadla a malé vodní elektrárny. Samotná vodní nádrž se vyznačuje poměrně čistou vodou, avšak s ohledem na objem nádrže dochází k prohřátí na požadovanou teplotu jen velmi výjimečně. Požadovaných 20 °C bývá dosaženo pouze na osluněných březích, kde bývají nalézány kolonie mechovky.



Obrázek 4.34: Mapa – vodní dílo Kořensko

Výjimečně mohou být k nalezení i v oblasti hráze.

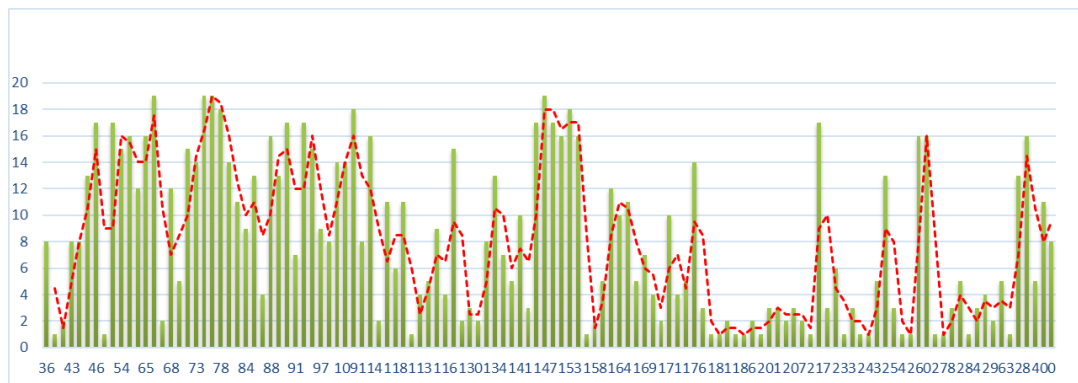
Lokalita Kořensko byla reprezentována 20 vzorky o stáří méně než jeden rok až po 6 let, kdy nejčtenější skupiny vzorků byly reprezentovány vzorky 1 a 2letými. Lokalita Kořensko nebyla odebírána cíleně, ale jednalo se o vzorky odebrané při náhodném pohybu na lokalitě či byly nahlášeny od náhodných pozorovatelů, kteří lokalitu využívají k rybářským a rekreačním účelům.



Obrázek 4.35: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – vodní dílo Kořensko

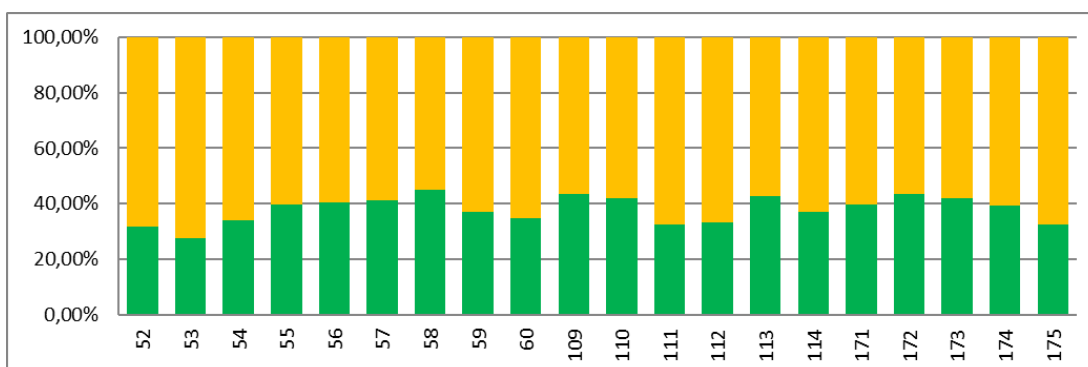
Obrázek 4.35 znázorňuje kompletní fingerprinting pro vzorky 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 171, 172, 173, 174, a 175. Při vyhodnocení výsledků DNA fingerprintingu bylo zjištěno, že oproti 139 variabilním fragmentům, které byly amplifikovány v kompletním

DNA fingerprintingu všech vzorků bylo pro lokalitu Kořensko získáno variabilních fragmentů 122.



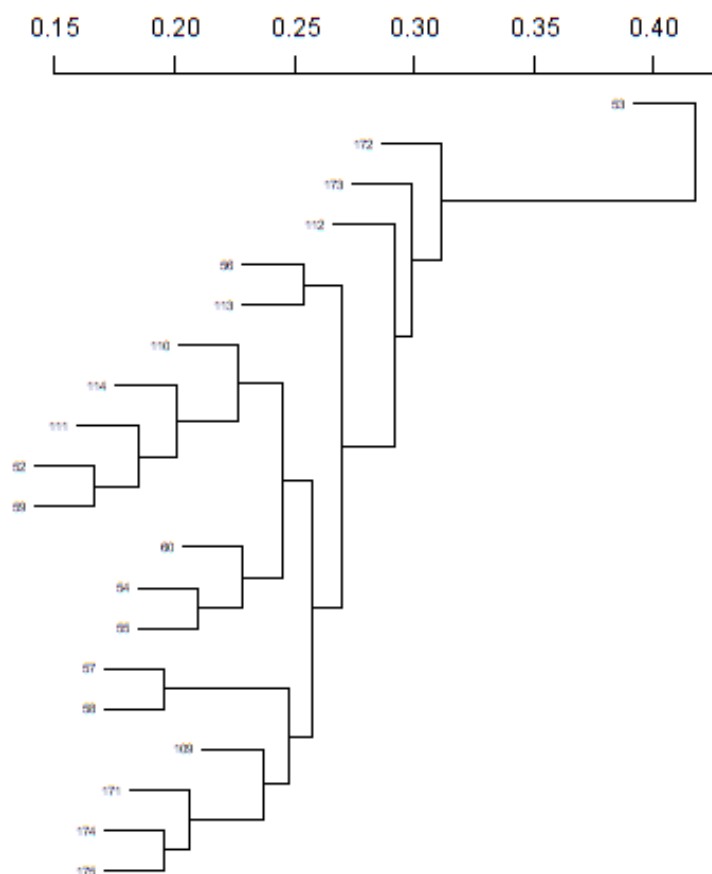
**Obrázek 4.36: Rozložení polymorfních fragmentů – vodní dílo Kořensko**

Obrázek 4.36 zobrazuje rozložení polymorfních fragmentů na lokalitě Kořensko, kdy nejvyššího maximálního zastoupení dosahují v prvních dvou třetinách fingerprintingu. Ve třetí třetině se v rámci této lokality začínají objevovat jedinečné hodnoty, které by mohly ovlivňovat následné vyhodnocení genetické diverzity.



**Obrázek 4.37: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – vodní dílo Kořensko**

Z procentického zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Kořensko (Obrázek 4.37) je patrná drobná rozkolísanost v počtu amplifikovaných variabilních fragmentů, kdy největší odchylku vykazují vzorky 53 (27,54 %), a 58 (44,93 %). V případě ostatních vzorků se průměrné množství amplifikovaných variabilních fragmentů pohybuje od 31,88 % až po 43,48 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 13.



**Obrázek 4.38: Výsledky shlukovací analýzy – vodní dílo Kořensko**

Shlukovací analýzy pro lokalitu Kořensko (Obrázek 4.38) vykazují postupné shlukování jednotlivých vzorků, kdy z celku jsou nejodlišnější čtyři, které vykazují v rámci lokality zvýšenou genetickou diverzitu oproti ostatním 16. Jedná se o vzorky 53, 112, 172 a 173. Vzorek 53, který na dané lokalitě vykazuje nejvyšší genetickou diverzitu, se v rámci celku shlukuje v menším, geneticky odlišnějším klastru. Ostatní 3 vzorky vykazují zvýšenou genetickou diverzitu pouze v rámci studované lokality, avšak v širším celku vykazují shlukování s větší skupinou vzorků.

Vzorek 53, který vykazuje nejvyšší genetickou diverzitu v rámci studované lokality se řadí mezi starší vzorky odebrané na dané lokalitě, získaný nedaleko hráze vodní nádrže Kořensko. Během odběru nevykazoval žádnou významnou odlišnost, z tohoto důvodu lze usuzovat na zvýšenou diverzitu v rámci genetické struktury, která se dosud neprojevila žádným vnějším znakem. Zbytek kolonií, které se odlišují v rámci lokality se liší od zbytku vzorků pouze minimálně a ani v rámci celkového

shlukovacího procesu nevykazují žádné významné odlišnosti od běžné populace kolonií *Pectinatella magnifica*.

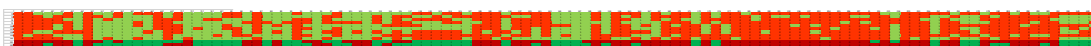
#### 4.5.6 Výsledky fragmentační analýzy – vodní nádrž Lipno I

Vodní nádrž Lipno I (Obrázek 4.39) se nachází na horním toku řeky Vltavy na hranici CHKO a NP Šumava. Jedná se o největší umělé jezero České republiky s plochou 4870 ha a nachází se v nadmořské výšce 776 m. n. m. Oblast Lipenska je vyhlášena masivním turismem se značným množstvím kempů, pláži malých přístavů a mnoha lokalit vhodných pro rybolov.

Lokalita Lipno I byla reprezentována 12 vzorky o stáří jednoho roku až po vzorky staré 5 let. Většina z použitých vzorků byla dvouletá. Na této lokalitě nedocházelo k pravidelnému pozorování, ale vzorky byly odebírány náhodně při pohybu po lokalitě, nebo byly nahlášeny od místních pozorovatelů. V poslední době se šíří hlášení zejména z řad rekreatantů a rybářů, což by mohlo napovídat o rozšiřující se populaci *Pectinatella magnifica* v této lokalitě, pravděpodobně s ohledem na vyšší počet mrazových dnů v lokalitě Lipenska oproti oblasti Třeboňska.

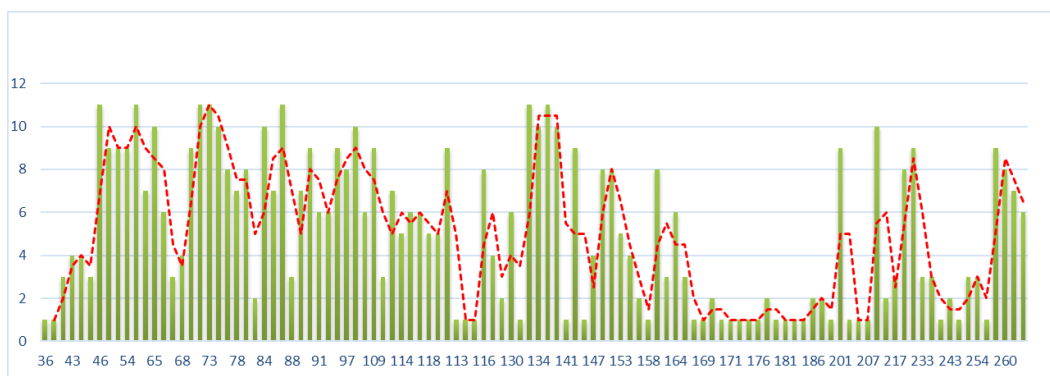


Obrázek 4.39: Mapa – vodní nádrž Lipno I



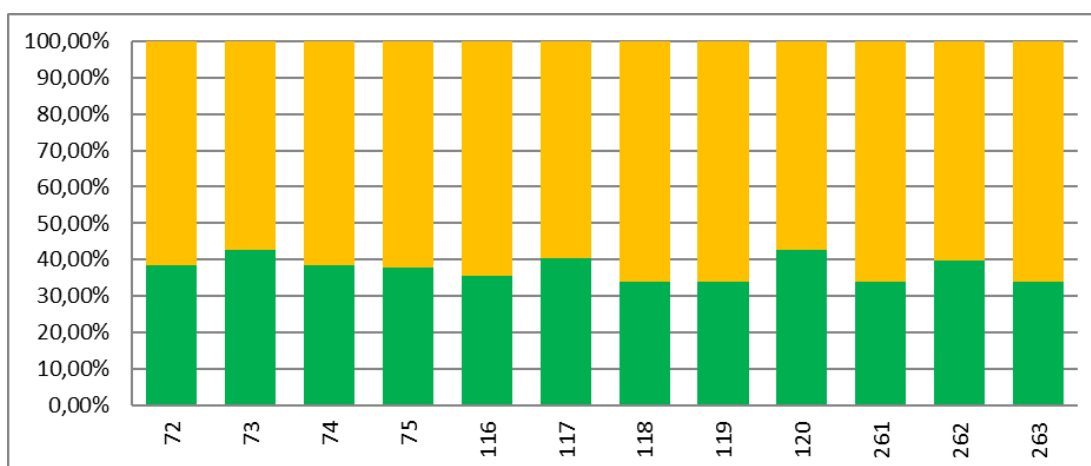
Obrázek 4.40: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – vodní nádrž Lipno I

Obrázek 4.40 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro vzorky 72, 73, 74, 74, 116, 117, 118, 119, 120, 261, 262 a 263, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, v rámci lokality Lipno I bylo variabilních fragmentů pouze 109.



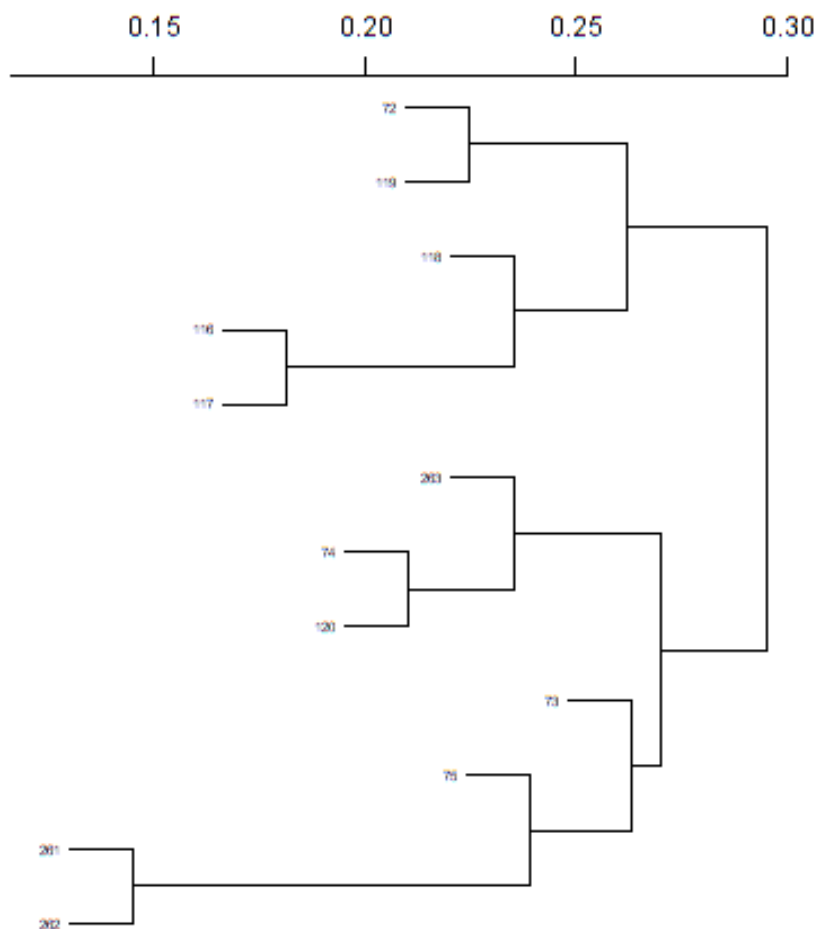
**Obrázek 4.41: Rozložení polymorfních fragmentů – vodní nádrž Lipno I**

Obrázek 4.41 zobrazuje zastoupení polymorfních fragmentů, kdy polovina až dvě třetiny amplifikovaných fragmentů je zastoupena téměř u všech vzorků. Ve třetí třetině se více objevují unikátní fragmenty, které mohou mít vliv na genetickou diverzitu studovaných vzorků.



**Obrázek 4.42: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – vodní nádrž Lipno I**

Z procentuálního zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Lipno I (Obrázek 4.42) je patrná vyrovnanost v počtu amplifikovaných variabilních fragmentů, kdy nejnižší procentuální zastoupení počtu variabilních fragmentů odpovídá 34,06 % pro vzorky 118, 119, 261 a 263. Nejvyšší procentuální zastoupení variabilních fragmentů je 42,75 % pro vzorky 73 a 120. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 14.



**Obrázek 4.43: Výsledky shlukovací analýzy – vodní nádrž Lipno I**

Z výsledků shlukovací analýzy (Obrázek 4.43) je patrné, že na lokalitě Lipno I vykazují kolonie *Pectinatella* velmi nízkou diverzitu, Vzorky zpracovávané pro tuto lokalitu se shlukují do dvou samostatných skupin, avšak vzájemně velmi málo odlišných. Na lokalitě Lipno I žádný ze vzorků nevykazuje zvýšenou genetickou diverzitu v rámci samostatné skupiny ani v rámci celkového obrazu populace mechovky na území Čech. Z těchto výsledků je patrné, že v rámci celku je genetická diverzita vzorků odebraných na lokalitě Lipno velice nízká, kdy v rámci lokality vykazují nepatrné rozdíly.

#### 4.5.7 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Nový Hospodář

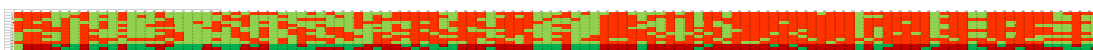
Rybník Nový Hospodář (Obrázek 4.44) se nachází v CHKO a BR Třeboňsko nedaleko obce Chlum u Třeboně v nadmořské výšce 439 m. n. m. Tato vodní nádrž dosahuje rozměru 20,97 ha, a ačkoliv bývá využívána turisty ke koupání, jedná se primárně o rybochovný rybník spadající pod správu Rybářství Třeboň.

Lokalita Nový Hospodář byla zastoupena 14 vzorky o stáří 1 až 6 let, kdy největší zastoupení měly vzorky o stáří dvou let. Lokalita Nový Hospodář nebyla pravidelně pozorována a vzorky byly odebírány náhodně dle výskytu kolonií *Pectinatella magnifica* na dané lokalitě. Kolonie na lokalitě Nový

Hospodář se nevyskytovaly pravidelně a jejich výskyt nebyl stálý jako na místech s pravidelným odběrem.

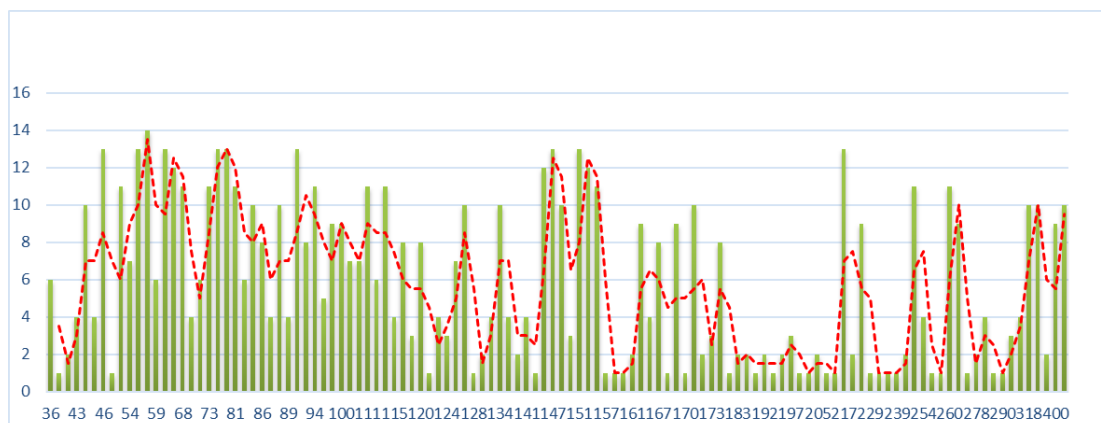


Obrázek 4.44: Mapa – rybník Nový Hospodář



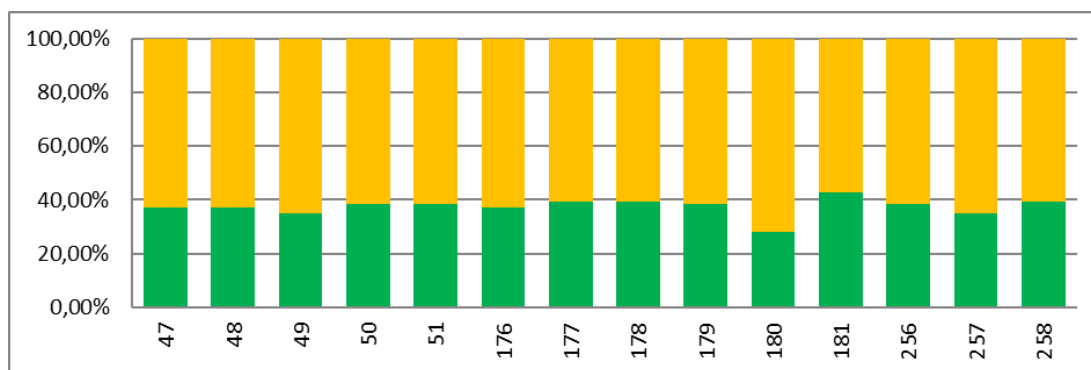
Obrázek 4.45: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Nový Hospodář

Obrázek 4.45 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro vzorky 47, 48, 49, 50, 51, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 256, 257 a 258, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, v rámci lokality Nový Hospodář bylo variabilních fragmentů 116.



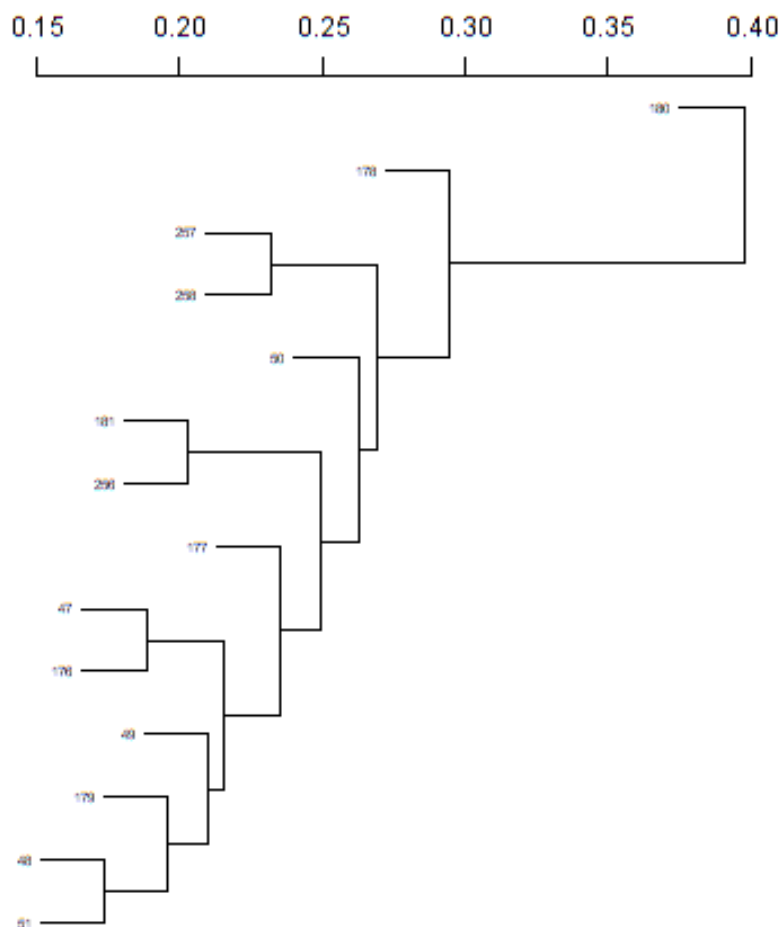
Obrázek 4. 46: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Nový Hospodář

Na obrázku 4.46 je vyobrazena struktura polymorfních fragmentů amplifikovaných pro lokalitu Nový Hospodář. Na obrázku je patrné výrazné množství fragmentů ze začátku grafu, kdy dochází k pozvolnému poklesu a poté opětovnému nárůstu amplifikovaných fragmentů. Ve dvou třetinách grafu je výrazná plocha s jedinečnými polymorfními fragmenty.



**Obrázek 4.47: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Nový Hospodář**

Z percentického zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Nový Hospodář (Obrázek 4.47) je patrné, že zastoupení polymorfních fragmentů je u jednotlivých vzorků rovnoměrné. Nejnižší procentuální zastoupení počtu variabilních fragmentů odpovídá 28,26% pro vzorek 180 a nejvyšší procentuální zastoupení variabilních fragmentů je 42,75% pro vzorek 181. Většina vzorků reprezentujících lokalitu Nový Hospodář má percentického zastoupení polymorfních fragmentů na úrovni mezi 34,78 – 39,13 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 15.



**Obrázek 4.48: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Nový Hospodář**

Z výsledků shlukovací analýzy (Obrázek 4.48) pro lokalitu Nový Hospodář je patrné, že kolonie *Pectinatella magnifica* vykazují velmi nízkou diverzitu, kdy se většina vzorků shlukuje do jedné skupiny. Z celkového množství vzorků odebraných na této lokalitě se vyčleňují dva vzorky a to vzorek 178 a vzorek 180.

Nejodlišnější je v tomto případě vzorek 180, který vykazuje výraznou odlišnost od ostatních vzorků, vzhledem ke vzdálenosti uzlu shlukování. Tento vzorek se v celkovém shlukování přiřadil k druhému menšímu klastru, který vykazoval vyšší genetickou diverzitu oproti celkovému množství vzorků. Zvláštností tohoto vzorku byla teplota vody, ve které byl odebrán. K odběru došlo na začátku sezony při kontrolním pozorování pro zjištění prvních náznaků začátku vegetační sezony. V této době voda dosahovala max 13°C, avšak na lokalitě Nový Hospodář již rostla plnohodnotná kolonie produkující první statoblasty. V tomto případě by se tedy dalo usuzovat na jistou adaptaci na chladnější vodu.

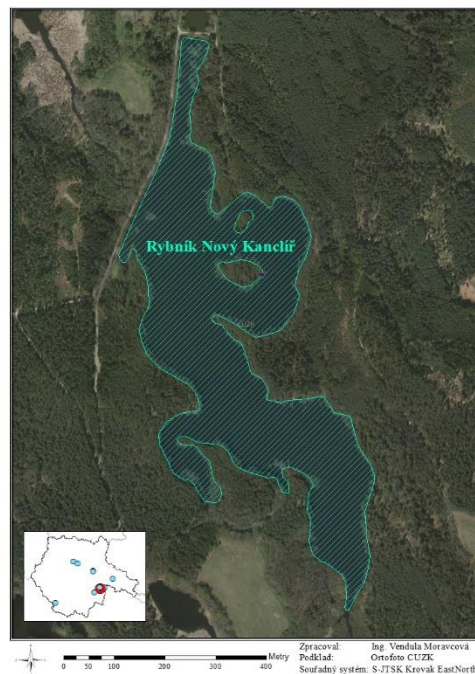
Vzorek 178 vykazuje v rámci lokality mírnou odlišnost, avšak v celkové shlukovacím procesu se řadí do prvního většího klastru.

#### 4.5.8 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Nový Kanclíř

Rybník Nový Kanclíř (Obrázek 4.49) se nachází cca 2 kilometry od Chlumu u Třeboně v nadmořské výšce 442 m. n. m. Jedná se o vodní plochu o velikosti 30,4 ha, velmi oblíbenou jako lokalita pro rybolov, vzhledem k pravidelně doplňované rybí obsádce. Rybník je v současné době ve správě rybářství Třeboň.

Lokalita Nový Kanclíř byla reprezentována 20 vzorky o stáří méně než jednoho roku až po stáří 6 let. Jedná se o lokalitu pravidelně sledovanou se stálým výskytem kolonie *Pectinatella magnifica*, kdy kolonie na dané lokalitě v posledních letech zaznamenaly nepatrné zmenšení

z hlediska velikosti, která může být způsobena rychlým rozvojem kolonie a brzkým úhynem vlivem nástupu sinic, které odčerpávají kyslík z vody. Druh *Pectinatella magnifica* na množství kyslíku ve vodě citlivá a poměrně náročná, kvůli čemuž je pro ni rozvoj vodního květu limitující.

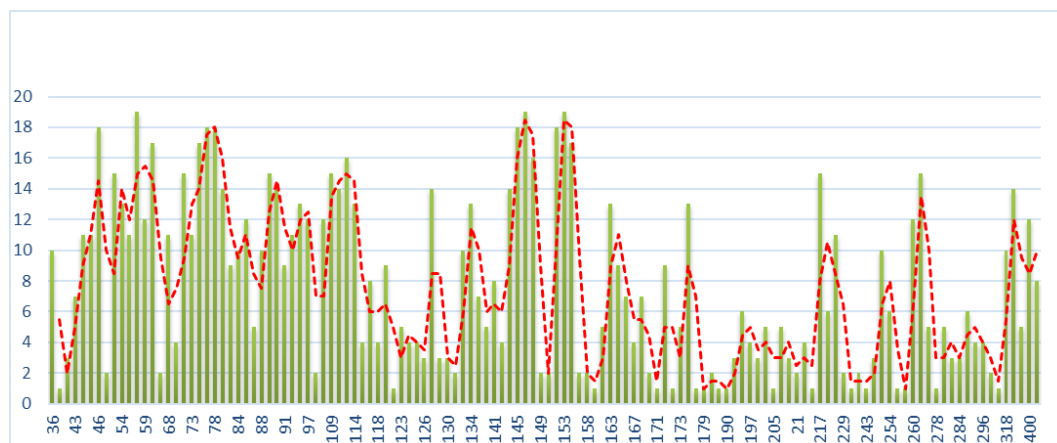


Obrázek 4.49: Mapa – rybník Nový Kanclíř



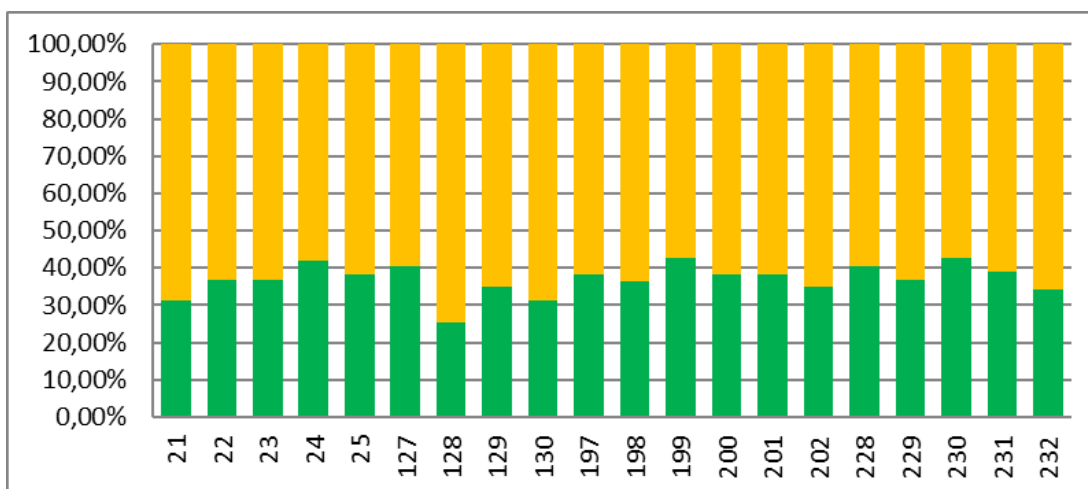
Obrázek 4.50: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Nový Kanclíř

Obrázek 4.50 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro vzorky 21, 22, 23, 24, 25, 127, 128, 129, 130, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 228, 229, 230, 231 a 232, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných. Pro všechny studované vzorky, v rámci lokality Nový Hospodář bylo variabilních fragmentů 128.



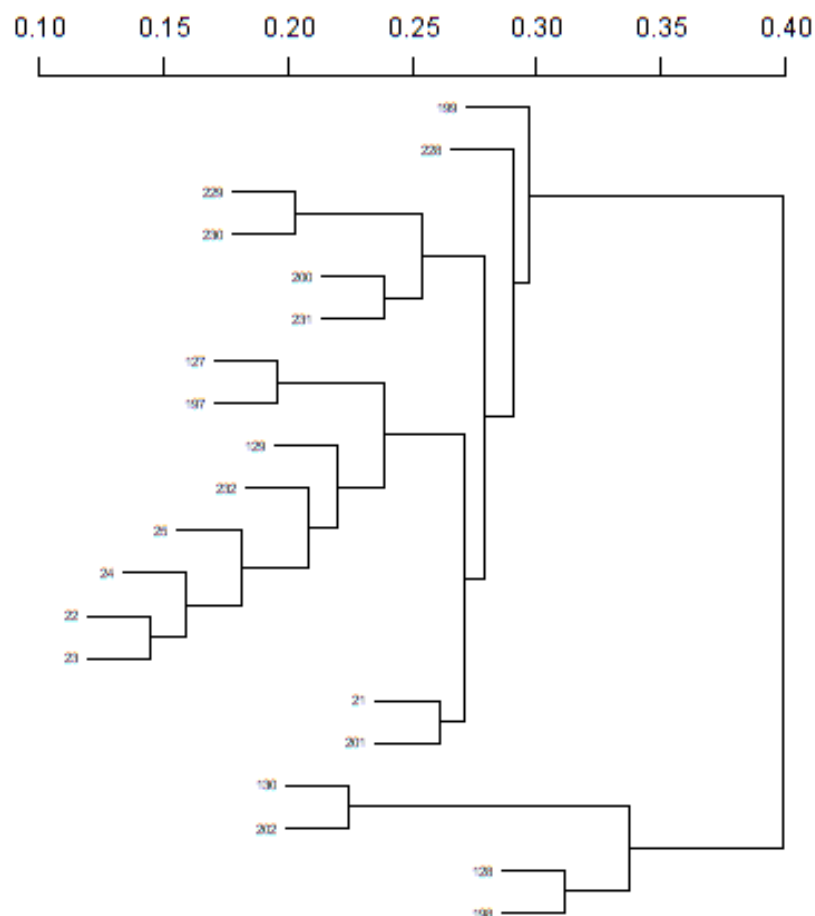
**Obrázek 4.51: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Nový Kanclíř**

Na obrázku 4.51 je vyobrazena struktura amplifikovaných polymorfních fragmentů, kdy na lokalitě Nový Kanclíř dochází k pravidelnému střídání oblastí s vysokým zastoupením polymorfních fragmentů a oblastí s výskytem fragmentů unikátních. Na lokalitě Nový Kanclíř je převaha vzorků s vysokým zastoupením polymorfních fragmentů, jedinečné fragmenty jsou spíše v menšině.



**Obrázek 4.52: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Nový Kanclíř**

Z procentuálního zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Nový Hospodář (Obrázek 4.52) je patrné mírné kolísání. Nejnižší procentuální zastoupení počtu variabilních fragmentů odpovídá 25,36 % pro vzorek 128 a nejvyšší procentuální zastoupení variabilních fragmentů je 42,75 % pro vzorky 199 a 230. Nejvíce vzorků odebraných na lokalitě Nový Kanclíř vykazovalo procentuální zastoupení polymorfních fragmentů mezi 36,23 % a 40,58 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 16.



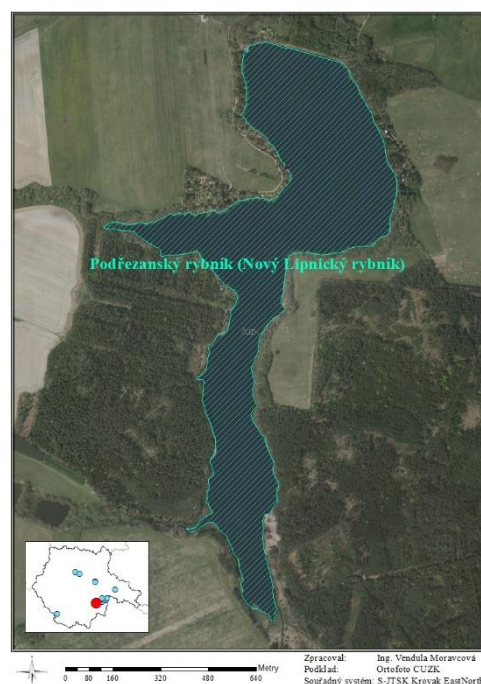
**Obrázek 4.53: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Nový Kanclíř**

Z výsledků shlukovací analýzy (Obrázek 4.53) pro lokalitu Nový Kanclíř je patrné, že kolonie *Pectinatella magnifica* vykazují v rámci lokality zvýšenou diverzitu, kdy se vzorky postupně shlukují do dvou skupin. V rámci lokality se značně odlišují čtyři vzorky a to: 128, 130, 198 a 202, které se shlukovaly do druhého menšího klastru i v rámci celkového obrazu populace mechovky na území České republiky. Z těchto vzorků vzorek č. 202 pochází ze stejného zásobního vzorku jako DNA používaná v předešlé pilotní studii a zbylé tři vzorky pocházející z téže lokality, které vykazují zvýšenou genetickou diverzitu pocházejí z různých dat odběru, nicméně všechny byly izolovány ve stáří 1 roku a méně. Vzhledem ke způsobu shlukování a masivní produkci statoblastů jednotlivými koloniemi se nabízí možnost, že kolonie odebraná a analyzovaná pod číslem 130 pochází přímo ze statoblastů vyprodukovaných právě kolonií odebranou pro potřeby diplomové práce.

#### 4.5.9 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Podřezanský

Rybník Podřezanský (Obrázek 4.54), někdy také nazývaný jako Nový Lipnický je vodní plocha v oblasti Třeboňska, nacházející se nedaleko města Třeboň. Plocha rybníka dosahuje 68 ha a nachází se v nadmořské výšce 457 m. n. m. Podřezanský rybník je primárně rybochovná nádrž ve správě rybářství Třeboň, avšak je využíván i jako rekreační plocha s chatovými oblastmi na jeho březích.

Lokalita Podřezanský byla pravidelně studovanou lokalitou, která byla reprezentována 21 vzorky 26, 27, 28, 29, 30, 167, 168, 169, 170, 203, 204, 205, 206,



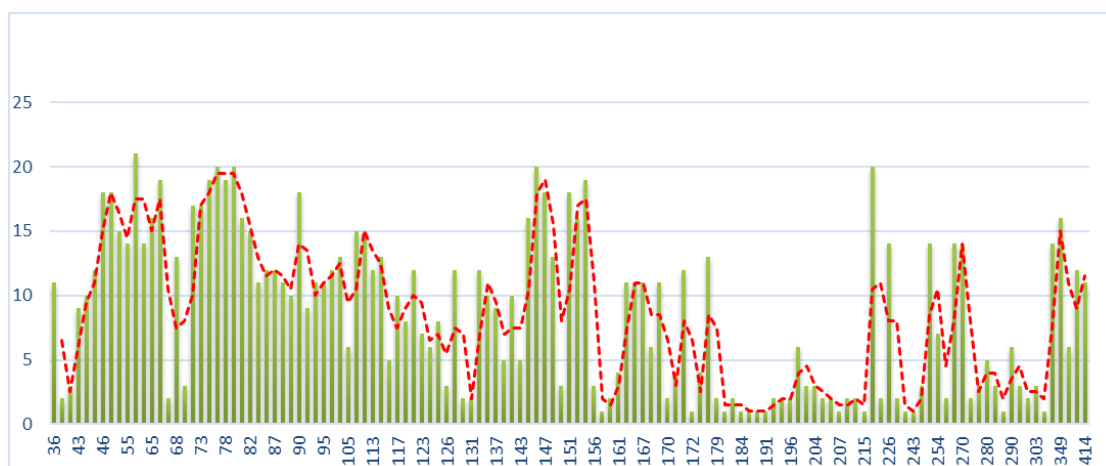
Obrázek 4.54: Mapa – rybník Podřezanský

207, 250, 251, 252, 253, 254, 255 a 270. Kolonie na této lokalitě vykazovaly střední až menší vzrůst, pravděpodobně vlivem kyselejšího pH vody, vlivem zvýšeného obsahu huminových kyselin pocházejících z nedalekého Červeného blata.



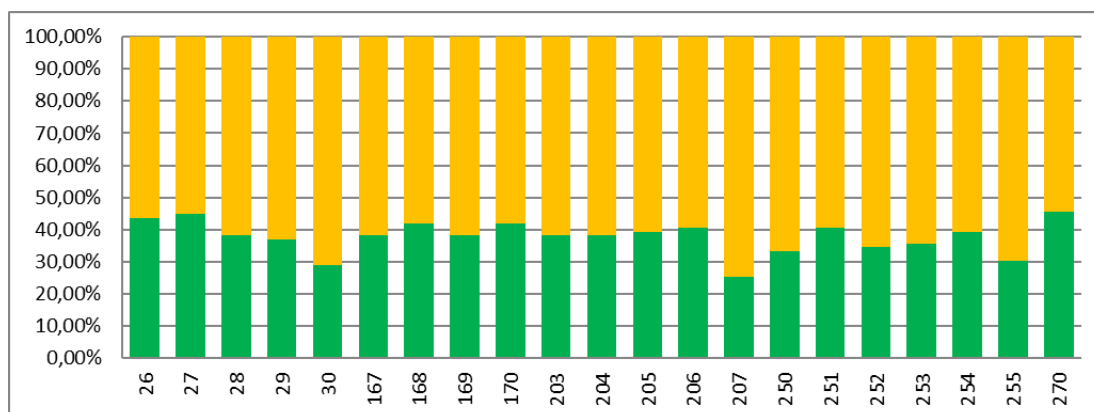
Obrázek 4.55: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Podřezanský

Obrázek 4.55 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Podřezanský, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo variabilních fragmentů 126.



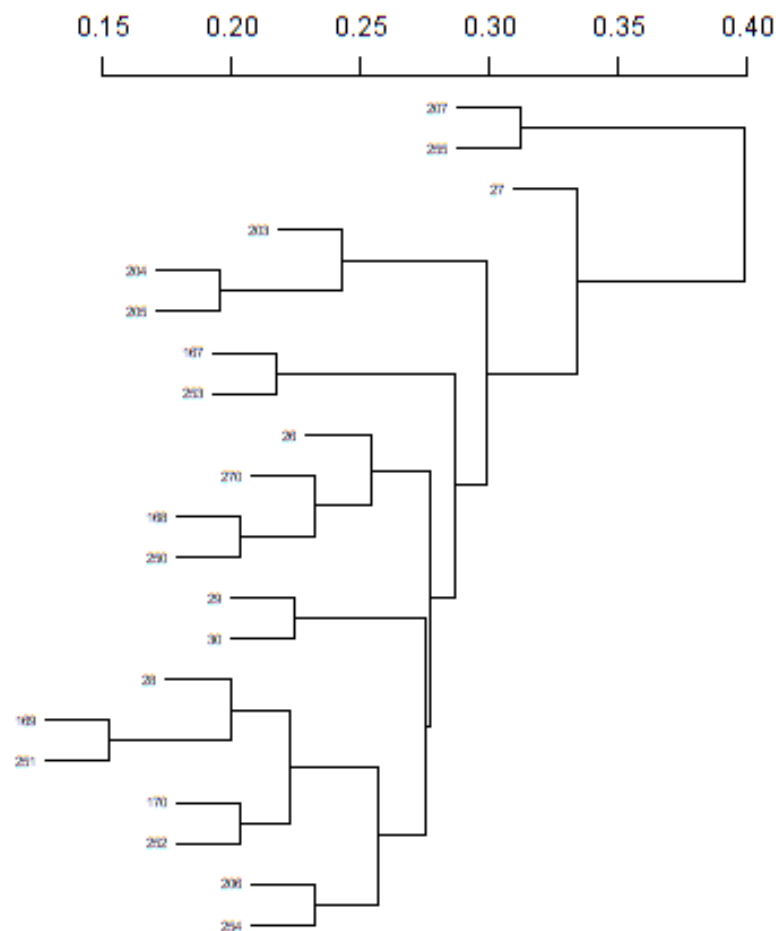
Obrázek 4.56: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Podřezanský

Na obrázku 4.56 je vyobrazena struktura amplifikovaných polymorfních fragmentů pro lokalitu Podřezanský. Dle grafu je patrné, že většina amplifikovaných fragmentů je v prvních dvou třetinách grafu, zatímco ve třetí třetině se nachází vzorky unikátní.



**Obrázek 4.57: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Podřezanský**

Z procentuálního zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Podřezanský (Obrázek 4.57) je patrné mírné kolísání. Nejnižší procentuální zastoupení počtu variabilních fragmentů odpovídá 25,00 % pro vzorek 207 a nejvyšší procentuální zastoupení variabilních fragmentů je 45,65 % pro vzorek 270. Nejvíce vzorků odebraných na lokalitě Podřezanský vykazovalo procentuální zastoupení polymorfních fragmentů v rozmezí 38,41 % - 42,03 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 17.



**Obrázek 4.58: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Podřezanský**

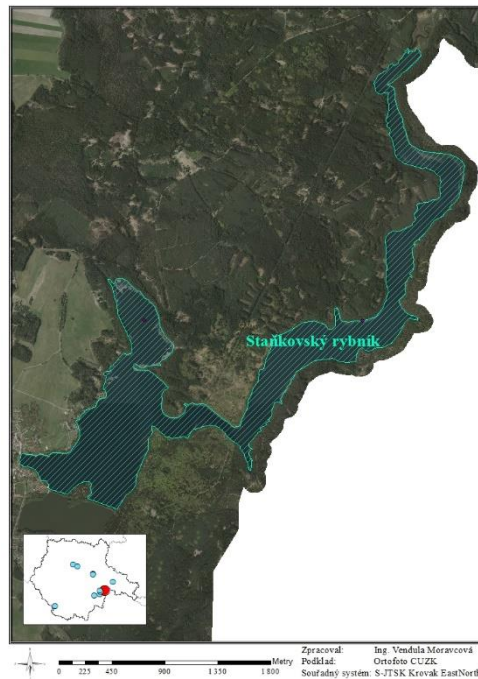
Výsledky shlukovací analýzy (Obrázek 4.58) pro lokalitu Podřezanský napovídají, že vzorky se v rámci lokality shlukují do dvou skupin, při čemž jejich vzájemná genetická diverzita je velmi malá. Zvýšenou genetickou diverzitou vykazují vzorky 207 a 255, mírná odlišnost se objevuje ještě u vzorku 27. Z těchto vzorků se v rámci širšího celku odlišují vzorky 207 a 255, které se shlukují v menším 2. klastru, zatímco ostatní vzorky se shlukují ve větším klastru kde se mísí se vzorky z ostatních stanovišť.

V případě vzorků odebíraných na lokalitě Podřezanský se u kolonií objevovaly odlišnosti ve struktuře gelovité matrix. V tomto případě byl gel kompaktní a tuhý, vytvářející specifickou strukturu, připomínající mozkovou tkáň. Nejedná se o jev vyskytující se výhradně na této lokalitě, avšak je zde poměrně hojný. Právě taková struktura byla nalezena i u obou vzorků vykazující zvýšenou genetickou diverzitu.

Ostatní vzorky odebrané na této lokalitě měly tužší gel, avšak nedosahovaly takové struktury jako právě tyto dva vzorky.

#### 4.5.10 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Staňkovský

Staňkovský rybník (Obrázek 4.59) je vodní nádrž nedaleko obce Chlum u Třeboně o nadmořské výšce 387 m. n. m. Plocha, kterou zabírá dosahuje 272 ha a je tak rybníkem s největším obvodem břehového pásma (25 km) v ČR. Rybník Staňkovský slouží jako rekreační plocha a plocha pro rybolov, pod správou rybářství Třeboň, avšak ve vyznačených lokalitách je rybolov zcela zakázán z důvodu průchodu státní hranice a výskytu cenných ryb a ryb s celoročním hájením.



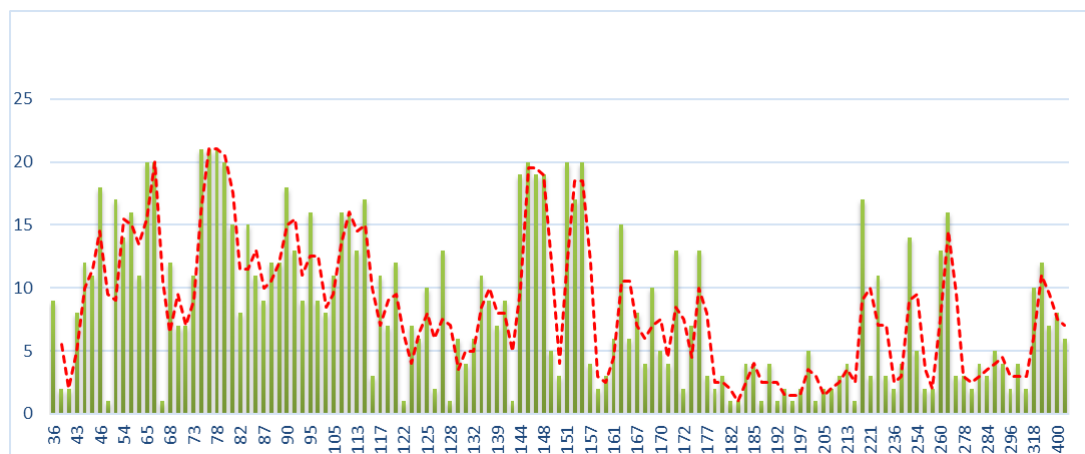
Obrázek 4.59: Mapa – rybník Staňkovský

Lokalita Staňkovský byla reprezentována 23 vzorky o průměrném stáří méně než jednoho roku až po stáří 7 let. Zastoupení jednotlivých věkových kategorií bylo u těchto vzorků rovnoměrně rozprostřené s výjimkou 2letých vzorků, kdy bylo na lokalitě kolonií *Pectinatella magnifica* méně. Rybník Staňkovský byl pravidelně pozorovanou lokalitou, kde docházelo k pravidelným odběrům druhu *Pectinatella magnifica*, a která byla z hlediska množství kolonií i vždy hojně obsazenou lokalitou. K hlavnímu rozvoji kolonií dochází na této lokalitě v první polovině léta, kdy s nástupem vysokých teplot dochází k velmi brzkému rozvoji sinic a vodního květu, který je značnou konkurencí pro mechovky, kterým odčerpává potřebný kyslík.



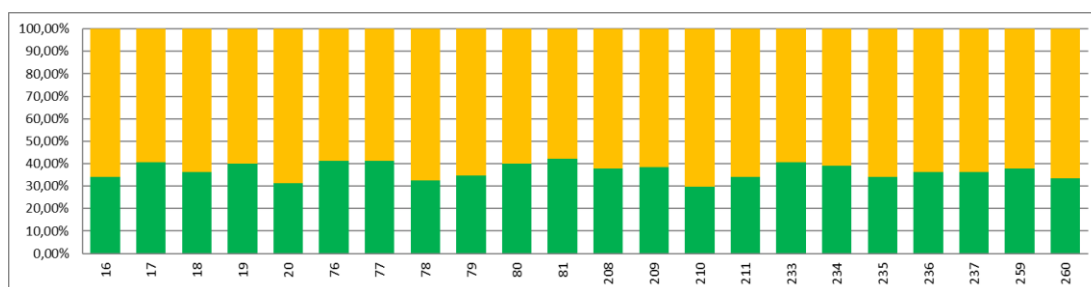
Obrázek 4.60: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Staňkovský

Obrázek 4.60 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Staňkovský, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo variabilních fragmentů 131. Kompletní DNA fingerprinting lokality Staňkovský byl sestaven pro vzorky 16, 17, 18, 19, 20, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 208, 209, 210, 211, 233, 234, 235, 236, 237, 259 a 260.



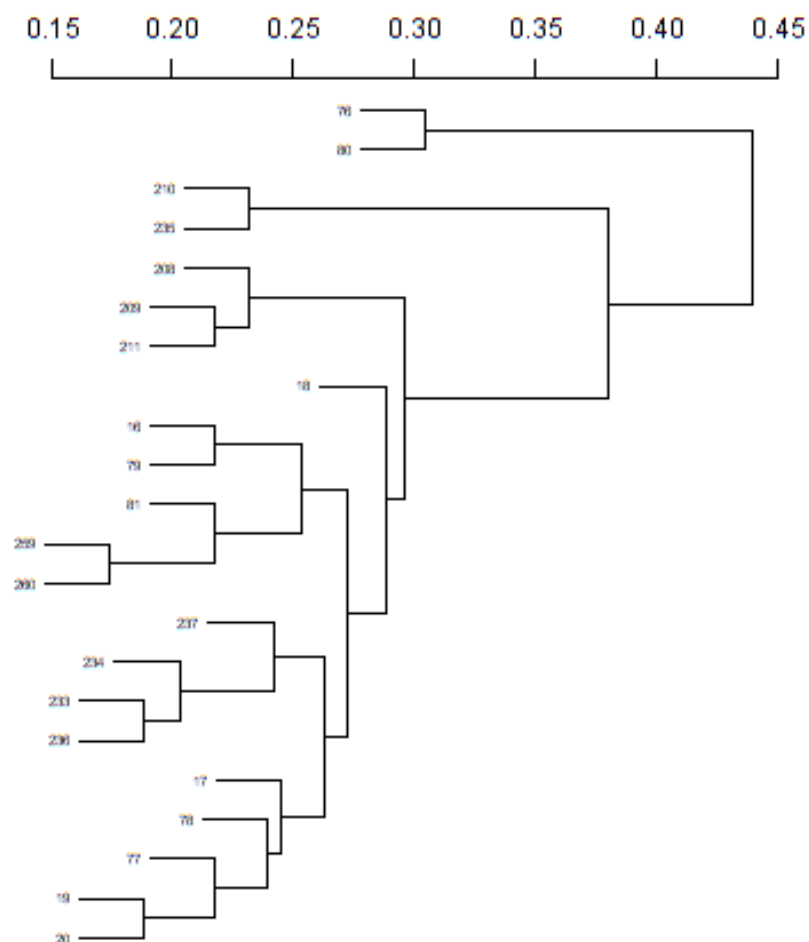
**Obrázek 4.61: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Staňkovský**

Na obrázku 4.61 je vyobrazena struktura polymorfních fragmentů amplifikovaných pro lokalitu Staňkovský. Na obrázku je parné výrazné množství fragmentů ze začátku grafu, kdy dochází k pozvolnému polesu a poté opětovnému nárůstu amplifikovaných fragmentů. Ve dvou třetinách grafu je výrazná plocha s jedinečnými polymorfními fragmenty.



**Obrázek 4.62: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Staňkovský**

Z procentuálního zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů u jednotlivých vzorků druhu *Pectinatella magnifica* na lokalitě Staňkovský (Obrázek 4.62) je zjevná drobná rozkolísanost. Nejnižší procentické zastoupení počtu variabilních fragmentů odpovídá dosahuje hodnoty 29,71 % pro vzorek 210, zatímco nejvyšší procentické hodnoty počtu variabilních fragmentů je 42,03 % pro vzorek 81. Zbytek vzorků analyzovaných v rámci lokality Staňkovský se pohybuje v rozmezí mezi 33,33 % a 40,58 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 18.



**Obrázek 4.63: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Staňkovský**

Z výsledků shlukovací analýzy pro lokalitu Staňkovský (Obrázek 4.63) je viditelné členění odebraných vzorků do skupin, které se v rámci lokality vzájemně liší. Z celkového množství vzorků, shlukujících se do jedné skupiny se vyčleňují čtyři vzorky, a to 76, 80, 210 a 235. Všechny tyto vzorky se shlukovaly v menším 2. klastru. Ostatní vzorky studované v rámci lokality Staňkovský se shlukovaly ve větším celku spolu se vzorky s ostatních lokalit.

Vzorky, vykazující odlišnost v rámci lokality Staňkovský, byly různého stáří odebírané spíše z počátku vegetační sezóny. Nástup léta a tím i častý rozvoj vodního květu, který je pro oblast Staňkova typický, způsobuje odčerpání kyslíku potřebného pro život kolonií *Pectinatella magnifica*. Z tohoto důvodu by se dalo usuzovat, že se vývoj kolonií orientuje spíše na období brzkého léta, kdy je sice voda chladnější avšak čistá, než muset svádět konkurenční boj s rozvíjejícími se sinicemi.

#### 4.5.11 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Vápenský

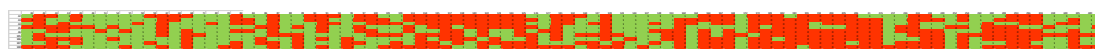
Rybník Vápenský (Obrázek 4.64) se nachází nedaleko obce Albrechtice nad Vltavou. Jedná se o velice malou nádrž o ploše menší než 1 ha a nadmořské výšce 428 m. n. m. Jedná se o malý venkovský rybník určený pro rekreaci, v jehož blízkosti se nachází vysoké množství rekreačních objektů.

Lokalita Vápenský byla reprezentována 9 vzorky odebraných při náhodném pohybu v dané lokalitě. Tento rybník nebyl odebírán cíleně a pravidelně, avšak během náhodných odběrů se ukázal jako vhodná lokalita pro sběr vzorků kolonií *Pectinatella*

*magnifica*. Pro potřeby analýz byly použity vzorky o stáří 1–5 let, kdy nejpočetnější zastoupení měly vzorky jednoleté.

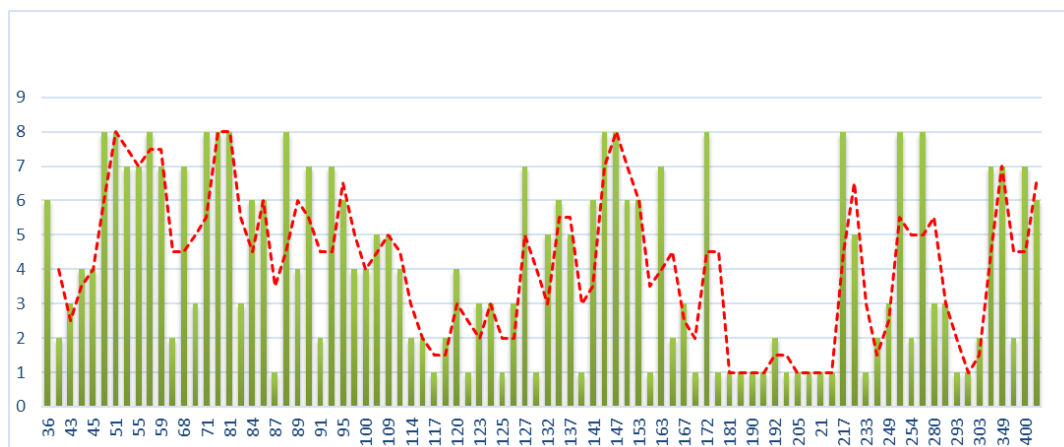


Obrázek 4.64: Mapa – rybník Vápenský



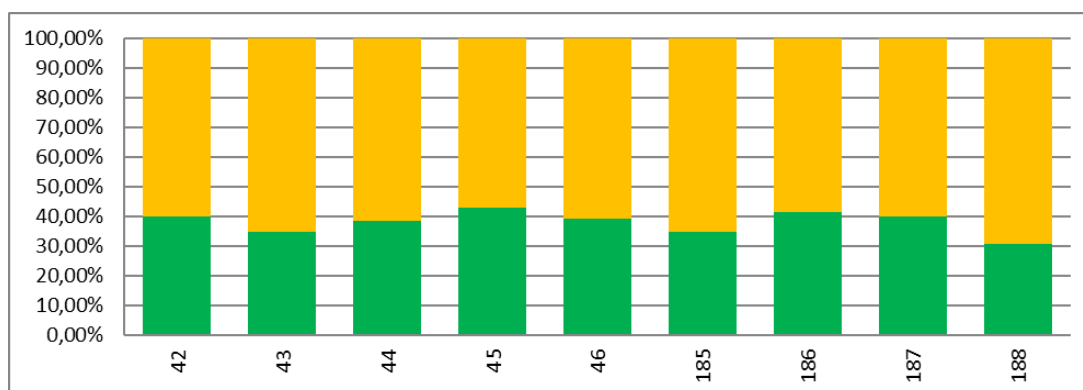
Obrázek 4.65: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Vápenský

Obrázek 4.65 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Vápenský, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo na této lokalitě variabilních fragmentů pouhých 88. Kompletní DNA fingerprinting lokality Vápenský byl sestaven pro vzorky 42, 43, 44, 45, 46, 185, 186, 187 a 188.



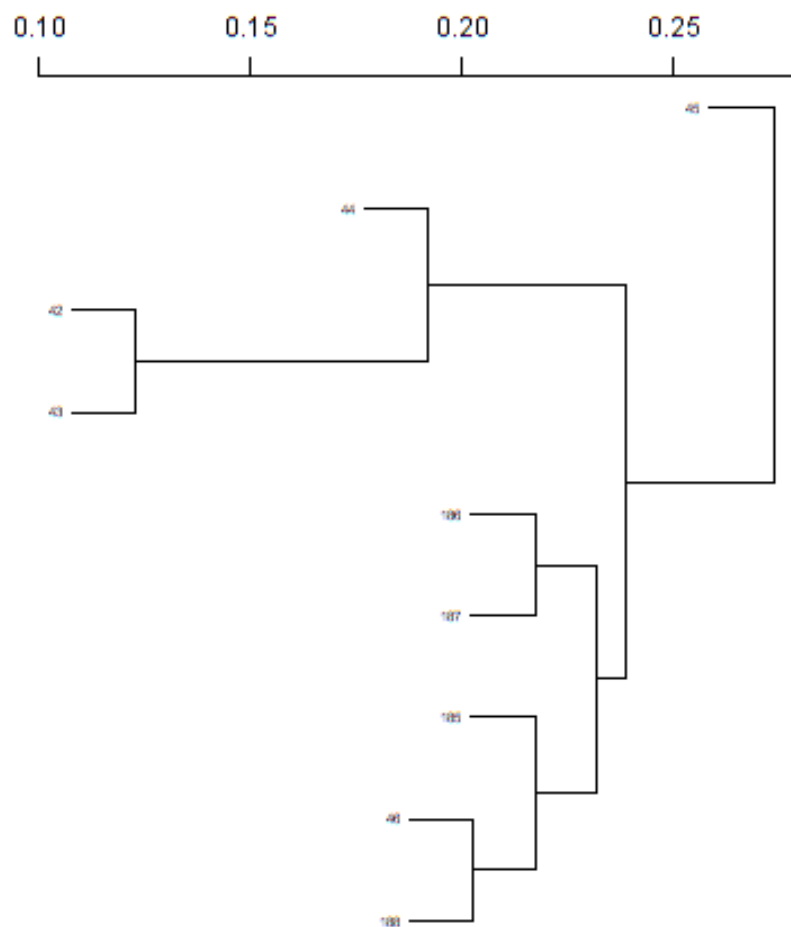
**Obrázek 4.66: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Vápenský**

Na obrázku 4.66 je vyobrazena struktura polymorfních fragmentů amplifikovaných pro lokalitu Vápenský. Na obrázku je patrné výrazné množství fragmentů ze začátku grafu, kdy dochází k pozvolnému poklesu a poté opětovnému nárůstu amplifikovaných fragmentů. Ve dvou třetinách grafu je výrazná plocha s jedinečnými polymorfními fragmenty.



**Obrázek 4.67: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Vápenský**

Graf procentického zastoupení počtu variabilních fragmentů na lokalitě Vápenský (Obrázek 4.67) vykazuje poměrně vyrovnané zastoupení počtu polymorfních fragmentů amplifikovaných u jednotlivých vzorků. Nejnižší procentuální zastoupení polymorfních fragmentů vykazuje vzorek 188, kdy u něj bylo amplifikováno pouze 30,43 % variabilních fragmentů. Oproti tomu nejvyšší podíl amplifikovaných variabilních fragmentů byl dosažen u vzorku 45, kdy celková hodnota procentického zastoupení variabilních fragmentů dosáhla 42,75 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 19.



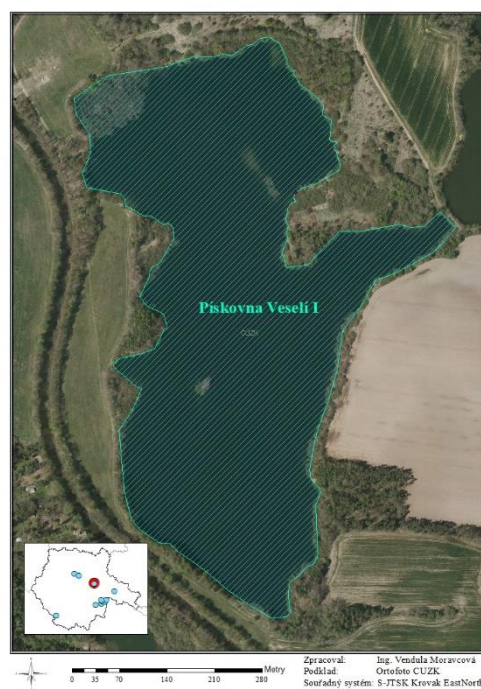
**Obrázek 4.68: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Vápenský**

Výsledky shlukovací analýzy pro lokalitu Vápenský, vyobrazené na obrázku 4.68, ukazují stupňovité shlukování vzorků v rámci dané lokality. Nejvyšší odlišnost ze studovaných vzorků vykazuje vzorek 45, avšak jde jen o odlišnost v rámci studované lokality. Ze vzorků odebraných na lokalitě Vápenský nedošlo ke shlukování s druhým menším klastrem ani v jednom případě. Dalo by se tak usuzovat, že jde o odlišnosti pouze mezi místními vzorky, případně, že se jedná o vzorek kolonie zavlečené z jiné lokality, která se odlišuje od kolonií osidlujících lokalitu Vápenský, v celkovém obrazu populace mechovky v rámci České republiky se však neprojevuje.

#### 4.5.12 Výsledky fragmentační analýzy – pískovna Veselí I

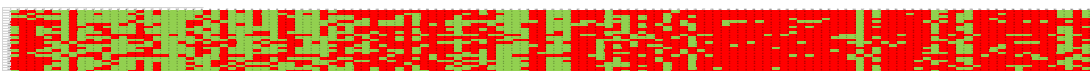
Lokalita Veselí I (Obrázek 4.69) je plocha bývalé pískovny nedaleko města Veselí nad Lužnicí. Tato vodní nádrž, která je součástí komplexu takzvaných Veselských pískoven, dosahuje plochy necelých 25 ha a nachází se v nadmořské výšce 408 m. n. m. V současné době je v celém areálu těžba ukončena a pískovny slouží jako plochy vhodné pro rekreaci a rybolov.

Lokalita Veselí I byla reprezentována 24 vzorky o stáří od méně než jednoho roku až po stáří 7 let, kdy mezi těmito vzorky byly zastoupeny všechny věkové kategorie. Lokalita pískovny Veselí I byla pravidelně



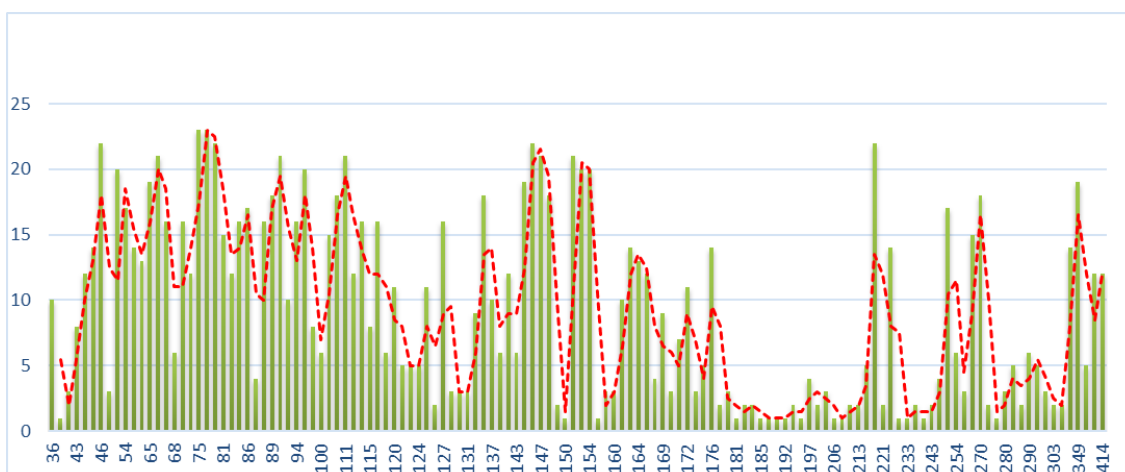
Obrázek 4.69: Mapa – pískovna Veselí I.

sledována a odebírána v dlouhodobém časovém horizontu, kdy se její podmínky ukázaly jako optimální pro dlouhodobý růst a rozvoj kolonií *Pectinatella magnifica*. Kolonie na této lokalitě nedorůstají značných rozměrů, avšak svou četností převyšují ostatní lokality. V posledních letech jsou i zde počty kolonií *Pectinatella magnifica* mírně na ústupu, což může být zapříčiněno poklesem vodní hladiny v období vrcholného léta, kdy velká část pobřežních porostů vrb má větve nad vodní hladinou, a tudíž je omezený prostor pro uchycení vyvíjejících se kolonií. Přesto však je oblast Veselí I lokalitou bohatě obsazenou, a i z tohoto důvodu vhodnou pro pozorování stavu druhu *Pectinatella magnifica*.



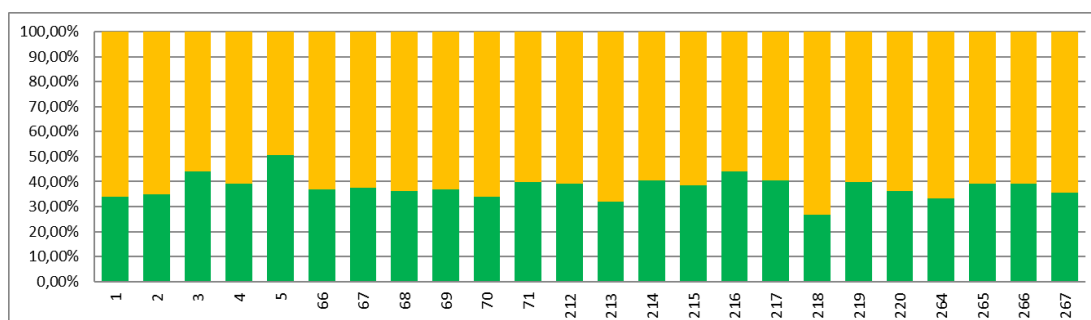
Obrázek 4.70: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – pískovna Veselí I

Obrázek 4.70 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Veselí I, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo na této lokalitě variabilních fragmentů pouhých 130. Kompletní DNA fingerprinting lokality Veselí I byl sestaven pro vzorky 1, 2, 3, 4, 5, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 264, 265, 266 a 267.



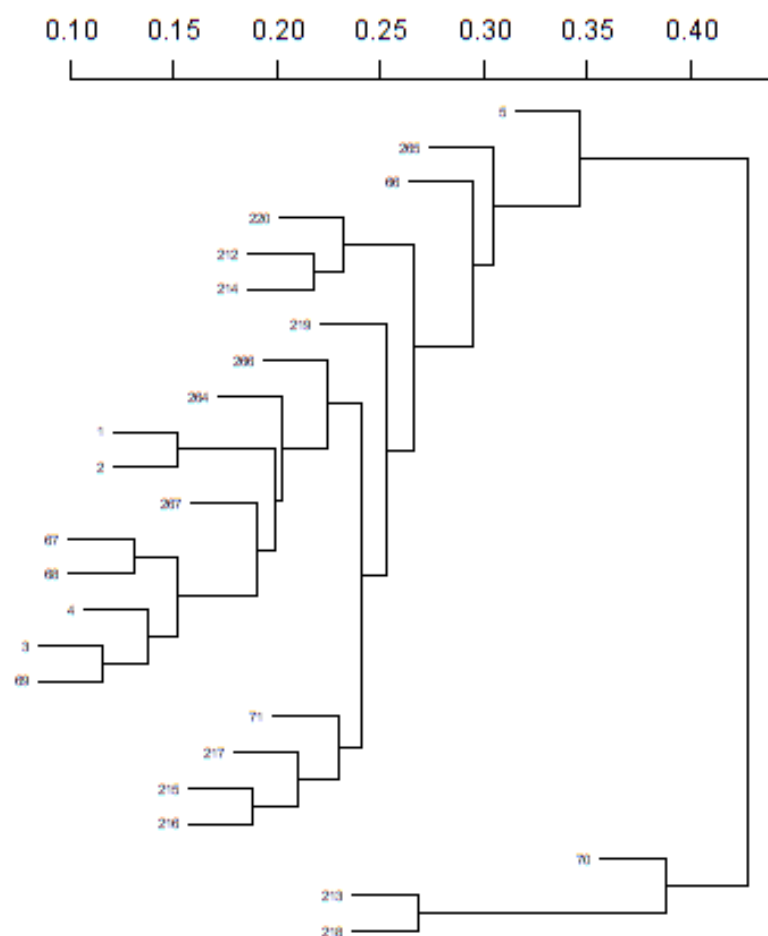
**Obrázek 4.71: Rozložení polymorfních fragmentů – pískovna Veselí I**

Na obrázku 4.71 je znázorněna struktura amplifikovaných fragmentů, kdy v první třetině grafu jsou zastoupeny fragmenty, které jsou amplifikovány téměř u všech vzorků. U dalších dvou třetin vzorků dochází ke střídání vzorků s četným zastoupením a vzorky s unikátními fragmenty.



**Obrázek 4.72: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – pískovna Veselí I**

Graf procentického zastoupení počtu variabilních fragmentů na lokalitě Veselí I (Obrázek 4.72) vykazuje kolísavé zastoupení počtu polymorfních fragmentů amplifikovaných u jednotlivých vzorků. Nejnížší procentuální zastoupení polymorfních fragmentů vykazuje vzorek 188, kdy u něj bylo amplifikováno pouze 30,43 % variabilních fragmentů. Oproti tomu nejvyšší podíl amplifikovaných variabilních fragmentů byl dosažen u vzorku 45, kdy celková hodnota procentického zastoupení variabilních fragmentů dosáhla 42,75 %. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 20.



**Obrázek 4.73: Výsledky shlukovací analýzy – pískovna Veselí I**

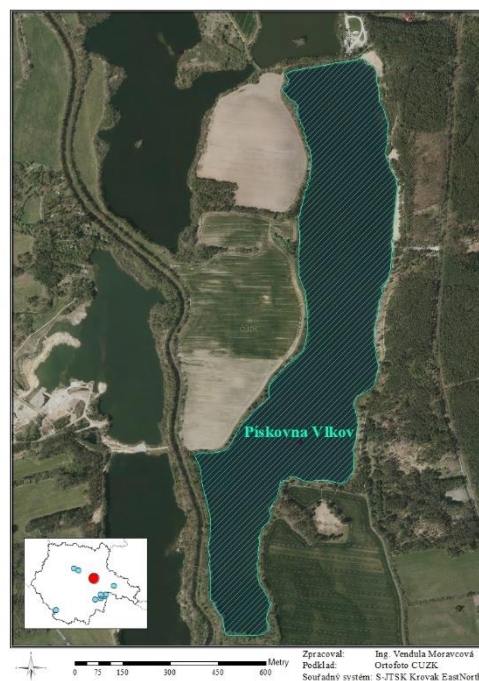
Z výsledků shlukovací analýzy pro lokalitu Veselí I (Obrázek 4.73) je patrné, že většina vzorků se v rámci lokality stupňovitě shlukuje do jednoho celku, kdy z většího celku 20 vzorků se vyčlenily 3, které vykazují mírnou odlišnost pro tuto lokalitu. Tyto vzorky jsou 70, 213 a 218. Z těchto vzorků se do menšího druhého klastru shlukují všechny tři, přičemž vzorek 70 pochází ze stejné zásobní mikrozkušavky jako vzorek použitý pro analýzy v rámci diplomové práce. Zbylé dva vzorky, pocházejí z odlišných odběrů v odlišných letech, vykazují zvýšenou genetickou diverzitu v rámci lokality i celkového obrazu. Vzorek 231 byl izolován jako 3letý, vzorek 218 byl naopak izolován krátce po odběru na lokalitě. Nicméně oba vzorky pocházejí z prvního odběru v rámci vegetační sezóny, kdy docházelo k nárůstu mladých kolonií a produkci prvních statoblastů použitelných pro izolace DNA.

#### 4.5.13 Výsledky fragmentační analýzy – pískovna Vlkov

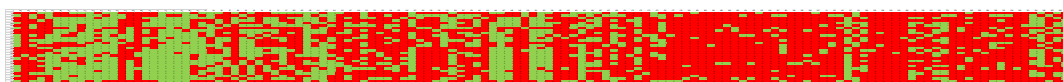
Pískovna Vlkov (Obrázek 4.74) je rovněž součástí Veselských pískoven, které leží nedaleko Veselí nad Lužnicí. Vlkov dosahuje velikosti 46,5 ha a patří k nejrozsáhlejším pískovnám. V současné době je využívána jako rekreační oblast vhodná ke koupání díky čisté vodě a písčitým plážím umožňujícím pohodlný přístup k vodě. Současně je oblíbenou destinací často navštěvovanou rybáři.

Lokalita Vlkov byla reprezentována 29 vzorky o stáří méně než jednoho roku až po vzorky 6 let staré s pravidelným zastoupením jednotlivých věkových kategorií.

Na lokalitě Vlkov docházelo k pravidelným odběrům v rámci dlouhodobého pozorování stavu a rozšíření kolonií *Pectinatella magnifica*. Místní kolonie dosahují průměrné velikosti, avšak v posledních 3 letech se jejich množství značně snížilo, pravděpodobně vinou poklesu vodní hladiny v letních obdobích a tím i snížení množství potenciálního substrátu pro uchycení vyvíjejících se kolonií.

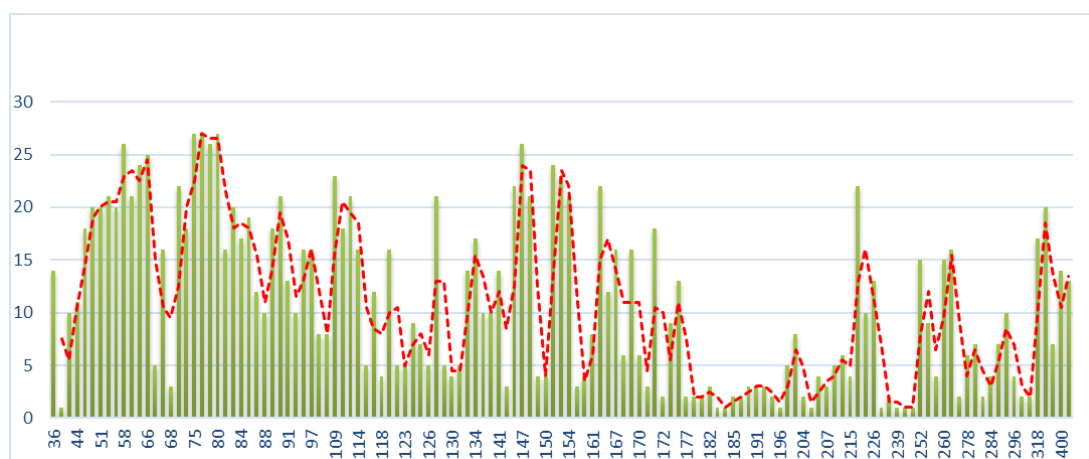


Obrázek 4.74: Mapa – pískovna Vlkov



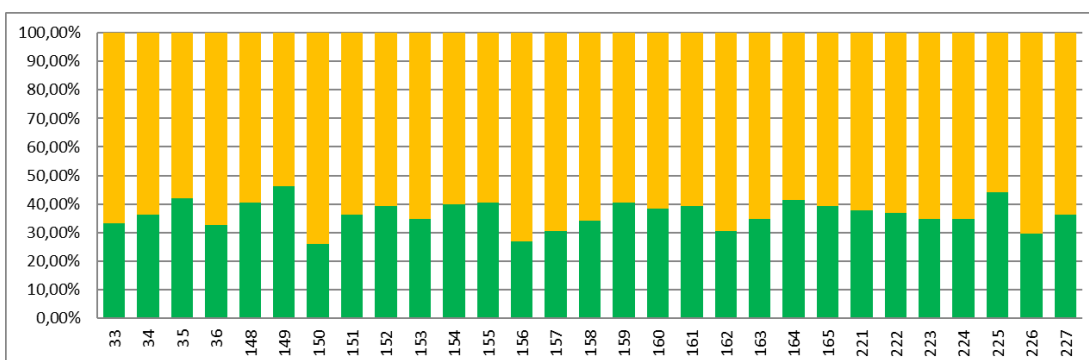
Obrázek 4.75: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – pískovna Vlkov

Obrázek 4.75 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Vlkov, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo na této lokalitě variabilních fragmentů 131. Kompletní DNA fingerprinting lokality Vlkov byl sestaven pro vzorky 33, 34, 35, 36, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 221, 222, 223, 224, 225, 226 a 227.



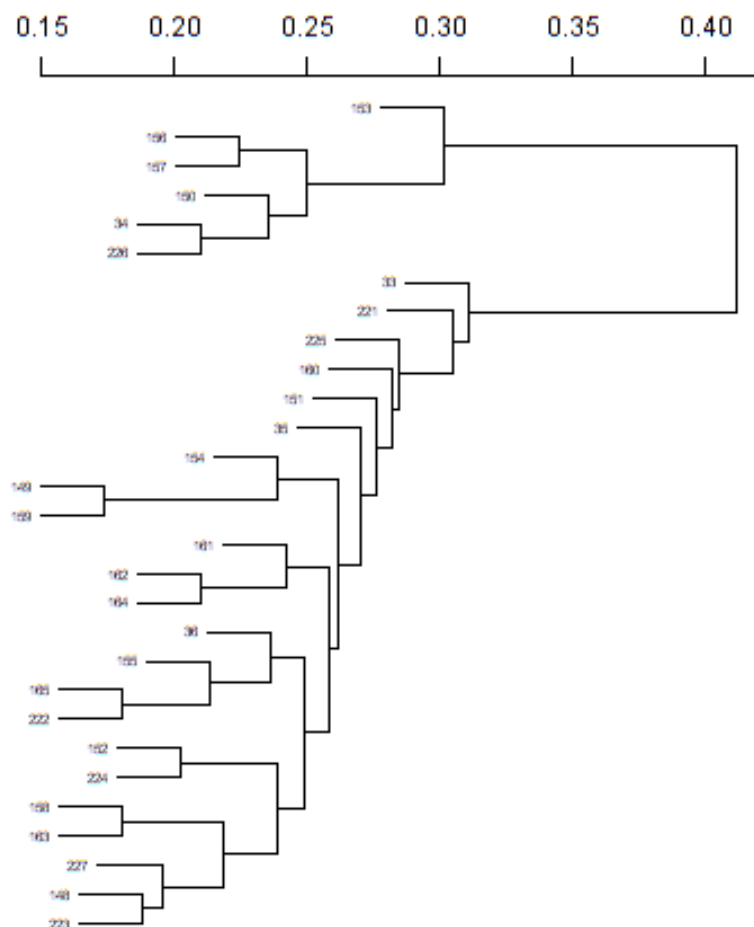
**Obrázek 4.76: Rozložení polymorfních fragmentů – pískovna Vlkov**

Obrázek 4.76 znázorňuje rozložení polymorfních fragmentů s vysokým zastoupením u většiny vzorků. Tyto fragmenty se nacházejí spíše v prvních dvou třetinách fingerprintingu. Ve třetí třetině jsou více zastoupené oblasti s unikátními fragmenty, které mohou ovlivňovat celkový stav genetické diverzity.



**Obrázek 4.77: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – pískovna Vlkov**

Z výsledků procentuálního zastoupení amplifikovaných fragmentů u jednotlivých vzorků odebraných na lokalitě Vlkov (Obrázek 4.77) je patrná rozkolísanost, která se pohybuje mezi 26,09 % u vzorku 150 až po 46,38 % pro vzorek 149. Hodnoty v tomto rozmezí jsou zastoupeny plynule mezi všemy vzorky. Nejčtenější zastoupení vzorků je v rozmezí mezi 36,23 % - 40,58 % amplifikovaných fragmentů. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 21.



**Obrázek 4.78: Výsledky shlukovací analýzy – písčovina Vlkov**

Z výsledků shlukovací analýzy pro lokalitu Vlkov (Obrázek 4.78) je patrné rozdělení vzorků, reprezentujících tuto lokalitu, do dvou výrazných skupin. Většina vzorků se shlukuje v rámci lokality do jedné velké skupiny, zatímco 6 z analyzovaných vzorků vytváří vlastní malou skupinu. Konkrétně se jedná o vzorky 34, 150, 153, 156, 157 a 226. Všechny tyto vzorky, vykazující zvýšenou genetickou diverzitu v rámci lokality Vlkov, tuto odlišnost vykazují i v rámci celkového obrazu, kde se všechny shlukují do menšího 2. klastru. Dá se tedy usuzovat, že se jedná o vzorky se zvýšenou genetickou diverzitou nejen v rámci lokality, ale i celkového genetického obrazu druhu *Pectinatella magnifica*. Tyto vzorky pocházejí z různých odběrů v rámci časového horizontu i v rámci odběrových míst. Vzorky 150, 153, 156 a 157 byly odebrány v rámci jednoho šetření, avšak na různých místech lokality Vlkov. Vzorky 34 a 226, byly odebrány v rámci jiných terénních

šetření. Společným jmenovatelem odběrů byl sběr vzorků v první polovině letní sezony.

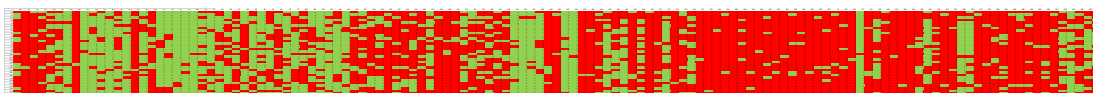
#### 4.5.14 Výsledky fragmentační analýzy – Vltava - Lužnice

Řeka Vltava (Obrázek 4.79) je nejdelší řekou České republiky a nejvýraznější řekou v rámci Jihočeského kraje. Vzorky reprezentující Vltavu byly odebrány na březích řeky v oblastech sportovní kanál v Českých Budějovicích, Hluboká nad Vltavou, Bechyně, Nuzice, Dobronice a Neznášov.

Lokalita Vltava – Lužnice byla reprezentována 32 vzorky o stáří méně než jednoho roku až po vzorky 5 let staré s převahou jednoletých vzorků. Lokalita Vltava – Lužnice nebyla odebírána pravidelně, ale je složena ze vzorků náhodně odebraných na více lokalitách. Vzorky reprezentující Vltavu byly odebrány na březích řeky v oblastech sportovní kanál v Českých Budějovicích, Hluboká nad Vltavou, Bechyně, Nuzice Červený mlýn, Dobronice u Bechyně a Neznášov.

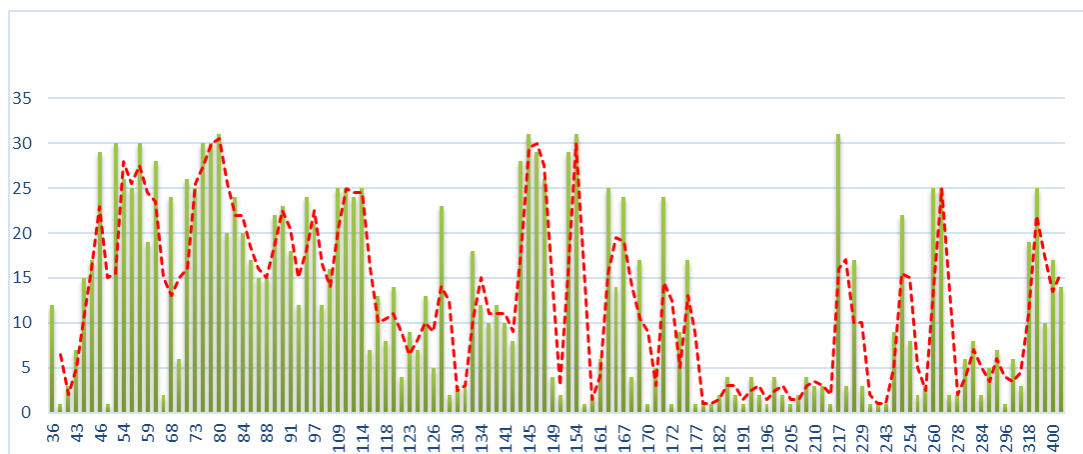


Obrázek 4.79: Mapa – Vltava – Lužnice



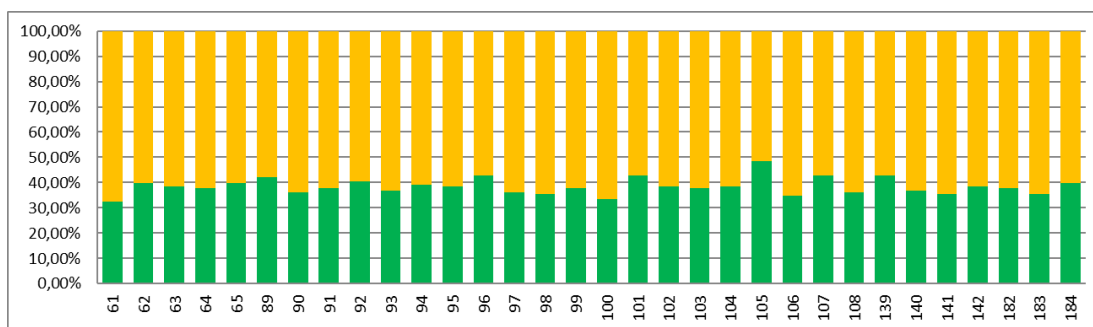
Obrázek 4.80: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – Vltava–Lužnice

Obrázek 4.80 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Vltava - Lužnice, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo na této lokalitě variabilních fragmentů 129. Kompletní DNA fingerprinting lokality Vltava byl sestaven pro vzorky 61, 62, 63, 64, 65, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 139, 140, 141, 142, 182, 183 a 184.



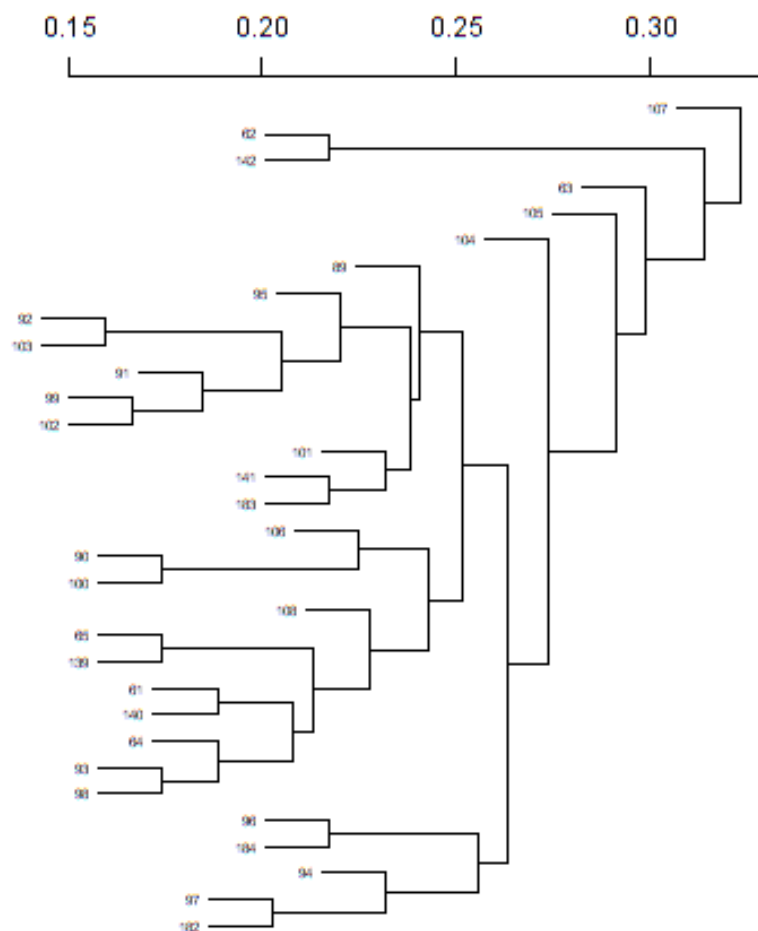
**Obrázek 4.81: Rozložení polymorfních fragmentů – Vltava-Lužnice**

Na obrázku 4.81 je patrné rozložení genetické struktury DNA fingerprintingu pro oblast Vltava - Lužnice, kdy v první třetině jsou hojně zastoupené polymorfní fragmenty amplifikované u většiny vzorků. Mezi první a druhou třetinou byly amplifikovány fragmenty, které se vyskytovaly jen u části studovaných vzorků. Nejvýraznější pokles v počtu amplifikovaných fragmentů je patrný na začátku třetí třetiny grafu, kde se začaly vyskytovat unikátní fragmenty.



**Obrázek 4.82: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – Vltava-Lužnice**

Z výsledků procentuálního zastoupení amplifikovaných fragmentů u jednotlivých vzorků odebraných na lokalitě Vltava-Lužnice (Obrázek 4.82) je patrné mírné kolísání, mezi hodnotou 32,61 % u vzorku 61 až po 48,55 % pro vzorek 105. Hodnoty v tomto rozmezí jsou zastoupeny plynule mezi všemi vzorky. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 22.



**Obrázek 4.83: Výsledky shlukovací analýzy – Vltava–Lužnice**

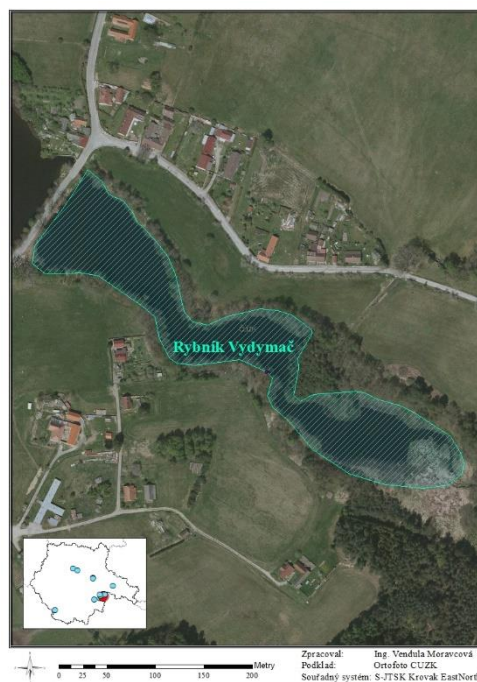
Z výsledků shlukovací analýzy pro lokalitu Vltava – Lužnice (Obrázek 4.83) je patrné stupňovité shlukování jednotlivých vzorků, což vypovídá o poměrně nízké genetické diverzitě v rámci lokality. Ze studovaných vzorků se mírně vyčleňují vzorky 62, 63, 104, 105, 107 a 142, avšak jejich vyčlenění v rámci lokality je velice nepatrné a v rámci celkového fingerprintingu k jejich vyčlenění nedochází vůbec, kdy se všechny shlukují v rámci jednoho velkého celku v 1. klastru. Pravděpodobnou příčinou zvýšené diverzity v rámci lokality avšak velice nízké v rámci celkového obrazu může být přítomnost kolonií různého původu. Vodní toky Vltava a Lužnice jsou hlavní spojnici mezi vodními nádržemi, na kterých *Pectinatella magnifica* přežívá a mohou tak obsahovat zástupce kolonií pocházejících z různých lokalit.

#### 4.5.15 Výsledky fragmentační analýzy – rybník Vydymač

Rybník Vydymač (Obrázek 4.84) je malá vodní nádrž přiléhající svou hrází k rybníku Hejtman v oblasti obce Chlum u Třeboně. Plocha této vodní nádrže dosahuje necelé 3 ha, avšak v současné době ztrácí velké množství plochy oproti svému původnímu objemu. Rybník Vydymač nemá žádné výrazné využití a pozvolna se zanáší bahnem a zarůstá pobřežním porostem.

Lokalita Vydymač byla reprezentována 15 vzorky o stáří od méně než jeden rok až po vzorky o stáří 6 let. Na rozdíl od nádrže Hejtman, Vydymač nebyl pravidelně pozorován a odebírán z důvodu jeho značného zabahnění, a tudíž téměř nemožného přístupu.

Vzorky odebírané na této lokalitě byly sebrány ze strany hráze, která ač disponuje příkrým sklonem, je nejdostupnější částí rybníka. Vydymač na rozdíl od Hejtmanu je nádrží velice bohatě obsazenou velkými koloniemi *Pectinatella magnifica*. Rozdíl mezi těmito vodními nádržemi může být způsoben vyšším množstvím zelených rostlin v rybníku Vydymač a tím i lepší kvalitou vody, která následně odtéká do Hejtmanu, který je ovlivněn turistickým ruchem, zejména látkami obsaženými v kosmetických přípravcích.

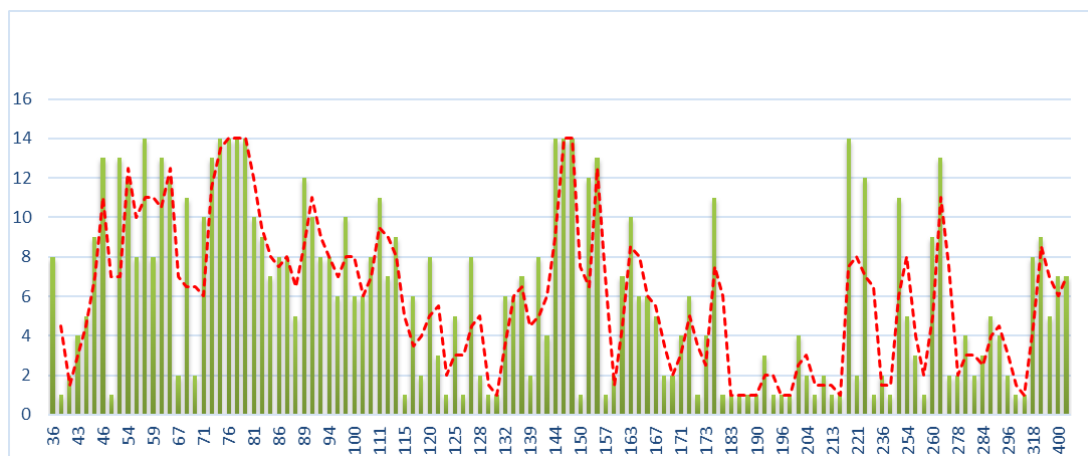


Obrázek 4.84: Mapa – rybník Vydymač



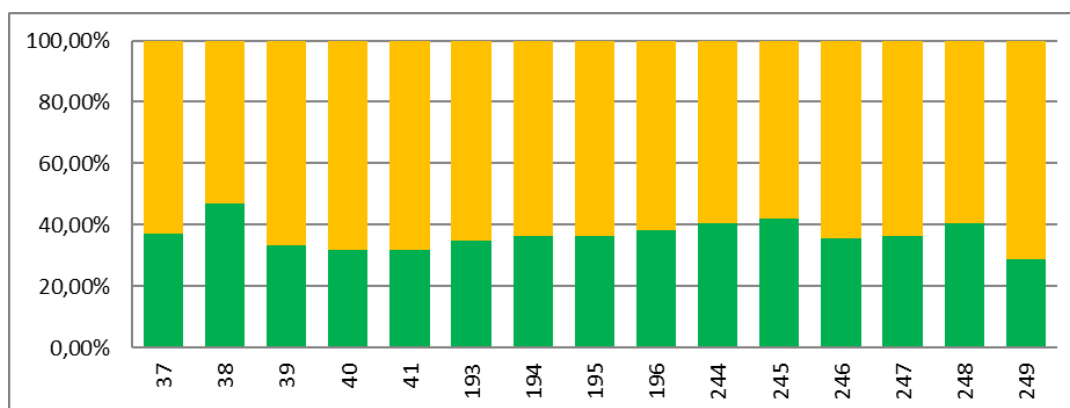
Obrázek 4.85: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – Vydymač

Obrázek 4.85 zobrazuje kompletní DNA fingerprinting pro lokalitu Vydymač, kdy z celkového množství 139 variabilních fragmentů amplifikovaných pro všechny studované vzorky, bylo na této lokalitě variabilních fragmentů 122. Kompletní DNA fingerprinting lokality Vydymač byl sestaven pro vzorky 37, 38, 39, 40, 41, 193, 194, 195, 196, 244, 245, 246, 247, 248 a 249.



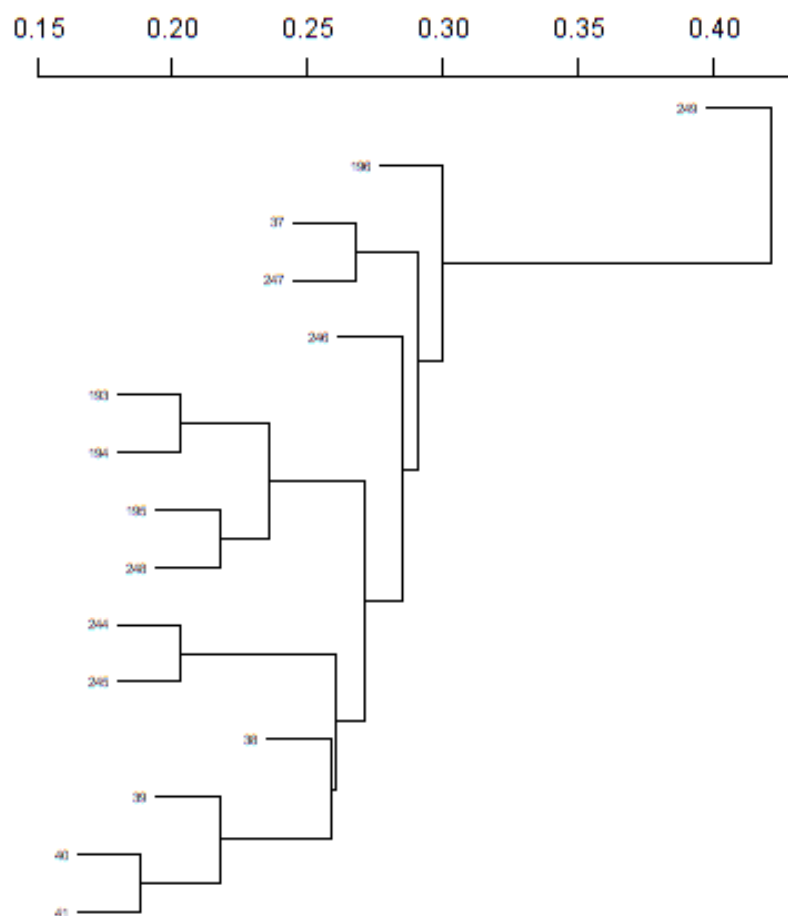
**Obrázek 4.86: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Vydymač**

Na obrázku 4.86 je znázorněno rozložení amplifikovaných polymorfních fragmentů, kdy dochází k pravidelnému střídání oblastí s četným zastoupením polymorfních fragmentů u většiny testovaných vzorků s oblastmi s jedinečnými polymorfními fragmenty.



**Obrázek 4.87: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Vydymač**

Výsledků procentuálního zastoupení amplifikovaných fragmentů u jednotlivých vzorků odebraných na lokalitě Vydymač (Obrázek 4.87) jsou poměrně vyrovnané. Nejnižší procentuální zastoupení amplifikovaných polymorfních fragmentů dosahuje 28,99 % pro vzorek 249, zatímco nejvyšší dosažená hodnota amplifikovaných variabilních fragmentů doáhla úrovně 47,10 % u vzorku 38. Většina studovaných vzorků dosahuje hodnot mezi 33,033 % - 36,23 % polymorfních fragmentů. Podrobné výsledky jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy jako Příloha 23.



**Obrázek 4.88: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Vydymač**

Z výsledků shlukovací analýzy (Obrázek 4.88) vyplývá, že vzorky na lokalitě Vydymač si jsou velice podobné a jejich diverzita je tudíž nízká. Jako jediný ze shluku většiny vzorků vyčnívá jeden vzorek, a to vzorek 249, který se současně vyčleňuje i v rámci širšího celku všech lokalit. V celkové analýze všech vzorků se tento vzorek shlukuje v menším 2. klastru, zatímco zbytek vzorků spadá do prvního velkého klastru. Odlišnost tohoto vzorku spočívá především ve struktuře gelovité matrix, která byla pevnější na rozdíl od ostatních kolonií narostlých v dané lokalitě.

---

#### 4.5.16 Výsledky fragmentační analýzy pro ostatní vzorky

Kromě vzorků, které byly zpracovány jako samostatné lokality, byly v celkové analýze zahrnuty ještě vzorky, u nichž nebylo dostatečné množství opakování. Jedná se o vzorky Komárov (134, 135, 136, 137 a 138), Kačležský (143, 144, 145, 146 a 147), USA (31) a Finsko (115).

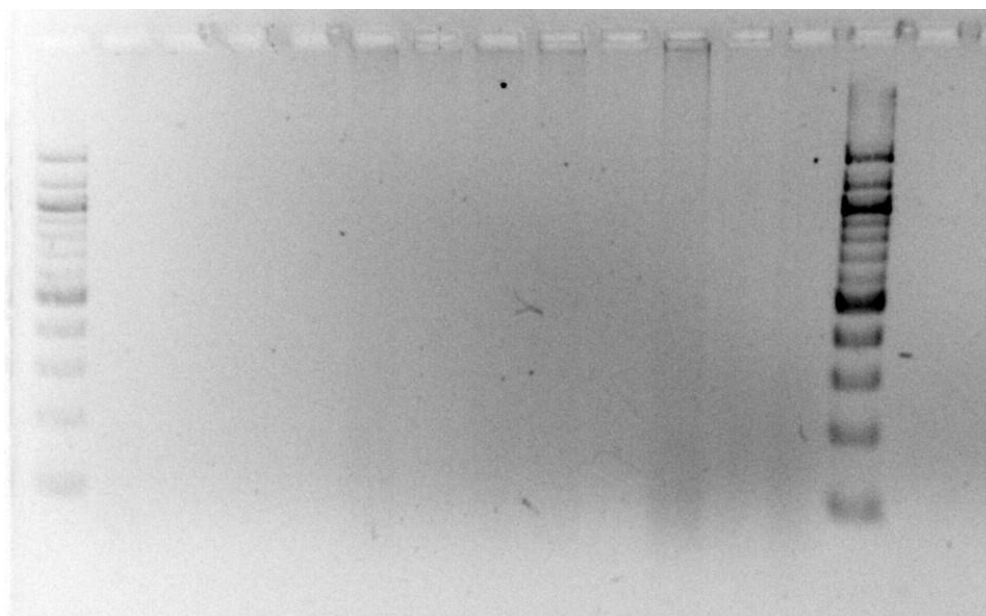
Tyto vzorky se téměř všechny shlukovaly v rámci 1. velkého klastru, kdy je třeba zmínit především vzorek 31 (USA). Pro tento vzorek byl použit a nově vyizolován materiál v podobě lyofilizovaných statoblastů ze zásobního vzorku, který byl již použit pro potřeby diplomové práce. V této pilotní studii, jejímž pokračováním disertační práce je včetně využití materiálu ze stejných zásobních vzorků, se vzorek z USA rovněž shlukoval do jednoho velkého celku. Z porovnání výsledků obou prací vyplývá, že výsledky shlukování vzorků použitých pro obě studie vzájemně korespondují.

Jako jediný vzorek, který se ze skupiny nezařazených vzorků shlukoval v rámci druhého menšího klastru, je vzorek 115, který byl odebraný v oblasti Saimaa ve Finsku. Ačkoliv během letní sezony oblast jižního Finska dosahuje letních teplot, jezero Saimaa se pro svou hloubku jen velmi obtížně prohřívá. Přes tuto skutečnost kolonie *Pectinatella magnifica* plochu jezera Saimaa obsadily a velmi dobře v ní prosperují.

---

#### 4.6 Výsledky analýzy ISSR

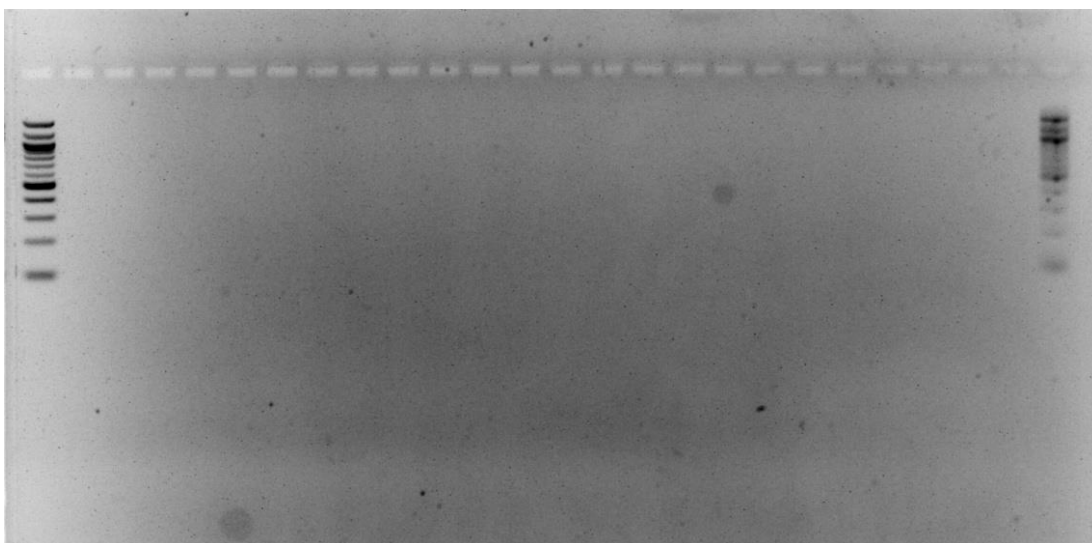
Jako druhá technika analýzy genetické diverzity druhu *Pectinatella magnifica* byla zvolena technika ISSR, která měla rozšířit znalosti získané o tomto druhu, díky citlivější rozlišovací schopnosti nezávisle na živočišném či rostlinném původu vzorku bez předchozí znalosti jeho kompletního genomu, na čemž se shoduje i Labastida et al. (2015). Pro experiment byly zvoleny tři primerové kombinace, ověřené i na jiných rostlinných i živočišných druzích, na kterých dávaly kvalitní a velmi dobře vypovídající výsledky. Avšak s druhem *Pectinatella magnifica* ani přes několikanásobné opakování pokusu nebyly schopné podat uspokojivé výsledky. Předpokladem bylo, že nedochází k nasednutí primerů na vlákno DNA, vlivem odlišné teploty annealingu během reakce PCR. Z tohoto důvodu bylo přikročeno k pokusu s vytvořením teplotního gradientu pro každý typ primeru s opakováním u několika vzorků, kdy každá skupina vzorků měla odlišnou teplotu annealingu. Avšak ani tato varianta nepodala požadovaný výsledek. Pravděpodobným důvodem neúspěšného výsledku je odlišná skladba nukleotidů obsažených ve vláknu DNA druhu *Pectinatella magnifica*. Jako možné východisko se nabízí možnost vyzkoušení jiné primerové kombinace, avšak vzhledem ke skutečnosti, že genom druhu *Pectinatella magnifica* nebyl dosud zcela osekvenován, jednalo by se o náhodné testování jednotlivých primerových kombinací, což by bylo časově i finančně příliš náročné, vzhledem k velikému množství možných dostupných primerů pro oblasti mikrosatelitní DNA.



Obrázek 4.89: Gelová elektroforéza pro ISSR UBC 825

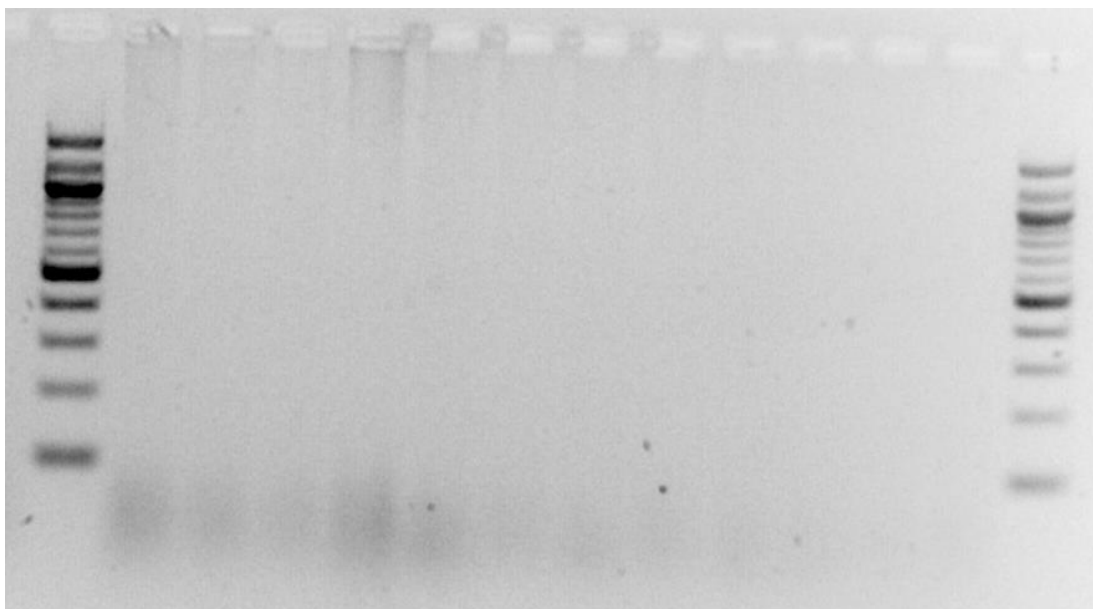
---

Na obrázku 4.89 je ukázán jeden z neúspěšných výsledků reakce ISSR pro primer UBC 825, kdy na snímku elektroforézy není patrný žádný produkt reakce. V tomto případě jsou na snímku patrné stopy po DNA, která procházela gelem.



**Obrázek 4.90: Gelová elektroforéza pro ISSR UBC 881**

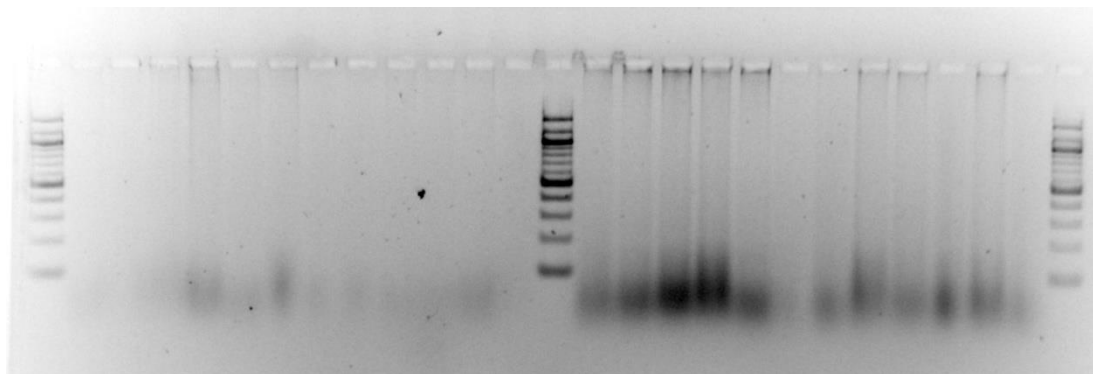
Snímek 4.90 vyobrazuje gelovou elektroforézu po PCR reakci za použití primerové kombinace UBC 881, kdy na snímku nejsou patrné žádné stopy po produktu. Absence výraznějších stop po zbytkové DNA vycházející z reakce mohou být zapříčiněny nedostatečnou expozicí UV záření.



**Obrázek 4.91: Gelová elektroforéza pro ISSR UBC 890**

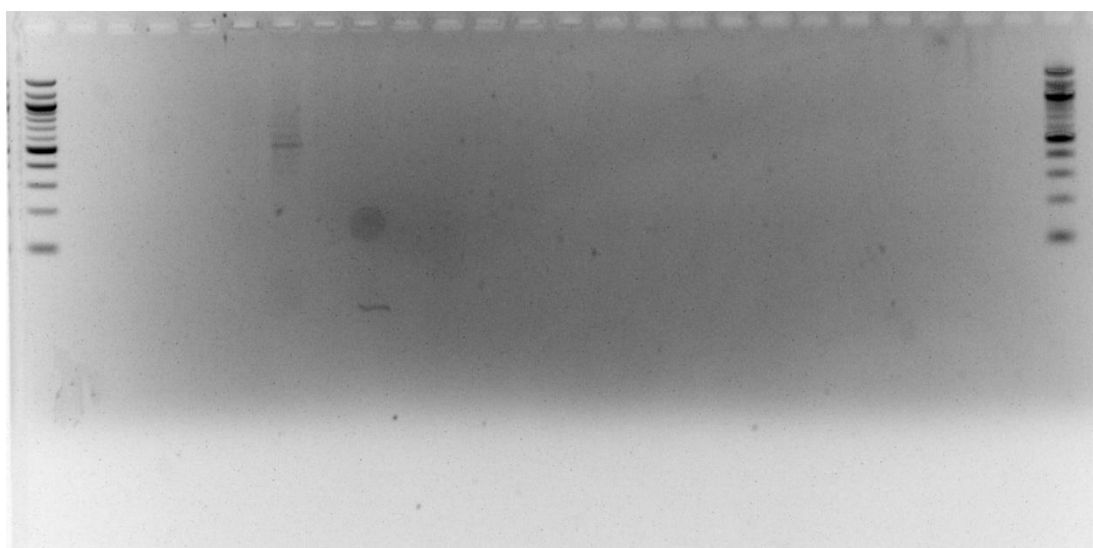
---

Obrázek 4.91 ukazuje absenci produktu po PCR reakci za použití primerové kombinace UBC 890. Na snímku není patrný žádný amplifikovaný produkt reakce, avšak jsou zde patrné stopy po procházející DNA, která se během elektroforetické reakce zachytávala v pórech agarozového gelu.



**Obrázek 4.92: Gelová elektroforéza pro teplotní gradient ISSR UBC 825 a UBC 881**

Na snímku 4.92 je zachycen výsledek reakce za použití teplotního gradientu pro primerové kombinace 825 a 881. Na snímku jsou vzorky řazeny ve směru zleva doprava: Ladder 100 bp, vzorky pro primer UBC 881, Ladder 100 bp a vzorky za použití primeru UBC 825. U obou primeru jsou patrné stopy po procházející DNA, avšak není zde patrný žádný produkt PCR reakce.



**Obrázek 4.93: Gelová elektroforéza pro teplotní gradient ISSR UBC 890**

Snímek teplotního gradientu pro primerovou kombinaci UBC 890 (Obrázek 4.93). Na snímku je patrný slabý náznak produktu, který se však ukázal jako náhodný, vzhledem k neúspěšné následné reakci, která měla za úkol ověřit pravdivost tohoto výsledku.

---

#### 4.7 Shrnutí výsledků genetických analýz

Během zpracovávání analýzy ISSR, která vyšla negativně, byly analýzy několikrát opakovány a všechny kroky byly konzultovány jak se školitelem prof. Čurnem, i s ostatními členy laboratoře, kteří s touto technikou běžně pracují. Během konzultací i při samotném zpracovávání nic nenasvědčovalo tomu, že by měl nastat případ, kdy si ověřené a opakovaně používané primery nepřisednou na vlákno DNA druhu *Pectinatella magnifica* a požadovaný výsledek se tak nedostaví. Přesto přese všechnu snahu o najetí řešení a úspěšnou amplifikaci ISSR DNA fingerprintingu výsledek analýz ISSR dopadl neuspokojivě.

Oproti neúspěšné analýze ISSR, již ověřená technika AFLP dopadla úspěšně. Ze získaných výsledků je patrné, že celková genetická diverzita druhu *Pectinatella magnifica* je velice nízká, kdy bylo dosaženo celkového množství 87,42 % variabilních fragmentů. Dle statistických analýz a distanční matice se celková vzájemná podobnost jednotlivých vzorků pohybuje mezi 58,32 % až po 89,28 %. Studované vzorky pak vykazovaly celkově velmi nízkou hladinu genetické diverzity, kdy z celkového množství 270 amplifikovaných vzorků se jako odlišných ukázalo 26, tedy 9,67 %. Vzhledem k nízkému procentu vzorků tvořících druhý klastr je velmi těžké usuzovat, zda u druhu *Pectinatella magnifica* došlo ke specializaci v rámci studovaného areálu. Během odběrů vzorků pro genetické analýzy byly zjištěny odlišnosti ve struktuře gelovité matrix, ale i v teplotě vody, ve které byly vzorky nalezeny. Zda se jedná o projev změny v genomu či specifickou reakci na vnější podmínky by bylo vhodné vyzkoumat ve studii cílené na odlišnosti jednotlivých odebíraných kolonií.

Na základě dat, získaných genetickými studiemi, lze usuzovat, že hypotézu, že celková genetická diverzita kolonií *Pectinatella magnifica* je nízká, nelze vyvrátit.

---

## 5 Souhrn nejvýznamnějších výsledků

Během studií bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*) bylo získáno množství výsledků, z nichž zde budou jmenovány ty nejvýznamnější, které by mohly přispět k lepšímu pochopení tohoto živočišného druhu.

- Během pravidelného pozorování stavu kolonií *Pectinatella magnifica* bylo zjištěno, že vlivem měnících se klimatických podmínek (teplota, srážky) dochází ke změně chování druhu, kdy v letech 2019-2021 došlo k dřívějšímu nástupu i konci vegetační sezóny než v letech předcházejících. Tento jev byl pravděpodobně vyvolán dřívějším nárůstem teplot a dostatečným množstvím vody na studovaných lokalitách, zatímco v druhé polovině léta dochází ke zhoršení životních podmínek, především k výraznému poklesu hladiny vlivem nízkých srážek během letních měsíců, a tím i nedostatku ponořeného substrátu pro uchycení kolonií mechovek.
- Během izolace DNA byly zjištěny rozdíly v množství a kvalitě izolované DNA v závislosti na délce skladování živočišného materiálu odebraného z kolonií *Pectinatella magnifica*. Při kontrole vytěžené DNA pomocí spektrofotometru BioSpec Nano byly zjištěny výrazné rozdíly mezi jednotlivými vzorky, zvláště mezi vzorky izolovanými těsně po odběru a vzorky skladovanými po určitou dobu v řízených podmínkách -20 °C. Vzorky skladované po dobu jednoho až dvou let poskytovaly nejkvalitnější genetický materiál, zatímco vzorky mladší byly silně kontaminované zásobními látkami, potřebnými jako výživa pro vyvíjející se zooid. Vzorky skladované delší dobu naopak byly méně kvalitní z důvodu degradace živočišného materiálu vlivem dlouhodobého působení mrazu.
- S ohledem na předchozí výsledky byl sestaven pokus s vlivem působení mrazu na vzorky kolonií *Pectinatella magnifica*. Na téže lokalitě (Veselí I) byly odebrány vzorky statoblastů, kdy část byla izolována přímo, část byla uskladněna v -20°C, část byla ponechána na lokalitě k přirozenému přezimování a odebrána a izolována až na jaře. Výsledky byly hodnoceny na základě spektrofotometrické analýzy získané DNA. V tomto pokusu bylo zjištěno, že vzorky izolované přímo poskytly jen malé množství silně kontaminované DNA, pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace zásobních látek a dosud nedovyvinutého zárodku budoucího zooidu. Oproti tomu přezimované a mražené vzorky poskytly téměř shodné výsledky, kdy bylo získáno dostatečné množství DNA o vysoké kvalitě. Z toho lze usuzovat,

---

že krátkodobé zmrazení odebraných vzorků simuluje přirozený vývoj statoblastů, které umožňuje plné vyvinutí zooidu uvnitř statoblastů za současného odčerpání části zásobních látek, které způsobují kontaminaci vzorků DNA.

- DNA vzorků odebraných v rámci jižních Čech byla podrobena genetickým, studiím za účelem stanovit podobnost kolonií *Pectinatella magnifica* na různých lokalitách v Jihočeském kraji. Nejprve byla provedena analýza AFLP jako metoda ověřená již v diplomové práci, která stanovila nejvhodnější primerovou kombinaci *EcoRI*+ACG/*MseI*+AGT (Moravcová, 2015). Výsledky AFLP byly vyhodnoceny statistickou metodou UMGMA. Výsledky této techniky byly vyhodnoceny jako celek a dále pak byly, pro lepší přehlednost, rozděleny dle jednotlivých lokalit odběrů. Výsledkem analýzy AFLP bylo členění vzorků *Pectinatella magnifica* do dvou klastrů, kdy se většina vzorků řadila v prvním velkém klastru, zatímco cca 10 % vzorků vytvořilo druhý menší klaster, vykazující zvýšenou genetickou diverzitu. Do tohoto klastru se řadí vzorky z lokalit: Vlkov (34, 150, 153, 156, 157, 226), Veselí I (70, 202, 207, 210, 213, 218, 255), Staňkovský (76, 80, 235), Kořensko (53), Cep I (84), Finsko (115), Hejtman (124, 191), Nový Hospodář (180), Nový Kancelář (128, 130, 198), Vydymač (249). Zajímavostí je, že vzorky pocházející z USA a Chorvatska se řadí mezi většinu v prvním velkém klastru. Na základě matice podobnosti sestavené z těchto výsledků vyšlo, že celková podobnost analyzovaných vzorků se pohybuje mezi 58,32 % a 89,28 %.
- Kromě analýzy AFLP byla pro potřeby disertační práce použita technika ISSR, která byla zvolena za účelem upřesnit výsledky genetických studií. Pro tuto techniku byly zvoleny primery UBC 810, UBC 881, UBC 890 a UBC 825, které byly doporučeny školitelem na základě dobrých zkušeností při jejich použití jako primerů univerzálních při analýzách širokého spektra rostlinných i živočišných druhů. Bohužel přes veškerou snahu a četná opakování analýz, včetně použití různých modifikací metody, doporučených školitelem, nebyl získán požadovaný výsledek reakce. Pravděpodobný důvod neúspěchu spočívá v primerech, které se ukázaly jako nekompatibilní se studovaným druhem. Řešením této situace by bylo testování jiných primerových kombinací, avšak s ohledem na skutečnost, že se jedná o dosud neosekvenovaný živočišný druh, je nalezení správné kombinace v množství komerčně produkováných primerů záležitost náhodná a časově i finančně velmi náročná.

---

## 6 Diskuse

Ačkoliv je bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) dosud ne zcela probádaným druhem, který by si zasloužil více pozornosti ze strany vědeckých pracovníků, zvláště se zaměřením na genetické studie, stále se jedná o druh opomíjený a velmi málo zkoumaný. Zvláště epidemie Covid-19 znamenala pro výzkum méně vědecky atraktivních druhů významné pozastavení v jejich studiu. Tento zásah do studií druhů jako *Pectinatella magnifica* znamenal i značné omezení v dostupnosti nových relevantních výsledků jiných vědeckých pracovišť, se kterými by bylo možné výsledky disertační práce porovnat. Z těchto důvodů je kapitola Diskuse výrazně stručnější než by práce svou časovou náročností na zpracování a obsahem výzkumu zasluhovala.

### 6.1 Monitoring výskytu kolonií v závislosti na počasí

Během pravidelného pozorování byly zjištěny změny v chování kolonií *Pectinatella magnifica* v závislosti na počasí. Jako nejprůkaznější se ukázal vliv teploty, která je dle Balounová, et al. (2007) a Williams (1921) pro rozvoj kolonií zásadní. Ačkoliv dle výsledků byla korelace pouze 67,66 %, je třeba brát v potaz, že se jedná o výsledky získané z měření teplot vzduchu a nárůst kolonií tak bývá mírně opožděn o dobu potřebnou k prohřátí vodního sloupce a reakci samotného organismu. Dle studie Ježkové, et al. (2018) doba reakce statoblastů na změnu podmínek a začátek líhnutí nových zooidů trvá mezi 5-8 dny, která se do výsledků promítá.

Ačkoliv je teplota významným limitujícím faktorem pro rozvoj kolonií druhu *Pectinatella magnifica*, spolu s ní jsou důležité i další faktory. Nejvýznamnějším je kvalita vodního prostředí (Musil, et al., 2015; Ricciardi a Reiswig, 1994), průhlednost (Marcus, 1929), ale také dostupnost substrátu potřebného pro uchycení zooidů (Šetlíková, et al., 2005). Z tohoto důvodu hraje velikou roli i srážková aktivita v letních obdobích, která ač přímo nesouvisí s růstem kolonií *Pectinatella magnifica*, souvisí s množstvím vody ve vodních nádržích a tím i výškou hladiny a dostupností potenciálního ponořeného substrátu.

### 6.2 Zpracování a výsledky izolace DNA

Izolace DNA pomocí izolační techniky CTAB-PVP se ve výsledcích projevila jako dobrá volba, zajišťující dostatečné, v několika případech i značné, množství velmi kvalitní vysokomolekulární DNA. Pro tuto volbu byla v předešlých studiích provedena analýza, která srovnávala tuto techniku i s jinými možnostmi izolace DNA a byla

---

vybrána jako nejvhodnější, jak z hlediska množství, tak i z hlediska kvality DNA, což bylo následně i srovnáno s odbornou literaturou, která se na výsledcích srovnávacích analýz shodovala (Zetzsche, et al. 2008). Vzhledem k následnému užití izolované DNA pro potřeby techniky AFLP, je dle Čurn, et al. (2012) technika CTAB – PVP nejen vhodná, ale i často v souvislosti s technikou AFLP běžně využívaná. Nicméně tato technika je zároveň nejnáročnější z hlediska pracnosti, délky trvání i následné produkce plastového odpadu, kvůli vysokému množství dílčích kroků a tím i značnému množství spotřebovaného jednorázového plastu. Z dostupné odborné literatury je patrné, že jiná odborná pracoviště pro izolaci DNA z třídy *Phylactolaemata*, kam *Pectinatella magnifica* spadá, pro izolaci DNA využívá nejen techniku CTAB-PVP, ale i CTAB-SDS nebo komerčně vyráběné extrakční sady (Rubini, et al., 2011). Waeschenbach, et al. (2012) stejně jako Kutyumov, et al. (2021) a Kang (2015) k izolaci DNA používá DNeasy Blood a Tissue kit (Qiagen). Tato metoda byla podle analýzy Zetzsche et al. (2008) vyhodnocena jako nejvhodnější izolační technika pro extrakci DNA z živočišného a houbového materiálu.

Kutyumov, et al. (2021) mimo to používá ještě techniku založenou na phenol-chloroformové extrakci za účelem získání co nejdelšího vlákna DNA pro Rapid Run Nanopore sequencing. Okuyama. et al. (2006) udává, že pro izolaci DNA ze skupiny *Phylactolaemata*, mezi nimiž používal i statoblasty druhu *Pectinatella magnifica*, využil komerčně produkováný izolační kit DNeasy Tissue Kit od výrobce Qiagen. Dle Taberlet et al. (2018) jsou komerčně produkovány kity obecně vhodné

pro vzorky získávané z vodního prostředí, avšak před samotnou izolací je vhodné tyto vzorky odstředit a následně vysušit, aby nedošlo ke zbytečnému zředění izolačního kitu.

Pro potřeby disertační práce byly pro izolaci DNA druhu *Pectinatella magnifica* využívány především statoblasty. Z literatury je patrné, že i jiní autoři užívají pro své studie materiál získaný se statoblastů třídy *Phylactolaemata* (Okuyama. et al., 2006; Kang a An, 2015). Současně je možné najít i zdroje, ve kterých autoři uvádí použití zooidů, které byly po odběru umístěny na několik dnů do čisté vody, aby se jejich trávicí trakt očistil od zbytků potravy (Kutyumov, et al., 2021).

---

### 6.3 Vyhodnocení vlivu stáří vzorku na množství a kvalitu DNA

Z dostupné literatury je patrné, že v případě živočišného materiálu je skladování vzorků spíše krátkodobou záležitostí (Samoo, et al., 2017, Richardson, et al., 2006). V těchto případech se jednalo spíše o vzorky živočišných tkání či krve, která byla skladována po dobu 1–2 dnů. Dlouhodobějším skladováním se zabýval Chen, et al. (2018), který využíval vzorky skladované průměrně po dobu 12 let až po vzorky staré až 19 let, aniž by zaznamenal jakoukoliv ztrátu na množství či kvalitě izolované DNA. Rogstad (1992) uvádí u vzorků rostlinného původu pouze nepatrné změny v množství a kvalitě DNA, pokud se jednalo o vzorky staré i více než jeden rok. V případě semen rostlin, která mohou být brána jako obdoba statoblastů, byla pro hrách odhadnuta doba skladování až po dobu 9 932 let při -20 °C bez výraznějších ztrát na množství a kvalitě DNA (Kranner, et al., 2011). Taková doba je ovšem u statoblastů druhu *Pectinatella magnifica* jen stěží dosažitelná, z důvodu přítomnosti vysokého podílu vody ve statoblastech i samotném prostředí. Hoelzel (1998) uvádí, že pro rostlinný materiál je nejvhodnější doba skladování při -20 °C po dobu několika měsíců až půl roku, zatímco živočišný materiál je nejvhodnější zpracovávat okamžitě, případně ho konzervovat pomocí konzervačních činidel.

---

## 6.4 Vyhodnocení vlivu mrazu na množství a kvalitu DNA

Ze získaných výsledků je zjevné že mráz má významný vliv na získané a skladované vzorky. Nesporně zajímavým studiem by bylo srovnání kvality a množství DNA ve vzorcích druhu *Pectinatella magnifica* uchovávaných v prostředí, kde by byly vystaveny mrazu (-20 °C), hlubokému zamražení (-80 °C) a pouhého chladu (4 °C). Touto problematikou se zabývala celá řada autorů (AlRokayan, 2000; Chen, et al. 2018; Dawson, et al., 1998; Samoo, et al., 2018), kteří studovali vliv mrazu na kvalitu a množství DNA u vzorků uchovávaných krátkodobě i po dlouhou dobu. Ve studiích jsou používány různé druhy materiálu, ať už živočišného v podobě krve, jiných živočišných tkání, či rostlinného materiálu ve formě odebraných orgánů nebo semen. AlRokayan (2000) zjistil, že v případě krevních vzorků se množství mezi vzorky skladovanými při -4 °C a -20 °C významně neliší, avšak kvalitativně jsou vzorky uchovávané při -20 °C významně lepší. Vzorky uchovávané při nižších teplotách poskytovaly pro porovnání na agarózovém mikrogelu výrazně delší molekuly DNA, což umožňovalo lepší podmínky pro následující studie. Na pozitivním vlivu uskladnění při nízkých teplotách se shoduje i Samoo, et al. (2017), který zjistil, že skladování při -20 °C má prokazatelný pozitivní vliv i při uskladnění v řádu pouhých dnů, a Chen et al. (2018), který skladoval vzorky po dobu až 19 let při -30 °C, aniž by došlo k výraznějším ztrátám na studované DNA. Dawson et al. (1998) uvádí, že nejvhodnější teplota pro skladování většiny vzorků z živočišné i rostlinné říše je -50 °C. Pro nižší teploty pak doporučuje doplnit či přímo nahradit ošetření mrazem o konzervant v podobě etanolu či jiného konzervačního činidla.

Z pohledu životního cyklu kolonií *Pectinatella magnifica* by mohly výsledky mrazového pokusu naznačovat, že statoblasty bryzoí potřebují pro svůj vývoj přezimovat v chladnějších podmínkách či překonat určité časové období ve fázi zárodku. Obdobnou problematikou se zabýval i Mukai (1974), který testoval statoblasty příbuzného druhu *Pectinatella gelatinosa* a dospěl obdobným závěrům, kdy statoblasty potřebovaly překonat období dormance, než se byly schopny vylíhnout. K podobným závěrům dospěl i Proud (1969), avšak pro identifikaci dormantních statoblastů používal techniky založené na analýze RNA.

---

## 6.5 Vhodnost zvolených molekulárních markerů pro populační analýzu

V dostupné literatuře je uvedeno, že pro počáteční analýzu DNA, co do vhodnosti pro užití pro další analýzy je často užívaná spektrofotometrická analýza (Chen, et al., 2018; Kranner, et al. 2011; Samoo, et al., 2017). V těchto zdrojích je uvedeno, že spektrofotometrické délky pro stanovení množství a kvality DNA byly, rovněž jako v disertační práci, 260 a 280 nm. Oproti tomu Cubero, et al. (1999) používal pro vizualizaci DNA, vytěžené pomocí techniky založené na CTAB, 1 % agarozový gel. I Kang a An (2015) a Osborn a Smith (2005) používá 1 % agarozový gel pro ověření úspěšné amplifikace, avšak pro kontrolu produktu analýzy genu pro COI, který dále analyzoval pomocí sekvenačního přístroje.

Technika AFLP je jednou z nepoužívanějších metod pro populační analýzy druhů s dosud nestanoveným genomem. Ve srovnání s ostatními univerzálními technikami jako je RAPD a RFLP se ukazuje jako nejvhodnější z hlediska nejširšího celkového rozsahu a citlivosti (Powel, et al., 1996). Mueller, et al. (1999) rovněž uvádí, že technika AFLP je vhodným nástrojem pro studium genetické diverzity v rámci jednoho druhu. Dle Meudta a Clarka (2007) je technika AFLP velmi vhodnou pro širokou škálu genetických studií s výbornou vypovídající hodnotou. Dle těchto autorů by inovované varianty této staré techniky DNA fingerprintingu mohly představovat značnou konkurenci i pro moderní techniky stanovování genetické diverzity.

Jednou z často užívaných možných technik populační analýzy druhu *Pectinatella magnifica* je použití mitochondriálního genomu za využití genu pro cytochrome oxidázu I (COI). Tyto analýzy jsou však užívány výhradně pro fylogenetické studie, jelikož využívají schopnost mitochondriálního genomu zachování uspořádání genů i po poměrně dlouhou dobu v průběhu evoluce studovaného organismu (Boore, 1999). Využití genu pro COI umožňuje skutečnost, že mitochondriální genom druhu *Pectinatella magnifica* byl již, na rozdíl od genomu jaderného, plně oskenován za pomoci technik next-generation sequencing (Gim, et al., 2018). Fuchs, et al. (2009) uvádí, že často užívanou technikou pro genetické analýzy je v rámci skupiny *Ectoprocta* technika 18S a 28S, avšak tyto techniky slouží pouze fylogenetickým studiím. Pro analýzy genetické diverzity jsou dle literatury užívány techniky RAPD-PCR, Mikrosatelity (Freeland, et al., 2000) či ITS (Hatton-Ellish, et al., 1998), avšak všechny tyto analýzy byly provedeny na druhu *Cristatella mucedo*, která je mnohem více prostudovaná a vědecky sledovaná.

---

Technika ISSR je na základě dostupné literatury velmi vhodná, díky rychlému, přesnému a finančně relativně nenáročnému fingerprintingu analyzovaných druhů (Wang, 2002). Ačkoliv je uvedeno, že se jedná o techniku, která je vhodná i pro naprosté začátečníky (Ng a Tan, 2015), v případě zpracování disertační práce, vydala výsledky velmi neuspokojivé. Pravděpodobnou příčinou je použití nesprávné primerové kombinace, která je v případě neznalosti genomu, pouhým náhodným hledáním správné varianty z mnoha komerčně produkováných primerů.

## **6.6 Vyhodnocení výsledků genetické analýzy *Pectinatella magnifica***

Studium genetické diverzity druhu *Pectinatella magnifica* je málo rozšířenou záležitostí. O analýzách zabývajících se genomem tohoto druhu je dostupné jen omezené množství literatury, ze které je většina zaměřena pouze na fylogenetické studie a zařazení druhu *Pectinatella* do celkového schématu skupiny *Bryozoa*. Z této skupiny je beze sporu mnohem prostudovanější druh *Cristatella mucedo*, avšak výsledky genetických analýz těchto dvou druhů jsou neporovnatelné.

V porovnání disertační práce s předchozí diplomovou prací (Moravcová, 2015), lze usuzovat, že výsledky obou studií jsou si velmi podobné. Původních 30 vzorků, které byly zahrnuty v diplomové práci, bylo rovněž použito i v práci disertační, avšak množství nových vzorků významně přesahovalo tyto vzorky původní a nemohlo tak dojít k ovlivnění výsledků práce. Dle výsledků původní studie bylo analýzou AFLP za použití primerové kombinace E-ACG/M-AGT získáno 157 fragmentů, z nichž 132 (84,00 %) bylo polymorfních. V disertační práci bylo při stejné primerové kombinaci získáno 139 variabilních fragmentů z 159 (87,42 %). Přesto však u obou studií byla celková genetická diverzita stanovena jako velice nízká, kdy na základě distanční matice byla podobnost vzorků stanovena pro diplomovou práci v rozmezí 47,60-86,10 % a v práci disertační mezi 58,32 % a 89,28 %. Během shlukovacích analýz se u obou prací vzorky shlukovaly do dvou klastrů, kdy se v práci diplomové vyčlenily do druhého menšího klastru 3 vzorky z 30 (10,00 %) a v případě práce disertační se do druhého menšího klastru vyčlenilo 26 z 270, tedy 9,67 %. Z toho lze usuzovat, že výsledky obou analýz spolu vzájemně korespondují.

Na základě porovnání poznámek zapsaných během odběrů jednotlivých vzorků kolonií *Pectinatella magnifica* a výsledků genetických analýz by se dalo usuzovat, že společným jmenovatelem pro vzorky tvořící druhý klaster je růst ve vodách, které

---

nedosahují uváděných 20°C. Odlišnosti ve struktuře gelovité matrix, nebyly analýzami spolehlivě prokázány.

Z dostupné literatury je pak patrné, že genetickou diverzitou druhu *Pectinatella magnifica* se blíže zabýval Ingold, et al. (1984), který během pokusů o stanovení morfologické a genetické diverzity stanovil na vzorcích odebraných z odlišných stanovišť v oblasti Ohia (USA) celkový polymorfismus druhu *Pectinatella magnifica* na 5,9 % a průměrnou heterozygotnost na úrovni 0,013. Obě získané hodnoty byly vyhodnoceny jako celkově nižší, než tomu tak bylo u jiných druhů skupiny *Bryozoa*, stejně tak jako u všech zástupců bezobratlých.

Jiné zdroje, které by se zabývaly genetickou strukturou druhu *Pectinatella magnifica*, bohužel nejsou dostupné, a lze kvůli tomu usuzovat, že se nejedná vědecky atraktivní druh, který na své podrobné prostudování, včetně odhalení struktury jaderného genomu, stále ještě čeká. Je pravděpodobné, že výhledově se vědecká pracoviště studiem tohoto druhu začnou více zabývat, vzhledem k jeho masivnímu šíření napříč kontinenty.

---

## 7 Závěr

Na 270 vzorcích odebraných převážně na lokalitách jižních Čech byla provedena série pokusů, jejich účelem bylo rozšířit poznání genetické struktury druhu *Pectinatella magnifica*. Vzorky zahrnuté do genetických analýz pro disertační práci obsahovaly 30 vzorků, které sloužily jako studijní materiál pro předcházející práci diplomovou. Ta měla za účel stanovit nejvhodnější techniku izolace DNA a nejlepší primerovou kombinaci techniky AFLP, která měla dále sloužit jako hlavní zdroj poznání pro větší analýzu v rámci disertační práce. Díky této práci byla pro izolaci DNA zvolena technika využívající extrakci pomocí série srážecích reakcí za použití CTAB-PVP.

Pokusy o stanovení vlastností *Pectinatella magnifica* zahrnovaly testování vlivu podmínek -20 °C a délky skladování na kvalitu a množství DNA. Na základě série analýz byla teorie, že DNA nebude ovlivněna mrazovými podmínkami ani při krátkodobém skladování byla vyvrácena. Stejně tak hypotéza, že v případě statoblastů nedojde k ovlivnění DNA ani při skladování po dobu několika let, byla vyvrácena.

Pokus o stanovení genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* pomocí techniky ISSR dopadl v rámci disertační práce neuspokojivě, patrně z důvodu volby nevhodných primerů. Dle zkušeností na pracovišti i dostupné literatury by měly být použité primery UBC 810, 825, 881 a 890 univerzální při použití pro jakýkoliv organismus, avšak dle negativního výsledku je pravděpodobné, že sekvence, které jsou pro sestavení těchto primerů použity se v druhu *Pectinatella magnifica* nenacházejí. Metoda ISSR je nicméně vhodnou variantou pro studium genetické diverzity organismů, vzhledem k její schopnosti odlišit od sebe i jedince, avšak u organismů s dosud neosekvenovaným, a tudíž neznámým jaderným genomem je nevýhoda v použití. V takovém případě je výběr vhodného primeru otázkou náhody, kdy výběr toho pravého z desítek komerčně vyráběných primerů spočívá v postupném testování jednotlivých variant, což by ve výsledku bylo materiálně, finančně i časově náročnější než analýza samotná.

Analýzy technikou AFLP oproti ISSR byly již dříve ověřené jako plně funkční a odpovídající. Díky předchozí studii, která byla součástí diplomové práce, byla stanovena optimální primerová kombinace E-ACG/M-AGT, která ze všech použitých variant vytvořila nejširší a nejvíce vypovídající škálu amplifikovaných variabilních fragmentů. Z tohoto důvodu byly všechny vzorky, použité v disertační práci,

---

podrobené analýze AFLP pomocí této primerové kombinace, kdy E-ACG nesl fluorescenční značení pro následující fragmentační analýzy pomocí sekvenačního přístroje. Analýza AFLP byla provedena pro všech 270 vzorků. Z výsledků analýzy byla sestavena binární matice (1;0), která měla za účel stanovit přítomnost či nepřítomnost amplifikovaného fragmentu. Na základě výsledků fragmentační analýzy bylo zjištěno, že bylo získáno celkové množství 139 variabilních fragmentů ze 159 v rozmezí velikostí 36–414 bp, tedy 87,42 %. Binární matice pak sloužila jako zdroj pro další analýzy. Z ní byla sestavena distanční matice pro určení genetické podobnosti jednotlivých vzorků a dále byla provedena shlukovací analýza pro stanovení jejich celkové genetické struktury. Tyto analýzy byly provedeny pro všechny vzorky, pro získání celkového obrazu studovaných vzorků. Jako další krok byly vzorky roztrženy dle jednotlivých lokalit odběru a byla u nich opět provedena shlukovací analýza pro stanovení genetické struktury v rámci jednotlivých lokalit.

Z výsledků analýzy AFLP bylo stanoveno, že celková genetická diverzita na území jižních Čech je velice nízká a celková podobnost jednotlivých vzorků se pohybuje mezi 58,32 % a 89,28 %. Vzorky odebrané na studovaných lokalitách se během shlukovací analýzy dělily do dvou klastřů, kdy cca 90,00 % vzorků se řadilo do větší ucelené skupiny, zatímco zbývajících cca 10 % tvořilo menší rozdrobený klastr. V tomto malém klastru byly zahrnuty vzorky z lokalit Vlkov (34, 150, 153, 156, 157, 226), Veselí I (70, 202, 207, 210, 213, 218, 255), Staňkovský (76, 80, 235), Kořensko (53), Cep I (84), Finsko (115), Hejtman (124, 191), Nový Hospodář (180), Nový Kanclíř (128, 130, 198) a Vydymač (249).

Z výsledků shlukovacích analýz a celkového obrazu pak hypotézu, že celková genetická struktura druhu *Pectinatella magnifica* je velmi nízká nelze vyvrátit.

Živočišný druh bochnatka americká je beze sporu organismem velice zajímavým, který by si zasloužil důkladnější prostudování, a to nejen z hlediska vzájemné podobnosti kolonií, ale i pro seznámit se s jejím životním cyklem, potřebami a preferencemi. Vzhledem k nízké úrovni poznání nabízí celou řadu příležitostí pro studium a širokou škálu potenciálních objevů od stránky ekologické, genetické ale i biochemické, ve formě zpracování látek obsažených ve vodě a produkci vedlejších živočišných produktů, s možností jejich využití v jiných odvětvích lidského snažení.

---

## Seznam použité literatury

1. Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., a Rulík, M. (2008). Aplikovaná hydrobiologie. VÚRH JU Vodňany. ISBN: 978-80-87437-09-4
2. Afanasyev, S. O., a Lietytska, O. M. (2021). The First Record of Alien Bryozoan *Pectinatella magnifica* in the Dnieper River Basin and Evaluation of Its Dissemination Paths. *Hydrobiological Journal*, 57(2).
3. AlRokayan, S. A. (2000). Effect of storage temperature on the quality and quantity of DNA extracted from blood. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3(3), 392–394.
4. Aleksandrov, B., Voloshkevich, O., Kurakin, A., Rybalko, A., a Gontar, V. (2014). The first finding of bryozoan *Pectinatella magnifica* (*Lophopodidae*) in lower Danube. *Vestnik zoologii*, 48(4), 269-274.
5. Anderberg, M. R. (2014). Cluster analysis for applications: probability and mathematical statistics: a series of monographs and textbooks (Vol. 19). Academic press.
6. Anderson, C. L., Canning, E. U., a 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(6), 555-561.
7. Avise, J. C. (2012). Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science a Business Media..
8. Balounová, Z., Pechoušková, E., Rajchard, J., Joza, V., a Šinko, J. (2013). World - wide distribution of the Bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851). *European Journal of Environmental Sciences*, 3(2).
9. Balounová, Z., Rajchard, J., Švehla, J., a Šmahel, L. (2011). The onset of invasion of bryozoan *Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech Republic). *Biologia*, 66(6), 1091-1096.
10. Balounová, Z., Šmahel, L., Rajchard, J. (2007). Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová, J., Štěrbá, O. (Eds. ). *Proceedings of the Říční krajina 4*, Olomouc.
11. Barnes, D. K., a Lauer, T. E. (2003). Distribution of freshwater sponges and bryozoans in northwest Indiana. In *Proceedings of the Indiana Academy of Science* (Vol. 112, No. 1, pp. 29-35).

- 
12. Barnes, R. S. K., Calow, P. P., Olive, P. J., Golding, D. W., a Spicer, J. I. (2009). The invertebrates: a synthesis. John Wiley a Sons.
  13. Bauer, CH., Mildner, J., a Setlíková, I. (2010). Das Moostierchen *Pectinatella magnifica* in Österreich. Österreichs Fisch, 63, 262-264.
  14. Bier, M. (Ed.). (2013). Electrophoresis: theory, methods, and applications. Elsevier,
  15. Bína, J. a Demek, J. (2012). Z nížin do hor – Geomorfologické jednotky České republiky. Praha: ACADEMIA. 343 s. ISBN 978-80-200-2026-0.
  16. Bilton, D. T., Freeland, J. R., a Okamura, B. (2001). Dispersal in freshwater invertebrates. Annual review of ecology and systematics, 159-181.
  17. Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research 27: 1767-1780.
  18. Bornet, B., a Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant molecular biology reporter, 19(3), 209-215.
  19. Brandwein, P. F. (1938). The culture of *Pectinatella magnifica* Leidy. The American Naturalist, 72(738), 94-96..
  20. Brooks, C. M. (1929). Notes on the statoblasts and polypids of *Pectinatella magnifica*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 427-441.
  21. Brown, T. A. (2007). Klonování genů a analýza DNA: úvod. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-1719-6.
  22. 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.
  23. Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J., a Gresshoff, P. M. (1991). DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 9(4), 294-307..
  24. Campbell, N. A. a Markl, J. (1997). Biologie. Heidelberg/Berlin/Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 560 s.
  25. Canning, E. U., Refardt, D., Vossbrinck, C. R., Okamura, B., a Curry, A. (2002). New diplokaryotic microsporidia (Phylum *Microsporidia*) from freshwater bryozoans (*Bryozoa*, *Phylactolaemata*). European Journal of Protistology, 38(3), 247-265.

- 
26. Carroget, E., Gruet, Y., Baudet, J., a Dutertre, M. (2005). Présence de colonies du *Bryozoaire Pectinatella magnifica* Leidy 1851 dans la Loire et dans le canal de Nantes à Brest (Loire-Atlantique). Bulletin de la Société des sciences naturelles de l'Ouest de la France (1983), 27(1), 19-29
27. Cubero, O. F., Crespo, A. N. A., Fatehi, J., a Bridge, P. D. (1999). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Plant Systematics and Evoluto, 216(3), 243-249.
28. Culek, M. (1996). *Biogeografické členění ČR*. Praha: Enigma. 347 s. ISBN 80-85368-80-3.
29. Culek, M. a Grulich, V. (2010). *Biogeografické členění ČR*. Praha: Enigma, 347 s. ISBN 80-85368-80-3.
30. Čurn, V., Havlíčková, L., Vondrášková, E., Kučera, V., Vyvadilová, M., a Klíma, M. (2012). Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta., ISBN 978-80-7394-251-9.
31. 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 a Francis, p. 119.
32. D'Hondt, J. L., a Mignot, J. P. (2010). On the occurrence of the phylactolaematous bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in Vassivière Lake (Limousin, France). Bulletin de la Société Zoologique de France, 135(1/2), 63-78
33. 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.
34. Davenport, C. B. (1904). Report on the fresh-water *Bryozoa* of the United States. US Government Printing Office, 27, 211-221.
35. Dawson, M. N., Raskoff, K. A., a Jacobs, D. K. (1998). Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. Molecular marine biology and biotechnology, 7(2), 145-152.
36. Demek, J. (1965). Geomorfologie českých zemí. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 335 s.
-

- 
37. Dendy, J. S. (1963). Observations on bryozoan ecology in farm ponds. *Limnology and Oceanography*, 8(4), 478-482.
  38. Dumbrovský, M., Sobotkova, V., Šarapatka, B., Vachalova, R., Chmelová, R. P., a Vachal, J. (2015). Long-term improvement in surface water quality after land consolidation in a drinking water reservoir catchment. *Soil and Water Research*, 10(1), 49-55.
  39. Everitt, B. (1974). Cluster analysis: An SSRC review of recent research.
  40. 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.
  41. Frost, T. M. a 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.
  42. Fuchs, J., Obst, M., a 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.
  43. Geiser, S. W. (1937). *Pectinatella magnifica* Leidy an occasional river-pest in Iowa. *Field and Laboratory*, 5(2), 6.
  44. Gilbert, D. E. a Feigon, J. (1999). Multistranded DNA structures. *Current opinion in structural biology*, 9(3), 305-314.
  45. Gim, J. S., Ko, E. J., Kim, H. G., Kim, Y. M., Hong, S., Kim, H. W., a Jo, H. (2018). Complete mitochondrial genome of the freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica* (Phylactolaemata: Plumatellida) assembled from next-generation sequencing data. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1), 373-374.
  46. Gosden, J. a 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.
  47. Grant, S., a Jones, J. (2017). Field Museum of Natural History (Zoology) Invertebrate Collection. Version 18. 7. Field Museum. Occurrence Dataset
  48. Grant, D. a 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.

- 
49. Grossman, P. D., a Colburn, J. C. (Eds.). (2012). Capillary electrophoresis: Theory and practice. Academic Press., 552 s., ISBN 978-0-849-37862-1
  50. 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.
  51. Hadrys, H., Balick, M., a Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology*, 1(1), 55-63.
  52. Hand, S. C. (1991). Metabolic dormancy in aquatic invertebrates. *Advances in comparative and environmental physiology*, 8, 1-50.
  53. Hartl, D. L. a Clark, A. G. (1997). Principles of population genetics. Sunderland: Sinauer associates, 635 s.
  54. Harstad, R. K., Johnson, A. C., Weisenberger, M. M., a Bowser, M. T. (2016). Capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 88(1), 299-319.
  55. Hejsková, E. (1953). Revise československých mechovek (Bryozoi). *Věstník Královské české společnosti nauk, třída matematika-přírodověda*, 5, 1-12.
  56. Heřmanová, E. (2012). Jihočeské rybníky a rybníkářství. *Geografické rozhledy*, 21(3), 5-7.
  57. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., a Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026-1030.
  58. Hoelzel, A. R. (Ed.). (1998). Molecular genetic analysis of populations: a practical approach (Vol. 187). Oxford University Press.
  59. Hörter, A., Peters, L., a Sinsch, D. K. U (2015). Freshwater Bryozoa in the volcanic Lakes of the Eifel (Germany).
  60. Hrabě, S. (1935). O *Pectinatella magnifica* a některých jiných mechovkách. *Věda přírodní*, 16, 89 - 92.
  61. Hubschman, J. H. (1970). Substrate discrimination in *Pectinatella magnifica* Leidy (Bryozoa). *Journal of Experimental Biology*, 52, 603-607.
  62. Hudson, R. R., Slatkin, M., a Maddison, W. P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2), 583-589.
  63. Hule, M. (2003). Rybníkářství na Třeboňsku: historický průvodce; povodeň r. 2002. Třeboň: Carpio, 250 s., ISBN 8086434001.

- 
64. Chabrol, L. (2016). Nouvelles observations de *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851)(Bryzoaire) en Limousin. Bulletin de la Société Linnéenne de Bordeaux, 151, 437-440
65. Chen, K. a Rajewsky, N. (2006). Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. Nature genetics, 38(12), 1452-1456.
66. Chen, W. C., Kerr, R., May, A., Ndlovu, B., Sobalisa, A., Duze, S. T., a Babb de Villiers, C. (2018). The integrity and yield of genomic DNA isolated from whole blood following long-term storage at  $-30^{\circ}$  C. Biopreservation and Biobanking, 16(2), 106-113.
67. Church, G. a Gilbert, W. (1984). Genomic Sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 81(7), 1991 - 1995.
68. Ingold, J. L., Mundahl, N. D., Weigt, L. A., a Guttman, S. I. (1984). Ecology and population genetics of the freshwater bryozoan, *Pectinatella magnifica* Leidy. Journal of Freshwater Ecology, 2(5), 499-508.
69. Jeřábek, M. (1999). Geografická analýza pohraničí České republiky. Ostrava: Sociologický ústav Akademie věd České republiky, 179 s., ISBN 8085950766.
70. Ježková, E., Rajchard, J., & Zágöršek, K. (2018). Experimental cultivation of the invasive freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica*. Biologia, 73(6), 615-619.
71. Jo, H., Joo, G. J., Byeon, M., Hong, D. G., Gim, J. S., Kim, J. Y., a Choi, J. Y. (2014). Distribution pattern of *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851), an invasive species, in the Geum River and the Nakdong River, South Korea. Journal of Ecology and Environment, 37(4), 217-223.
72. Jones, K. E., Marsh, T. G., a Wood, T. S. (2000). Surveying for phylactolaemate bryozoans by sieving lentic. In Proceedings of the 11th International Bryozoology Association Conference, Panama: Smithsonian Tropical Research Institute (pp. 259-264).
73. Joo, G. J., Ward, A. K., a 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.
74. Jullien, J. (1885). Monographie des Bryozoaires d'eau douce. Meulan: Société Zoologique de France, 45 s.
75. Kafka, J. (1887). Die Süßwasserbryozoen Böhmens. Praha: Rivnac Verlag, 34 s.
-

- 
76. Kamiński, M. (1984). Contributions to the knowledge of fresh-water Bryozoa of the Masurian Lake District. *Fragmenta Faunistica*, 28(4), 73-78.
77. Kang, N., a An, K. G. (2015). Statoblast ultrastructure and genetic identity of *Pectinatella magnifica* population, based on COI gene, from three different watersheds in Korea. *Animal Cells and Systems*, 19(1), 78-84.
78. Kapitonov, V. V. a 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.
79. Karp, A. a Edwards, K. (1997). DNA markers: a global overview. *DNA markers: protocols, applications, and overviews*, 1-13.
80. Kate, K. T. a Laird, S. A. (1999). The commercial use of biodiversity: Access to genetic resources and benefit-sharing. London: Earthscan Publications Ltd., 416 s., ISBN 1853833347.
81. Kellicott, D. (1882). *Polyzoa*: Observations on Species Detected near Buffalo, NY. *Proceedings of the American Society of Microscopists*, 4, 217-229.
82. Kent, M. L., Khattri, J., Hedrick, R. P., a Devlin, R. H. (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.
83. Ko, E. J., Gim, J. S., Hong, S., Jo, H., Kim, J. Y., Hirose, M., a Joo, G. J. (2019). Distribution and growth of non-native bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in four large rivers in South Korea. *Aquatic Invasions*, 14(2).
84. Komárek, J. (1952). *Zoologie bezobratlých* (Vol. 1). Přírodovědecké vydavatelství.
85. Koletić, N., Novosel, M., Rajević, N., a Franjević, D. (2015). Bryozoans are returning home: recolonization of freshwater ecosystems inferred from phylogenetic relationships. *Ecology and Evolution*, 5(2), 255-264.
86. Kozák, J. a Němeček, J. (2009). *Atlas pŕd České republiky*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky a Česká zemědělská univerzita v Praze. 228 s. ISBN 8021318821.
87. Kraepelin, K. (1887). *Die deutschen süßwasser-bryozoen: Eine monographie*. Hamburk: L. Friederichsen a Company, 48 s.
-

- 
88. Kranner, I., Chen, H., Pritchard, H. W., Pearce, S. R., a Birtić, S. (2011). Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. *Plant growth regulation*, 63(1), 63-72.
89. Kutyumov, V. A., Predeus, A. V., Starunov, V. V., Maltseva, A. L., a Ostrovsky, A. N. (2021). Mitochondrial gene order of the freshwater bryozoan *Cristatella mucedo* retains ancestral lophotrochozoan features. *Mitochondrion*, 59, 96-104.
90. Labastida, E., Cobián, D., Hénaut, Y., del Carmen García-Rivas, M., Chevalier, P. P., a Machkour-M'Rabet, S. (2015). The use of ISSR markers for species determination and a genetic study of the invasive lionfish in Guanahacabibes, Cuba. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(5), 1011-1018.
91. Lacourt, A. (1968). A monograph of the freshwater *Bryozoa-Phylactolaemata*. Leiden: EJ Brill, 155 s.
92. Laikre, L., Allendorf, F. W., Aroner, L. C., Baker, C. S., Gregovich, D. P., Hansen, M. M.,... a Waples, R. S. (2010). Neglect of genetic diversity in implementation of the convention of biological diversity. *Conservation Biology*, 24(1), 86-88.
93. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., a Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
94. Leidy, J. (1851). On *Cristatella magnifica*. *Proceedings of Academy of Natural sciences Philadelphia*, 5, 265-266.
95. Leinonen, K., Lindholm, M., Rocha, M. P., Tolonen, K. E., a Vilmi, A. (2019) Invasion of the magnificent bryozoan (*Pectinatella magnifica*) in Finland
96. Loppens, K. (1908). Les Bryozoaires d'eau douce. *Annales de Biologie Lacustre*, 3, 141-158.
97. Lynch, M. a Milligan, B. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular ecology*, 3(2), 91-99.
98. Marcadet, A., O'Connell, P., a Cohen, D. (1989). Standardized Southern blot workshop technique. In *Immunobiology of HLA* (pp. 553-560). Springer, New York, NY.
99. Marcus, E. (1925). *Bryozoa*. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 63 s.
-

- 
100. Martinovic-Vitanovic, V. M., Milankov, V. M., a Kalafatic, V. I. (2010). First record of freshwater bryozoans (*Bryozoa: Phylactolaemata*) in the aquatic invertebrate fauna of Serbia. *Limnologica*, 40(1), 73-81.
101. Massard, J. a Geimer, G. (2005). Die Süßwasserbryozoen in der Fauna Europaea 2004: Karten und Kommentare. 167-174.
102. Massard, J. A. a Geimer, G. (2008a). Global diversity of bryozoans (*Bryozoa* or *Ectoprocta*) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 198, 93-99.
103. Massard, J. A. 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.
104. Massard, J. A., a Geimer, G. (2015). L'histoire de la recherche bryozoologique au Luxembourg (*Phylactolémates* et *Gymnolémates* d'eau douce). *Bull. Soc. Nat. luxemb*, 116, 373.
105. Massard, J. A., Geimer, G., a Wille, E. (2013). Apparition de *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851)(*Bryozoa, Phylactolaemata*) dans le lac de barrage d'Esch-sur-Sûre (Luxembourg). *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois*, 114, 131-148.
106. Massard, J. A., Geimer, G., Bromley, H. J., a 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.
107. Mawatari, S. (1973). New occurrence of *Pectinatella magnifica* (Leidy) in a Japanese lake. In *Proceedings of Japan Society of Systematic Zoology* (Vol. 9, pp. 41-43).
108. Mendel, J., Lusk, S., Koščo, J., Vetešník, L., Halačka, K., a Papoušek, I. (2008). Genetic diversity of *Misgurnus fossilis* populations from the Czech Republic and Slovakia. *Folia zoologica*, 57(1/2), 90.
109. Meudt, H. M. a Clarke, A. C. (2007). Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in plant science*, 12(3), 106-117.
110. Moravcová, V. (2015). Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*. České Budějovice, Diplomová práce, Zemědělská fakulta Jihočeská univerzity. Vedoucí práce: Ing. Lenka Havlíčková, Ph. D.
-

- 
111. Morse, W. (1930). The chemical constitution of *Pectintalla*. Science, 71(1836), 265.
112. Mueller, U. G. a Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. Trends in Ecology a Evolution, 14(10), 389-394.
113. Mukai, H. (1974). Germination of the statoblasts of a freshwater bryozoan, *Pectinatella gelatinosa*. Journal of Experimental Zoology, 187(1), 27-39.
114. 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.
115. Musil, M., Rajchard, J., Novotná, K., Balounová, Z., a Ježková, E. (2018). The relationship between occurrence of invasive bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851) and parameters of the aquatic environment in the Biosphere Reserve Třeboňsko (Czech Republic). Wetlands Ecology and Management, 26(5), 977-983.
116. Neck, R. a Fullington, R. (1983). New records of the fresh-water *Ectoproct Pectinatella magnifica* in eastern Texas. Texas Journal of Science, 35(3), 269-271.
117. Nei, M., Maruyama, T., a Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 1-10.
118. Neuhäuslová, Z. (1998). Potenciální vegetace České republiky. Praha: Academia, 341 s.
119. Němec, J. (2001). Bonitace a oceňování zemědělské půdy České republiky. Praha: Výzkumný ústav zemědělské ekonomiky. 257 s. ISBN 808589890X.
120. Němec, J. (2006). Voda v České republice. Praha: Consult. 256 s. ISBN 80-903482-1-1.
121. Němec, J. (2009). Půda v České republice. Praha: Consult. 256 s. ISBN 80-903482-4-6.
122. Ng, W. L. a Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. ASM Science Journal, 9(1), 30-39.
123. Notteghem, P. (1999). *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851): une nouvelle espèce de *Bryozoaires* pour la Bourgogne. Revue périodique de la Physiophile, 74(131), 12-25.
124. Oda, S. (1974). *Pectinatella magnifica* occurring in Lake Shoji, Japan. Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology, 10, 31-39.
-

- 
125. Oda, S. a Mukai, H. (1985). Fine surface structure of the statoblasts of higher phylactolaemate bryozoans. *Bryozoa: Ordovician to Recent*. Fredensborg: Olsen a Olsen, 244 s.
126. Oka, A. 1891. Observations on fresh-water *Polyzoa*. Journal of College of Science, Imperial university Japan, Vol. 4.
127. Okamura, B. a Wood, T. (2002). Bryozoans as hosts for *Tetracapsula bryosalmonae*, the PKX organism. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), 469-475.
128. Okuyama, M., Wada, H., a Ishii, T. (2006). Phylogenetic relationships of freshwater bryozoans (*Ectoprocta*, *Phylactolaemata*) inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Zoologica Scripta*, 35(3), 243-249.
129. O'Malley, D. M. a Whetten, R. (1997). Molecular markers and forest trees. DNA markers. In: Caetano-Anollés G., Gresshoff, PM (Eds.), *Protocols and verviews*, 237-257.
130. 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.
131. Osborn, A. M., a Smith, C. J. (2005). *Molecular microbial ecology*. New York: Garland Science, 256 s., ISBN 1859962831.
132. Osburn, R. C. (1921). Bryozoa as food for other animals. *Science*, 53(1376), 451-453.
133. Ouellette, B. F., a Baxevanis, A. (Eds. ). (2001). *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*. John Wiley
134. Pardue, W. a 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.
135. Pechar, L. (2000). Impact of long-term changes in fishery management on the trophic level water quality in Czech fish ponds. *Fisheries Management and Ecology* 7: 23-31.
136. Peng, C. K., Buldyrev, S. V., Havlin, S., Simons, M., Stanley, H. E., a Goldberger, A. L. (1994). Mosaic organization of DNA nucleotides. *Physical review e*, 49(2), 1685.
137. Perlín, R., Kučerová, S., a Kučera, Z. (2010). Typologie venkovského prostoru Česka. *Geografie*, 115(2), 161-187.
-

- 
138. Pokorný, J. a Kučerová, A. (2000). Monitoring klimatu a atmosférických depozic v CHKO Třeboňsko. In: Pokorný, et al., Třeboňsko 2000. Ekologie a ekonomika Trebonska po dvaceti letech. Třeboň: UNESCO a ENKI, 87-99.
139. Powell, W., et al. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225-238.
140. Pradeep Reddy, M., Sarla, N., a Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *euphytica*, 128(1), 9-17.
141. Proud, V. K. (1969). The pattern of RNA synthesis in dormant and germinating statoblasts of *Pectinatella magnifica*
142. Quitt, E. (1971). Klimatické oblasti ČSSR. Brno: Studia geographica, 150 s.
143. Rademaker, J., et al. (1997). DNA markers: protocols, applications, and overviews, Hoboken: Willey, 360 s., ISBN 978-0-471-16067-0.
144. Rasmusson, D. a Phillips, R. (1997). Plant breeding progress and genetic diversity from de novo variation and elevated epistasis. *Crop Science*, 37(2), 303-310.
145. Ricciardi, A. 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.
146. Ricciardi, A. 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.
147. Richardson, A. J., Narendran, N., Guymer, R. H., Vu, H., a Baird, P. N. (2006). Blood storage at 4 C—factors involved in DNA yield and quality. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 147(6), 290-294.
148. Rodriguez, S. a 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.
149. Rogstad, S. H. (1992). Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon*, 41(4), 701-708.
150. Roudná, M. a Dotlačil, L. (2007). Genetické zdroje-význam, využívání a ochrana. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 28 s., ISBN 8072124692.
-

- 
151. Rubini, A., Pieroni, G., Elia, A. C., Zippilli, L., Paolocci, F., a Taticchi, M. I. (2011). Novel morphological and genetic tools to discriminate species among the family *Plumatellidae* (*Phylactolaemata*, *Bryozoa*). *Hydrobiologia*, 664(1), 81-93.
152. Samoo, I. T., Khatri, P., Bhutto, B., Tariq, M., Chandio, I., Soomro, M., a Shams, S. (2017). Effect of temperature and storage time on DNA quality and quantity from normal and diseased tissues. *Journal of Basic a Applied Sciences*, 13, 203-206.
153. Selänpää, T. (2022). Kunnallisen vieraslajityön kehittäminen: Lempäälän kunnan vieraslajiohjelma.
154. Şerban, C. (2014). Observations on the occurrence of *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) species (Phylum *Bryozoa*) in Romania. In *Sustainable use and protection of animal world diversity*: (pp. 175-176).
155. Schachanowskaja, J. 1929. *Pectinatella magnifica* Leidy in Böhmen. *Zoologischer Anzeiger*, 80, 296-301.
156. Schwaha, T., a Bauder, J. A. (2021). The freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in the Austrian Danube: first evidence in the Upper Danube basin. *BioInvasions Record*, 10(2).
157. Simionov, I. A., Călmuc, M., Antache, A., Călmuc, V., Petrea, Ş. M., Aurelia, N. I. C. A., a Neculiţă, M. (2022) The use of *Pectinatella magnifica* as bioindicator for heavy metals pollution in Danube delta. *Scientific Papers. Series E. Land Reclamation, Earth Observation & Surveying, Environmental Engineering*. Vol. XI, 181-186
158. Slatkin, M. (1977). Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinctions. *Theoretical population biology*, 12(3), 253-262.
159. Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39(1), 53-65.
160. Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803), 787-792.
161. Sršeň, Š. a Sršňová, K. (2000). *Základy klinickéj genetiky a jej molekulárna podstata*. Bratislava: Osveta, 2000. ISBN 8080630216.
162. Starunova, Z. I., Shunkina, K. V., Genelt-Yanovsky, E. A., Kucheryavyy, A. V., Polyakova, N. V., Danilova, Y. A., a Zaitseva, O. V. (2021). First record of the freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica* in north-west Russia with a description of sensory structures.
-

- 
163. Svoboda, J. (1964). Regionální geologie ČSSR. Praha: Ústřední ústav geologický, 205 s.
164. Svoboda, J. a Beneš, K. (1964). Regionální geologie ČSSR. Praha: Československá akademie věd. 543 s.
165. Szekeres, J., Akác, A., a Csányi, B. (2013). First record of *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851) in Hungary. Water Research and Management, 3(4), 35-40.
166. Šatkauskienė, I., Wood, T., Rutkauskaitė-Sucilienė, J., Mildažienė, V., a Tučkutė, S. (2018). Freshwater bryozoans of Lithuania (*Bryozoa*). ZooKeys, (774), 53.
167. Šetlíková, I., Balounová, Z., Lukavský, J., a Rajchard, J. (2005). Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku [A non-native Bryozoan species found in the Třeboň basin]. Živa, 4, 172-174.
168. Šetlíková, I., Skácelová, O., Šinko, J., Rajchard, J., a Balounová, Z. (2013). Ecology of *Pectinatella magnifica* and associated algae and cyanobacteria. Biologia, 68(6), 1136-1141.
169. Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-876728-2
170. Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., a Bonierbale, M. W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Biotechnology, 7(3), 257-264.
171. Taticchi, M. I., Battoe, L., Elia, A. C., & Havens, K. E. (2011). Freshwater bryozoa (*Phylactolaemata*) from central Florida lakes. Florida Scientist, 238-252.
172. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. (2015). Nano Drop products T009 – Technical Bulletin, 260/280 and 260/230 Ratios, ISBN 3024797707
173. Tlapák, V., Šálek, J., Legát, V. (1992). Voda v zemědělské krajině. Praha: Brázda, 318 s., ISBN 8020902325.
174. Todorov, M., Kenderov, M., Botev, I., Hubenov, Z., a Trichkova, T. (2020). First records of *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) (*Bryozoa: Plumatellida: Pectinatellidae*) in the Bulgarian shoreline zone of the Danube River. Acta Zool. Bulg, 72, 507-515.
-

- 
175. Trichkova, T., Todorov, M., Kenderov, M., Hubenov, Z., Botev, I., Stefanov, T., Geogiev, D., Jurajda, P. (2022). Invasive Alien Species of Benthic Macroinvertebrates and Fish in the Bulgarian Sector of the Danube River—Results of the Joint Danube Survey 4 (JDS4). *Water*, 14.15: 2299
176. Vinogradov, A.V. (2011). *Phylactolaemata* and *Bryozoa* in continental water bodies of Eurasia. Volume 2. Systematics of the Covered *Phylactolaemata* and naked bryozoans *Bryozoa* of continental water bodies of Eurasia. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, 397 pp
177. Vlková, E., Killer, J., Kmet', V., Rada, V., Musilová, Š., Bunešová, V., Hovorková, P., Božik, M., Salmonová, H., Rajchard, J. (2015). Identification of microbiota associated with *Pectinatella magnifica* in South Bohemia. *Biologia*, 70(3), 365-371.
178. Vorel, A. V. I. A. I. (2009). Studie vyhodnocení krajinného rázu dle §12 Zákona 114/1992 Sb. O ochraně přírody a krajiny na území Jihočeského kraje. České Budějovice. 178 s.
179. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., a Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
180. Vuorio, K., Kanninen, A., Mitikka, S., Sarkkinen, M., a Hämäläinen, H. (2018). Invasion of Finnish inland waters by the alien moss animal *Pectinatella magnifica* Leidy, 1851 and associated potential risks. *Management of Biological Invasions*, 9.
181. Waeschenbach, A., Cox, C. J., Littlewood, D. T. J., Porter, J. S., a 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.
182. Waeschenbach, A., Taylor, P. D., a Littlewood, D. T. J. (2012). A molecular phylogeny of bryozoans. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(2), 718-735.
183. Wang, B., Wang, H., a Cui, Y. (2017). *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) (*Bryozoa*, *Phylactolaemata*), a biofouling bryozoan recently introduced to China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(4), 815-820.
184. Wang, J. B. (2002). ISSR markers and their applications in plant genetics. *Yi Chuan= Hereditas*, 24(5), 613-616.
-

- 
185. Welsh, J., Honeycutt, R. J., McClelland, M., a Sobral, B. W. S. (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, 82(4), 473-476.
186. Wilcox, A. W. (1906). Locomotion in young colonies of *Pectinatella magnifica*. *The Biological Bulletin*, 11(5), 245-252.
187. Williams, S. R. (1921). Concerning" larval" colonies of *Pectinatella*. *The Ohio Journal of Science*, 21(4), 123-127.
188. Wood, T. (2001a). Freshwater bryozoans: a zoogeographical reassessment. *Bryozoan studies*, 21, 339-345.
189. Wood, T. S. (1989). *Ectoproct* bryozoans of Ohio. Ohio: College of Biological Sciences, Ohio State University, 70 s., ISBN 0867271051.
190. 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.
191. Wood, T. S., (2001c). Bryozoans. In: Thorp, J., Covich, J., (eds) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrate*, (Second Edition). Academic Press, 505–525
192. 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.
193. Wood, T. S., Anurakpongsatorn, P., A Mahujchariyawong, J. (2006). Freshwater bryozoans of Thailand (*Ectoprocta* and *Entoprocta*). *Tropical Natural History*, 6(2), 83-119.
194. Wood, T. S., a Okamura, B. (2004). *Plumatella geimermassardi*, a newly recognized freshwater bryozoan from Britain, Ireland, and continental Europe (*Bryozoa: Phylactolaemata*). *Hydrobiologia*, 518(1), 1-7.
195. Wood, T. S. a Wood, L. J. (2000). Statoblast morphology in historical specimens of phylactolaemate bryozoans. *Proceedings of the 11th International Bryozoology Association Conference*, 421-430.
196. Wöss, E. R. (2014). *Pectinatella magnifica* (LEIDY, 1851) (*Bryozoa: Phylactolaemata*) im nördlichen Waldviertel – zur Problematik aquatischer Neobiota in Österreich. *Denisia* 33, 351-366.
-

- 
197. Wöss, E. R. (2005). The distribution of freshwater bryozoans in Austria. In *Bryozoan Studies 2004* (pp. 369-374). AA Balkema Publishers Leiden, London, New York, Philadelphia, Singapore.
198. Zetsche, H., Klenk, H. P., Raubach, M. J., Knebelsberger, T., Gemeinholzer, B., Gradstein, R., a Wilson, R. (2008). Comparison of methods and protocols for routine DNA extraction in the DNA Bank Network. Gradstein R, Klatt S, Normann F, Weigelt P Willmann R, Wilson R, 354.
199. Zorić, K., Szekeres, J., Csanyi, B., Kolarević, S., Marković, V., a Paunović, M. (2015). Distribution of the non-native bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in the Danube River. *Acta Zool Bulg*, 67, 241-7.
200. Zrzavý, J. (2006). *Fylogeneze živočišné říše*. Scientia, 156 s., ISBN 9788086960081

---

## Seznam internetových zdrojů

1. Centre Nature Les Cerlatez. (2012) *Pectinatella magnifica*, une drole de créature dals l'étang de la Gruere. Dostupné z: <http://www.centre-cerlatez.ch/petinatella-magnifica>, [cit. 2022-09-11].
2. Český hydrometeorologický ústav (2022). Dostupné z: (<https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/denni-data/Denni-data-dle-z.123-1998-Sb#>), [cit. 2022-06-05].
3. Český statistický úřad, Krajská správa ČSÚ v Českých Budějovicích, Obyvatelstvo (2022). Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/xc/obyvatelstvo-xc>, [cit. 2022-05-03].
4. The Global Biodiversity Information Facility (GBIF. org) (2022). Dostupné z: <https://www.gbif.org> [cit. 2022-10-21]
5. National center for biotechnology information. (2022). Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [cit. 2022-08-13]
6. OID Kanton Luzern. (2012) Moostrierchen im Rotsee. Umwelt und Energie, Kanton Luzern. Dostupné z: [http://www.uwe.lu.ch/frei/index/themen/gewaesser/fliessgewaesser\\_und\\_seen/rotsee/uwe-moosrierchen.htm](http://www.uwe.lu.ch/frei/index/themen/gewaesser/fliessgewaesser_und_seen/rotsee/uwe-moosrierchen.htm), [cit. 2022-09-11]
7. Research Gate (2022). Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Steps-of-the-ISSR-technique\\_fig3\\_286231355](https://www.researchgate.net/figure/Steps-of-the-ISSR-technique_fig3_286231355)), [cit. 2022-11-01].

---

## Seznam obrázků

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 1.1: Kolonie <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                             | 12 |
| Obrázek 1.2: Roseta <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                              | 13 |
| Obrázek 1.3: Zooid <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                               | 14 |
| Obrázek 1.4: Statoblasty <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                         | 17 |
| Obrázek 1.5: Statoblast <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                          | 17 |
| Obrázek 1.6: Rozšíření <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                           | 26 |
| Obrázek 3.1: Mapa lokalit jižní Čechy .....                                                          | 36 |
| Obrázek 3.2: Pozice meteorologické stanice Třeboň-Lužnice.....                                       | 40 |
| Obrázek 3.3: Spektrofotometr BioSpec Nano.....                                                       | 42 |
| Obrázek 3.4: Shluk statoblastů.....                                                                  | 44 |
| Obrázek 4.1: Průběh vývoje množství kolonií.....                                                     | 53 |
| Obrázek 4.2: Průběh průměrných teplot Třeboňsko .....                                                | 55 |
| Obrázek 4.3: Vývoj kolonií v závislosti na průměrné teplotě.....                                     | 56 |
| Obrázek 4.4: Průběh maximálních teplot Třeboňsko.....                                                | 57 |
| Obrázek 4.5: Vývoj kolonií v závislosti na maximální teplotě.....                                    | 58 |
| Obrázek 4.6: Průběh průměrných srážek Třeboňsko .....                                                | 59 |
| Obrázek 4.7: Průběh dní bez srážek Třeboňsko .....                                                   | 59 |
| Obrázek 4.8: Vývoj kolonií v závislosti na množství srážek .....                                     | 61 |
| Obrázek 4.9: Vývoj kolonií v závislosti na počtu dní bez srážek .....                                | 61 |
| Obrázek 4.10: Výsledek analýzy pomocí spektrofotometru BioSpec Nano.....                             | 72 |
| Obrázek 4.11: Výsledek analýzy 28 S rRNA .....                                                       | 73 |
| Obrázek 4.12: Vliv stáří vzorku na koncentraci DNA .....                                             | 74 |
| Obrázek 4.13: Vliv stáří vzorku na kvalitu DNA .....                                                 | 75 |
| Obrázek 4.14: Vliv mrazu na koncentraci DNA .....                                                    | 76 |
| Obrázek 4.15: Vliv mrazu na čistotu DNA .....                                                        | 77 |
| Obrázek 4.16: Kontrolní měření výsledků preamplifikace fragmentů – zvýraznění produktu .....         | 79 |
| Obrázek 4.17: Kontrolní měření výsledků preamplifikace fragmentů.....                                | 79 |
| Obrázek 4.18: Kontrolní měření výsledků selektivní amplifikace fragmentů .....                       | 80 |
| Obrázek 4.19: Kontrolní měření výsledků selektivní amplifikace fragmentů – zvýraznění produktu ..... | 81 |

---

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 4.20: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – celkový popis, pozice vzorků..... | 83 |
| Obrázek 4.21: Rozložení polymorfních fragmentů – celkový .....                                | 84 |
| Obrázek 4.22: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – celkové .....                  | 85 |
| Obrázek 4.23: Výsledky shlukovací analýzy – celkové.....                                      | 85 |
| Obrázek 4.24: Mapa – pískovna Cep I.....                                                      | 87 |
| Obrázek 4.25: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – pískovna Cep I .....              | 87 |
| Obrázek 4.26: Rozložení polymorfních fragmentů – pískovna Cep I .....                         | 88 |
| Obrázek 4.27: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – pískovna Cep I .               | 88 |
| Obrázek 4.28: Výsledky shlukovací analýzy – pískovna Cep I.....                               | 89 |
| Obrázek 4.29: Mapa – rybník Hejtman.....                                                      | 90 |
| Obrázek 4.30: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Hejtman .....              | 90 |
| Obrázek 4.31: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Hejtman .....                         | 91 |
| Obrázek 4.32: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Hejtman                 | 91 |
| Obrázek 4.33: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Hejtman.....                               | 92 |
| Obrázek 4.34: Mapa – vodní dílo Kořensko .....                                                | 93 |
| Obrázek 4.35: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – vodní dílo Kořensko .....         | 93 |
| Obrázek 4.36: Rozložení polymorfních fragmentů – vodní dílo Kořensko.....                     | 94 |
| Obrázek 4.37: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – vodní dílo Kořensko .....      | 94 |
| Obrázek 4.38: Výsledky shlukovací analýzy – vodní dílo Kořensko .....                         | 95 |
| Obrázek 4.39: Mapa – vodní nádrž Lipno I .....                                                | 96 |
| Obrázek 4.40: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – vodní nádrž Lipno I.....          | 96 |
| Obrázek 4.41: Rozložení polymorfních fragmentů – vodní nádrž Lipno I.....                     | 97 |
| Obrázek 4.42: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – vodní nádrž Lipno I.....       | 97 |
| Obrázek 4.43: Výsledky shlukovací analýzy – vodní nádrž Lipno I.....                          | 98 |
| Obrázek 4.44: Mapa – rybník Nový Hospodář .....                                               | 99 |
| Obrázek 4.45: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Nový Hospodář .....        | 99 |
| Obrázek 4. 46: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Nový Hospodář.....                   | 99 |

---

---

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Obrázek 4.47: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Nový Hospodář ..... | 100 |
| Obrázek 4.48: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Nový Hospodář .....                    | 101 |
| Obrázek 4.49: Mapa – rybník Nový Kanclíř.....                                             | 102 |
| Obrázek 4.50: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Nový Kanclíř.....      | 102 |
| Obrázek 4.51: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Nový Kanclíř .....                | 103 |
| Obrázek 4.52: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Nový Kanclíř.....   | 103 |
| Obrázek 4.53: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Nový Kanclíř.....                      | 104 |
| Obrázek 4.54: Mapa – rybník Podřezanský .....                                             | 105 |
| Obrázek 4.55: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Podřezanský .....      | 105 |
| Obrázek 4.56: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Podřezanský.....                  | 105 |
| Obrázek 4.57: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Podřezanský .....   | 106 |
| Obrázek 4.58: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Podřezanský .....                      | 107 |
| Obrázek 4.59: Mapa – rybník Staňkovský.....                                               | 108 |
| Obrázek 4.60: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Staňkovský .....       | 108 |
| Obrázek 4.61: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Staňkovský.....                   | 109 |
| Obrázek 4.62: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Staňkovský.....     | 109 |
| Obrázek 4.63: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Staňkovský.....                        | 110 |
| Obrázek 4.64: Mapa – rybník Vápenský .....                                                | 111 |
| Obrázek 4.65: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – rybník Vápenský. ....         | 111 |
| Obrázek 4.66: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Vápenský .....                    | 112 |
| Obrázek 4.67: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Vápenský.....       | 112 |
| Obrázek 4.68: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Vápenský .....                         | 113 |
| Obrázek 4.69: Mapa – pískovna Veselí I. ....                                              | 114 |
| Obrázek 4.70: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – pískovna Veselí I .....       | 114 |
| Obrázek 4.71: Rozložení polymorfních fragmentů – pískovna Veselí I.....                   | 115 |

---

---

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Obrázek 4.72: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – pískovna Veselí I ..... | 115 |
| Obrázek 4.73: Výsledky shlukovací analýzy – pískovna Veselí I .....                    | 116 |
| Obrázek 4.74: Mapa – pískovna Vlkov .....                                              | 117 |
| Obrázek 4.75: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – pískovna Vlkov ...         | 117 |
| Obrázek 4.76: Rozložení polymorfních fragmentů – pískovna Vlkov .....                  | 118 |
| Obrázek 4.77: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – pískovna Vlkov .....    | 118 |
| Obrázek 4.78: Výsledky shlukovací analýzy – pískovna Vlkov .....                       | 119 |
| Obrázek 4.79: Mapa – Vltava – Lužnice .....                                            | 120 |
| Obrázek 4.80: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – Vltava–Lužnice ...         | 120 |
| Obrázek 4.81: Rozložení polymorfních fragmentů – Vltava-Lužnice .....                  | 121 |
| Obrázek 4.82: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů Vltava–Lužnice .....      | 121 |
| Obrázek 4.83: Výsledky shlukovací analýzy – Vltava–Lužnice .....                       | 122 |
| Obrázek 4.84: Mapa – rybník Vydymač .....                                              | 123 |
| Obrázek 4.85: Vizualizace kompletního DNA fingerprintingu – Vydymač .....              | 123 |
| Obrázek 4.86: Rozložení polymorfních fragmentů – rybník Vydymač .....                  | 124 |
| Obrázek 4.87: Procentuální zastoupení polymorfních fragmentů – rybník Vydymač .....    | 124 |
| Obrázek 4.88: Výsledky shlukovací analýzy – rybník Vydymač .....                       | 125 |
| Obrázek 4.89: Gelová elektroforéza pro ISSR UBC 825 .....                              | 127 |
| Obrázek 4.90: Gelová elektroforéza pro ISSR UBC 881 .....                              | 128 |
| Obrázek 4.91: Gelová elektroforéza pro ISSR UBC 890 .....                              | 128 |
| Obrázek 4.92: Gelová elektroforéza pro teplotní gradient ISSR UBC 825 a UBC 881 .....  | 129 |
| Obrázek 4.93: Gelová elektroforéza pro teplotní gradient ISSR UBC 890 .....            | 129 |

---

---

## Seznam tabulek

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabulka 1.1: Fylogenetické zařazení <i>Pectinatella magnifica</i> (Komárek, 1952)..... | 11 |
| Tabulka 3.1: Seznam lokalit s odběrem vzorků druhu <i>Pectinatella magnifica</i> ..... | 37 |
| Tabulka 4.1: Výsledky izolace DNA .....                                                | 62 |

---

## Seznam použitých zkratek

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

BR – Biosférická rezervace

COI – Cytochrome oxidáza I

CTAB – PVP – Cetyl trimethylamonium bromide polyvinyl pyrrolidone

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

Et OH – Etanol

CHKO – Chráněná krajinná oblast

ISSR – Inter simple sequence repeat

ITS – Internal transcribed spacer

PCR – Polymerázová řetězová reakce

rRNA – Ribozomální ribonukleová kyselina

RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism,

SSR – Simple Sequence Repeats

UPGMA – Metoda neváženého párování s aritmetickým průměrem (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

---

## Seznam příloh

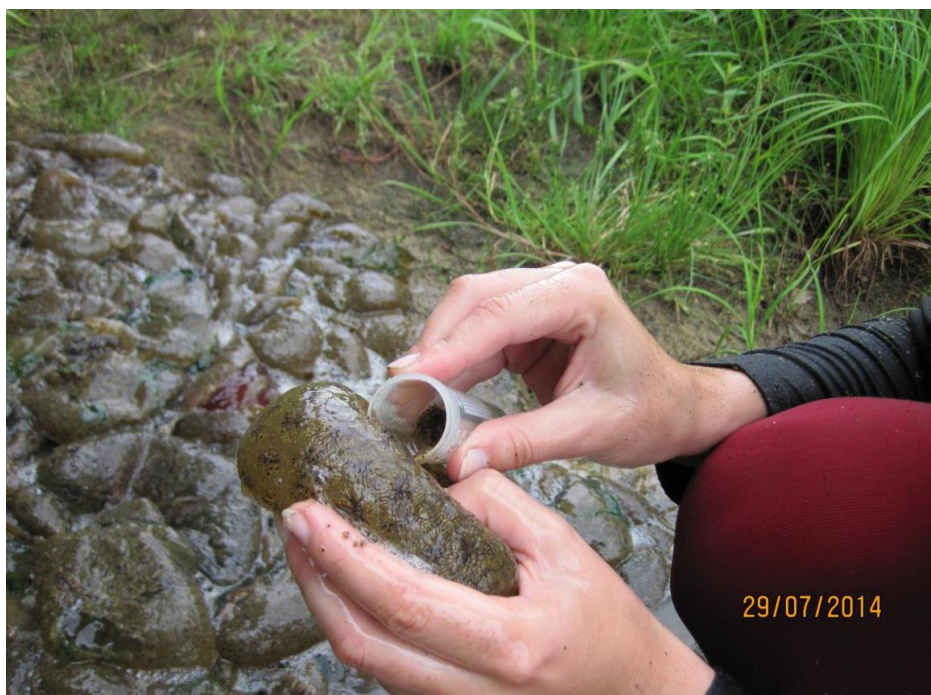
|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Příloha 1. Sběr vzorků <i>Pectinatella magnifica</i> z kolonie .....                                                        | 168 |
| Příloha 2. Odebrané kolonie <i>Pectinatella magnifica</i> .....                                                             | 168 |
| Příloha 3. Očistěné kolonie <i>Pectinatella magnifica</i> připravené pro izolaci DNA, vlevo zooidy, vpravo statoblasty..... | 169 |
| Příloha 4: Výsledky srovnání izolačních metod koncentrace DNA.....                                                          | 169 |
| Příloha 5: Výsledky srovnání izolačních metod kvalita (OD260/280) DNA .....                                                 | 170 |
| Příloha 6: Výsledky srovnání izolačních metod kvalita (OD260/230) DNA .....                                                 | 170 |
| Příloha 7: Výsledky fragmentační analýzy AFLP pro jednotlivé primerové kombinace .....                                      | 171 |
| Příloha 8. Původní výsledky pilotní studie pro stanovení genetické diverzity kolonií <i>Pectinatella magnifica</i> .....    | 171 |
| Příloha 9. Odečet amplifikovaných fragmentů .....                                                                           | 172 |
| Příloha 10. Gelovitá matrix o tuhé struktuře.....                                                                           | 172 |
| Příloha 11. Množství polymorfních fragmentů – pískovna Cep I.....                                                           | 173 |
| Příloha 12. Množství polymorfních fragmentů – rybník Hejtman.....                                                           | 174 |
| Příloha 13. Množství polymorfních fragmentů – vodní dílo Kořensko .....                                                     | 175 |
| Příloha 14. Množství polymorfních fragmentů – vodní nádrž Lipno I.....                                                      | 175 |
| Příloha 15. Množství polymorfních fragmentů – rybník Nový Hospodář.....                                                     | 176 |
| Příloha 16. Množství polymorfních fragmentů – rybník Nový Kanclíř .....                                                     | 176 |
| Příloha 17. Množství polymorfních fragmentů – rybník Podřezanský .....                                                      | 177 |
| Příloha 18. Množství polymorfních fragmentů – rybník Staňkovský.....                                                        | 178 |
| Příloha 19. Množství polymorfních fragmentů – rybník Vápenský .....                                                         | 178 |
| Příloha 20. Množství polymorfních fragmentů – pískovna Veselí I.....                                                        | 179 |
| Příloha 21. Množství polymorfních fragmentů – pískovna Vlkov .....                                                          | 180 |
| Příloha 22. Množství polymorfních fragmentů – Vltava .....                                                                  | 181 |
| Příloha 23. Množství polymorfních fragmentů – rybník Vydymač.....                                                           | 182 |
| Příloha 24. Schéma techniky AFLP .....                                                                                      | 183 |

---

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| Příloha 25. Schéma techniky ISSR .....                                  | 184 |
| Příloha 26. Shlukovací analýza všechny vzorky (zvětšené) .....          | 185 |
| Příloha 27. Shlukovací analýza všechny vzorky třízení dle lokalit ..... | 186 |

---

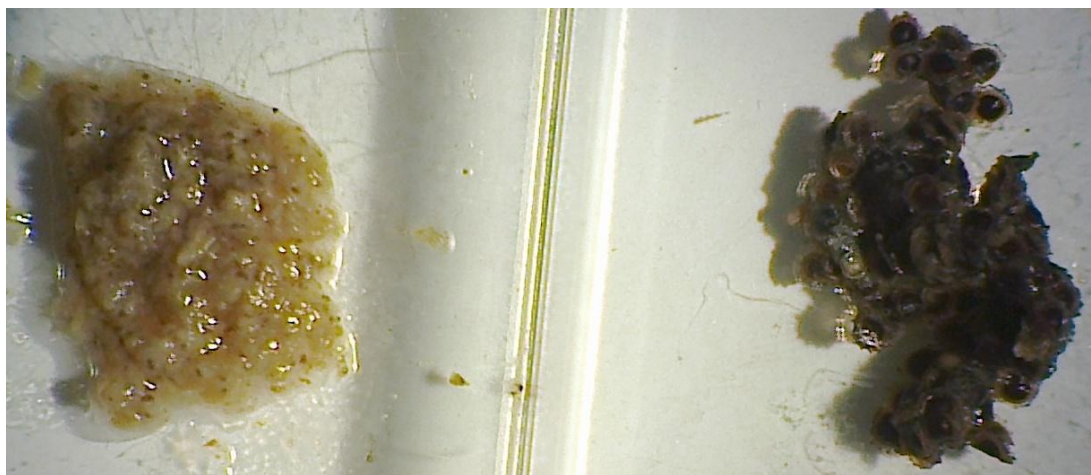
## Přílohy



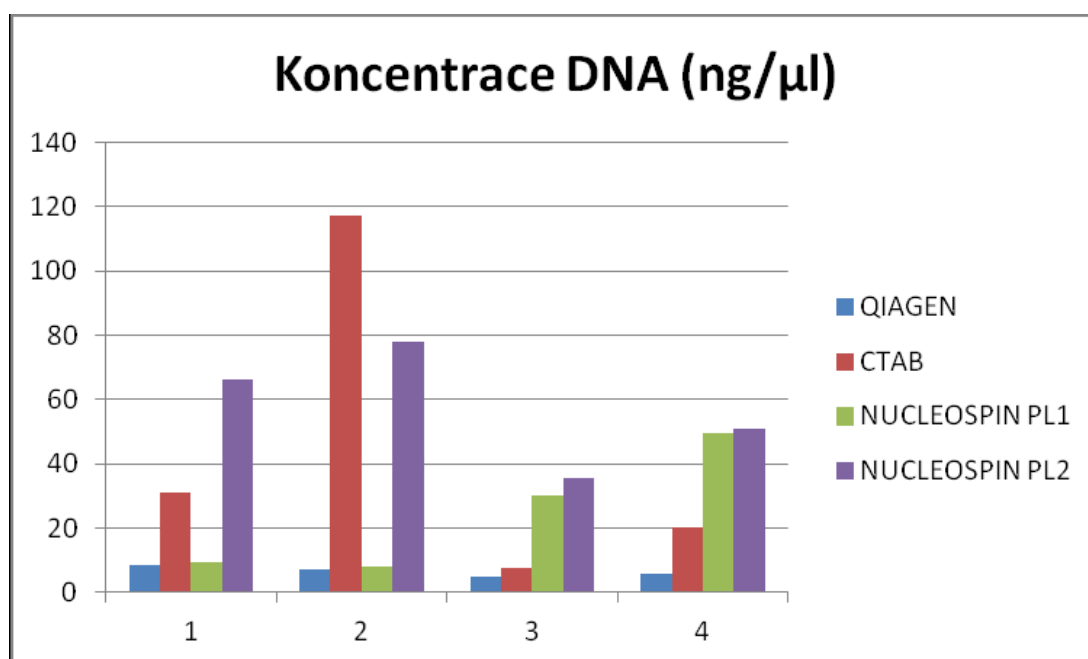
Příloha 1. Sběr vzorků *Pectinatella magnifica* z kolonie (foto: Josef Rajchard)



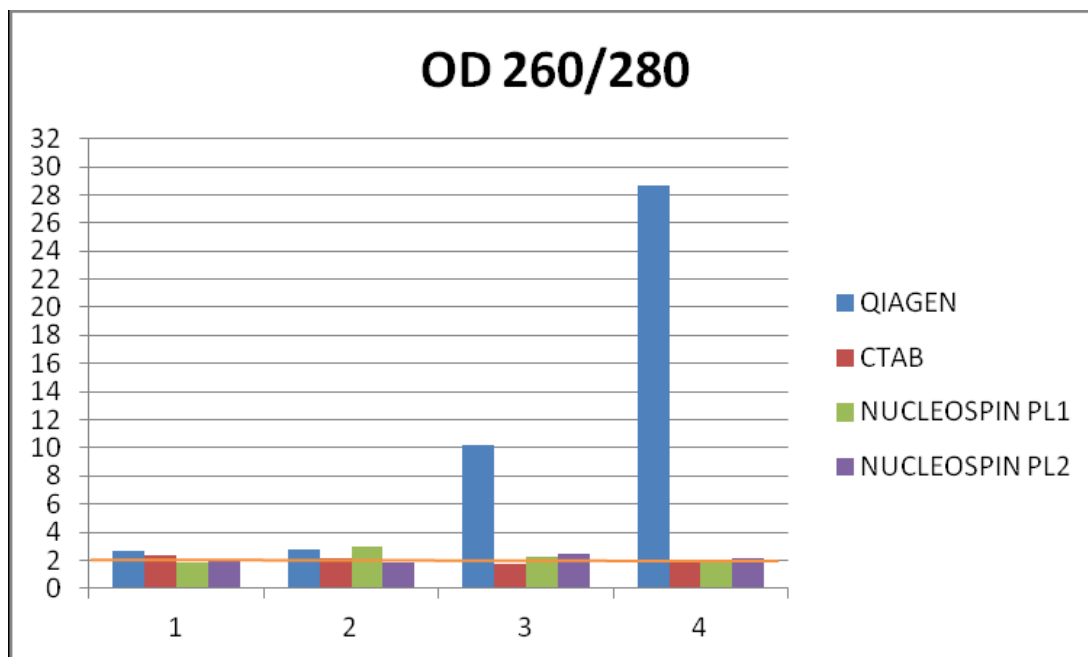
Příloha 2. Odebrané kolonie *Pectinatella magnifica* (foto: vlastní)



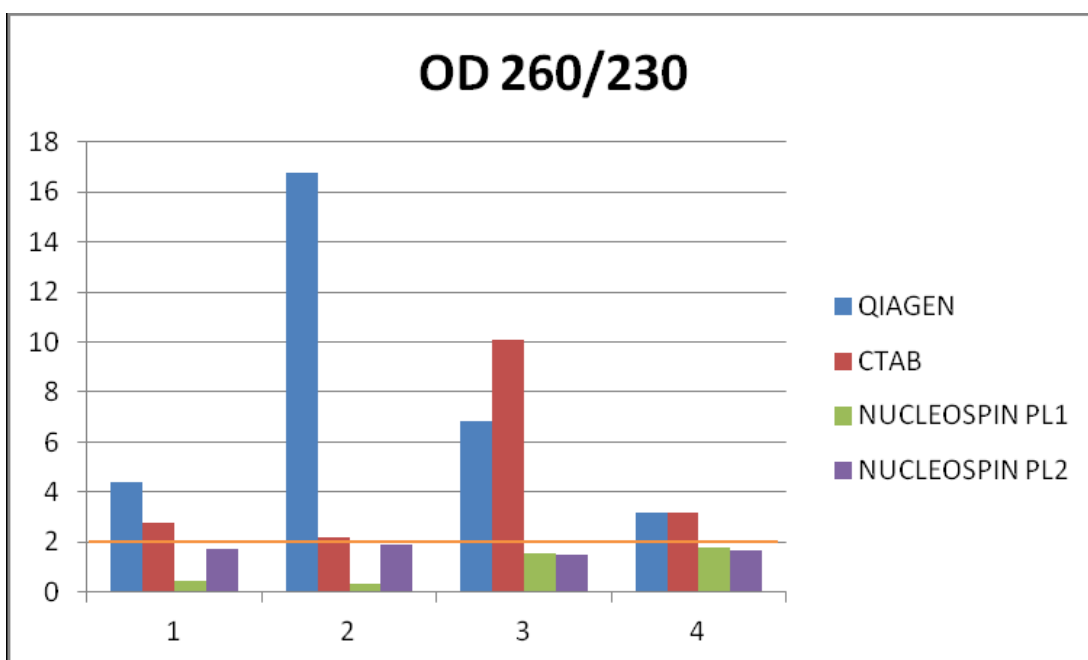
Příloha 3. Očištěné kolonie *Pectinatella magnifica* připravené pro izolaci DNA, vlevo zooidy, vpravo statoblasty (foto: vlastní)



Příloha 4: Výsledky srovnání izolačních metod koncentrace DNA (Moravcova, 2015)



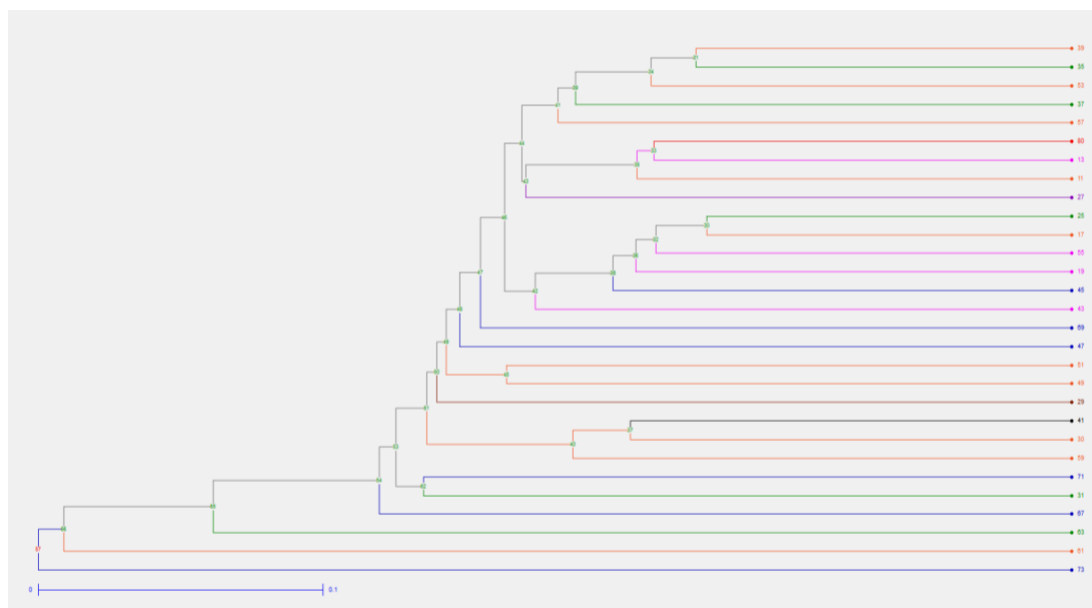
**Příloha 5: Výsledky srovnání izolačních metod kvalita (OD260/280) DNA (Moravcová, 2015)**



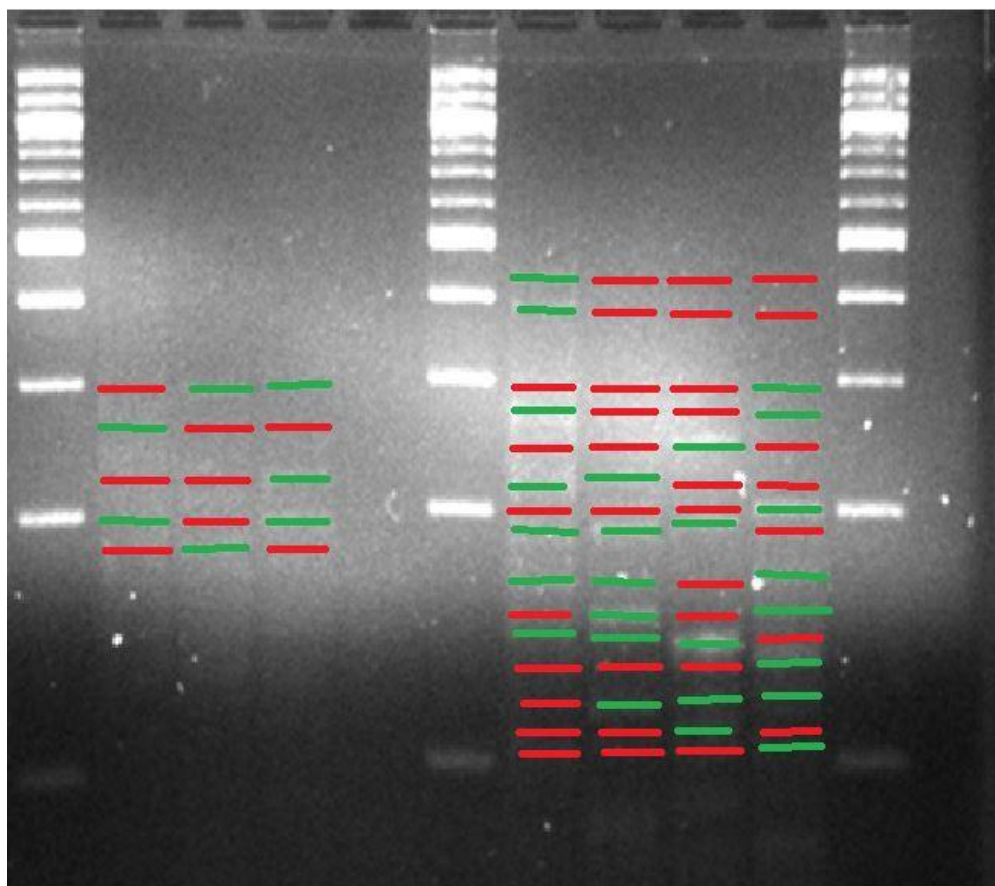
**Příloha 6: Výsledky srovnání izolačních metod kvalita (OD260/230) DNA (Moravcová, 2015)**

| 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                |

**Příloha 7: Výsledky fragmentační analýzy AFLP pro jednotlivé primerové kombinace (Moravcová, 2015)**



**Příloha 8. Původní výsledky pilotní studie pro stanovení genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica* (Moravcová, 2015)**



**Příloha 9. Odečet amplifikovaných fragmentů**



**Příloha 10. Gelovitá matrix o tuhé struktuře (Foto: Josef Rajchard)**

---

| Procentické zastoupení<br>polymorfních fragmentů - Cep |                    |
|--------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                           | Množství fragmentů |
| 11                                                     | 38,41%             |
| 12                                                     | 37,68%             |
| 13                                                     | 40,58%             |
| 14                                                     | 44,93%             |
| 15                                                     | 35,51%             |
| 82                                                     | 43,48%             |
| 83                                                     | 34,78%             |
| 84                                                     | 34,06%             |
| 85                                                     | 33,33%             |
| 86                                                     | 35,51%             |
| 87                                                     | 42,75%             |
| 88                                                     | 36,23%             |
| 131                                                    | 39,13%             |
| 132                                                    | 39,13%             |
| 133                                                    | 39,86%             |

**Příloha 11. Množství polymorfních fragmentů – pískovna Cep I**

---

| Procentické zastoupení<br>polymorfních fragmentů - Hejtman |                    |
|------------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                               | Množství fragmentů |
| 6                                                          | 31,16%             |
| 7                                                          | 40,58%             |
| 8                                                          | 40,58%             |
| 9                                                          | 43,48%             |
| 10                                                         | 42,75%             |
| 121                                                        | 48,55%             |
| 122                                                        | 36,23%             |
| 123                                                        | 37,68%             |
| 124                                                        | 31,16%             |
| 125                                                        | 42,03%             |
| 126                                                        | 35,51%             |
| 189                                                        | 32,61%             |
| 190                                                        | 42,75%             |
| 191                                                        | 39,86%             |
| 192                                                        | 34,78%             |
| 238                                                        | 40,58%             |
| 239                                                        | 37,68%             |
| 240                                                        | 36,96%             |
| 241                                                        | 33,33%             |
| 242                                                        | 39,86%             |
| 243                                                        | 35,51%             |
| 268                                                        | 38,41%             |
| 269                                                        | 35,51%             |

**Příloha 12. Množství polymorfních fragmentů – rybník Hejtman**

---

| Procentické zastoupení polymorfních fragmentů - Kořensko |                    |
|----------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                             | Množství fragmentů |
| 52                                                       | 31,88%             |
| 53                                                       | 27,54%             |
| 54                                                       | 34,06%             |
| 55                                                       | 39,86%             |
| 56                                                       | 40,58%             |
| 57                                                       | 41,30%             |
| 58                                                       | 44,93%             |
| 59                                                       | 36,96%             |
| 60                                                       | 34,78%             |
| 109                                                      | 43,48%             |
| 110                                                      | 42,03%             |
| 111                                                      | 32,61%             |
| 112                                                      | 33,33%             |
| 113                                                      | 42,75%             |
| 114                                                      | 36,96%             |
| 171                                                      | 39,86%             |
| 172                                                      | 43,48%             |
| 173                                                      | 42,03%             |
| 174                                                      | 39,13%             |
| 175                                                      | 32,61%             |

**Příloha 13. Množství polymorfních fragmentů – vodní dílo Kořensko**

| Procentické zastoupení polymorfních fragmentů - Lipno |                    |
|-------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                          | Množství fragmentů |
| 72                                                    | 38,41%             |
| 73                                                    | 42,75%             |
| 74                                                    | 38,41%             |
| 75                                                    | 37,68%             |
| 116                                                   | 35,51%             |
| 117                                                   | 40,58%             |
| 118                                                   | 34,06%             |
| 119                                                   | 34,06%             |
| 120                                                   | 42,75%             |
| 261                                                   | 34,06%             |
| 262                                                   | 39,86%             |
| 263                                                   | 34,06%             |

**Příloha 14. Množství polymorfních fragmentů – vodní nádrž Lipno I**

---

| Procentické zastoupení polymorfních fragmentů - Nový Hospodář |                    |
|---------------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                                  | Množství fragmentů |
| 47                                                            | 36,96%             |
| 48                                                            | 36,96%             |
| 49                                                            | 34,78%             |
| 50                                                            | 38,41%             |
| 51                                                            | 38,41%             |
| 176                                                           | 36,96%             |
| 177                                                           | 39,13%             |
| 178                                                           | 39,13%             |
| 179                                                           | 38,41%             |
| 180                                                           | 28,26%             |
| 181                                                           | 42,75%             |
| 256                                                           | 38,41%             |
| 257                                                           | 34,78%             |
| 258                                                           | 39,13%             |

**Příloha 15. Množství polymorfních fragmentů – rybník Nový Hospodář**

| Procentické zastoupení polymorfních fragmentů - Nový Kanclíř |                    |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                                 | Množství fragmentů |
| 21                                                           | 31,16%             |
| 22                                                           | 36,96%             |
| 23                                                           | 36,96%             |
| 24                                                           | 42,03%             |
| 25                                                           | 38,41%             |
| 127                                                          | 40,58%             |
| 128                                                          | 25,36%             |
| 129                                                          | 34,78%             |
| 130                                                          | 31,16%             |
| 197                                                          | 38,41%             |
| 198                                                          | 36,23%             |
| 199                                                          | 42,75%             |
| 200                                                          | 38,41%             |
| 201                                                          | 38,41%             |
| 202                                                          | 34,78%             |
| 228                                                          | 40,58%             |
| 229                                                          | 36,96%             |
| 230                                                          | 42,75%             |
| 231                                                          | 39,13%             |
| 232                                                          | 34,06%             |

**Příloha 16. Množství polymorfních fragmentů – rybník Nový Kanclíř**

---

| Procentické zastoupení polymorfních fragmentů - Podřezaný |                    |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                              | Množství fragmentů |
| 26                                                        | 43,48%             |
| 27                                                        | 44,93%             |
| 28                                                        | 38,41%             |
| 29                                                        | 36,96%             |
| 30                                                        | 28,99%             |
| 167                                                       | 38,41%             |
| 168                                                       | 42,03%             |
| 169                                                       | 38,41%             |
| 170                                                       | 42,03%             |
| 203                                                       | 38,41%             |
| 204                                                       | 38,41%             |
| 205                                                       | 39,13%             |
| 206                                                       | 40,58%             |
| 207                                                       | 25,36%             |
| 250                                                       | 33,33%             |
| 251                                                       | 40,58%             |
| 252                                                       | 34,78%             |
| 253                                                       | 35,51%             |
| 254                                                       | 39,13%             |
| 255                                                       | 30,43%             |
| 270                                                       | 45,65%             |

**Příloha 17. Množství polymorfních fragmentů – rybník Podřezanský**

---

| Procentické zastoupení<br>polymorfních fragmentů - Staňkov |                    |
|------------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                               | Množství fragmentů |
| 16                                                         | 34,06%             |
| 17                                                         | 40,58%             |
| 18                                                         | 36,23%             |
| 19                                                         | 39,86%             |
| 20                                                         | 31,16%             |
| 76                                                         | 41,30%             |
| 77                                                         | 41,30%             |
| 78                                                         | 32,61%             |
| 79                                                         | 34,78%             |
| 80                                                         | 39,86%             |
| 81                                                         | 42,03%             |
| 208                                                        | 37,68%             |
| 209                                                        | 38,41%             |
| 210                                                        | 29,71%             |
| 211                                                        | 34,06%             |
| 233                                                        | 40,58%             |
| 234                                                        | 39,13%             |
| 235                                                        | 34,06%             |
| 236                                                        | 36,23%             |
| 237                                                        | 36,23%             |
| 259                                                        | 37,68%             |
| 260                                                        | 33,33%             |

**Příloha 18. Množství polymorfních fragmentů – rybník Staňkovský**

| Procentické zastoupení polymorfních<br>fragmentů - Vápenský |                    |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                                | Množství fragmentů |
| 42                                                          | 39,86%             |
| 43                                                          | 34,78%             |
| 44                                                          | 38,41%             |
| 45                                                          | 42,75%             |
| 46                                                          | 39,13%             |
| 185                                                         | 34,78%             |
| 186                                                         | 41,30%             |
| 187                                                         | 39,86%             |
| 188                                                         | 30,43%             |

**Příloha 19. Množství polymorfních fragmentů – rybník Vápenský**

---

| Procentické zastoupení<br>polymorfních fragmentů - Veselí I. |                    |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                                 | Množství fragmentů |
| 1                                                            | 34,06%             |
| 2                                                            | 34,78%             |
| 3                                                            | 44,20%             |
| 4                                                            | 39,13%             |
| 5                                                            | 50,72%             |
| 66                                                           | 36,96%             |
| 67                                                           | 37,68%             |
| 68                                                           | 36,23%             |
| 69                                                           | 36,96%             |
| 70                                                           | 34,06%             |
| 71                                                           | 39,86%             |
| 212                                                          | 39,13%             |
| 213                                                          | 31,88%             |
| 214                                                          | 40,58%             |
| 215                                                          | 38,41%             |
| 216                                                          | 44,20%             |
| 217                                                          | 40,58%             |
| 218                                                          | 26,81%             |
| 219                                                          | 39,86%             |
| 220                                                          | 36,23%             |
| 264                                                          | 33,33%             |
| 265                                                          | 39,13%             |
| 266                                                          | 39,13%             |
| 267                                                          | 35,51%             |

**Příloha 20. Množství polymorfních fragmentů – pískovna Veselí I.**

---

| Procentické zastoupení<br>polymorfních fragmentů - Vlkov |                    |
|----------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                             | Množství fragmentů |
| 33                                                       | 33,33%             |
| 34                                                       | 36,23%             |
| 35                                                       | 42,03%             |
| 36                                                       | 32,61%             |
| 148                                                      | 40,58%             |
| 149                                                      | 46,38%             |
| 150                                                      | 26,09%             |
| 151                                                      | 36,23%             |
| 152                                                      | 39,13%             |
| 153                                                      | 34,78%             |
| 154                                                      | 39,86%             |
| 155                                                      | 40,58%             |
| 156                                                      | 26,81%             |
| 157                                                      | 30,43%             |
| 158                                                      | 34,06%             |
| 159                                                      | 40,58%             |
| 160                                                      | 38,41%             |
| 161                                                      | 39,13%             |
| 162                                                      | 30,43%             |
| 163                                                      | 34,78%             |
| 164                                                      | 41,30%             |
| 165                                                      | 39,13%             |
| 221                                                      | 37,68%             |
| 222                                                      | 36,96%             |
| 223                                                      | 34,78%             |
| 224                                                      | 34,78%             |
| 225                                                      | 44,20%             |
| 226                                                      | 29,71%             |
| 227                                                      | 36,23%             |

**Příloha 21. Množství polymorfních fragmentů – pískovna Vlkov**

---

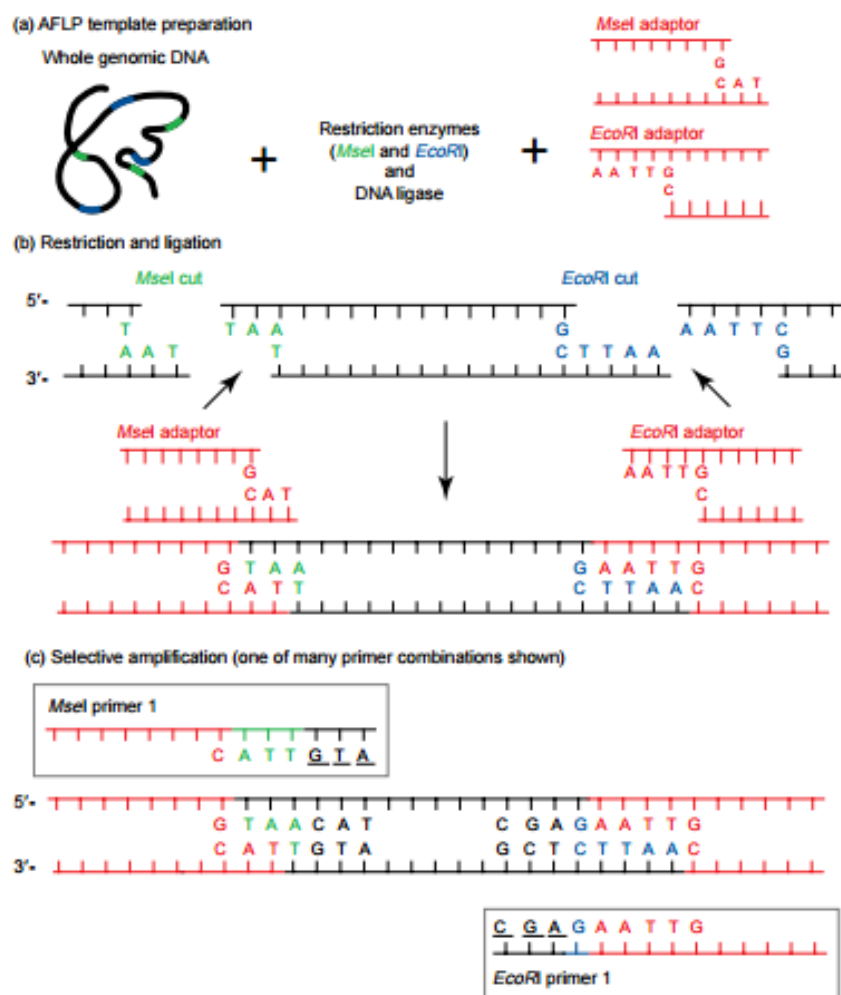
| Procentické zastoupení<br>polymorfních fragmentů - Vltava |                    |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                              | Množství fragmentů |
| 61                                                        | 32,61%             |
| 62                                                        | 39,86%             |
| 63                                                        | 38,41%             |
| 64                                                        | 37,68%             |
| 65                                                        | 39,86%             |
| 89                                                        | 42,03%             |
| 90                                                        | 36,23%             |
| 91                                                        | 37,68%             |
| 92                                                        | 40,58%             |
| 93                                                        | 36,96%             |
| 94                                                        | 39,13%             |
| 95                                                        | 38,41%             |
| 96                                                        | 42,75%             |
| 97                                                        | 36,23%             |
| 98                                                        | 35,51%             |
| 99                                                        | 37,68%             |
| 100                                                       | 33,33%             |
| 101                                                       | 42,75%             |
| 102                                                       | 38,41%             |
| 103                                                       | 37,68%             |
| 104                                                       | 38,41%             |
| 105                                                       | 48,55%             |
| 106                                                       | 34,78%             |
| 107                                                       | 42,75%             |
| 108                                                       | 36,23%             |
| 139                                                       | 42,75%             |
| 140                                                       | 36,96%             |
| 141                                                       | 35,51%             |
| 142                                                       | 38,41%             |
| 182                                                       | 37,68%             |
| 183                                                       | 35,51%             |
| 184                                                       | 39,86%             |

**Příloha 22. Množství polymorfních fragmentů – Vltava**

---

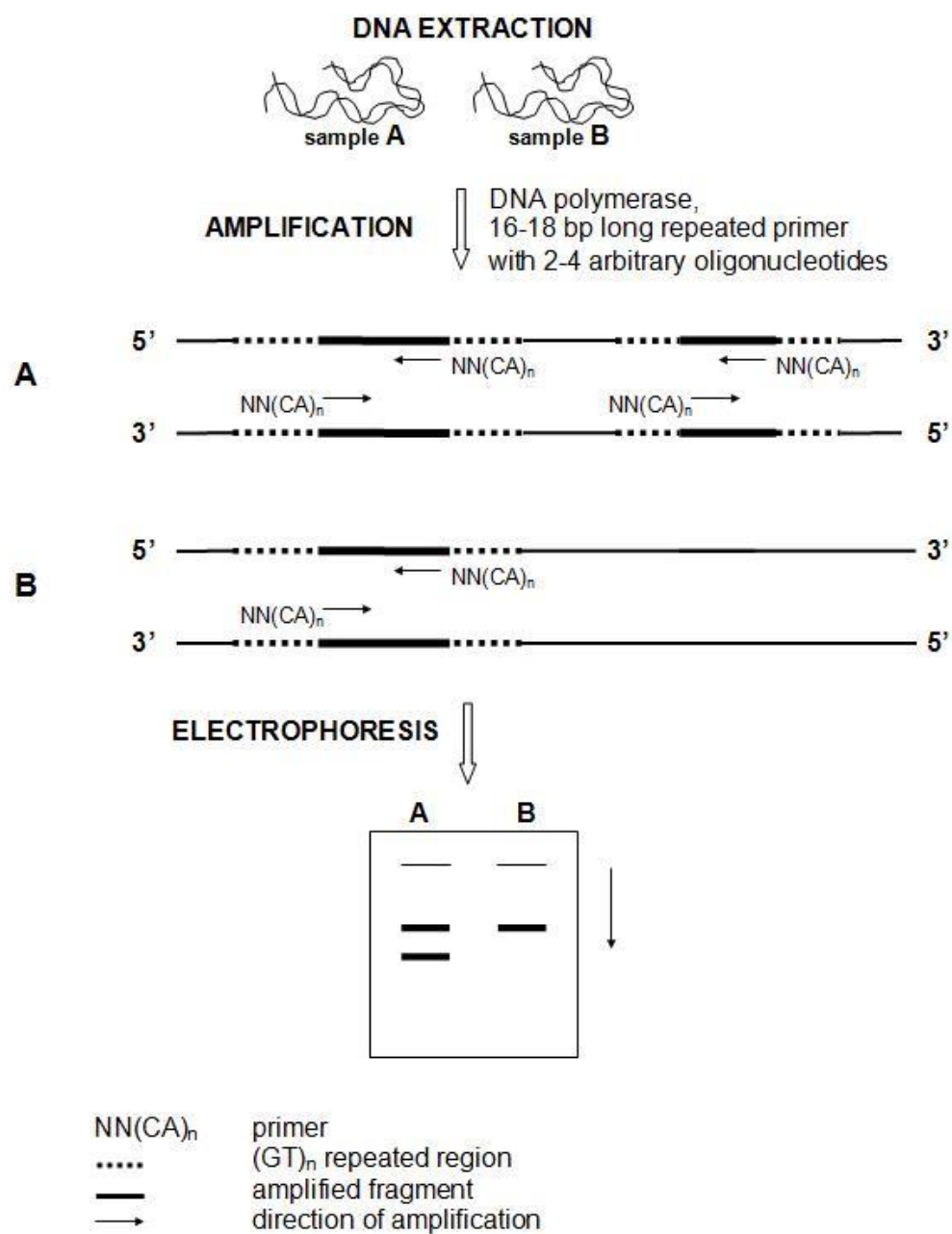
| Procentické zastoupení polymorfních fragmentů - Vydymač |                    |
|---------------------------------------------------------|--------------------|
| Číslo vzorku                                            | Množství fragmentů |
| 37                                                      | 36,96%             |
| 38                                                      | 47,10%             |
| 39                                                      | 33,33%             |
| 40                                                      | 31,88%             |
| 41                                                      | 31,88%             |
| 193                                                     | 34,78%             |
| 194                                                     | 36,23%             |
| 195                                                     | 36,23%             |
| 196                                                     | 38,41%             |
| 244                                                     | 40,58%             |
| 245                                                     | 42,03%             |
| 246                                                     | 35,51%             |
| 247                                                     | 36,23%             |
| 248                                                     | 40,58%             |
| 249                                                     | 28,99%             |

**Příloha 23. Množství polymorfních fragmentů – rybník Vydymač**



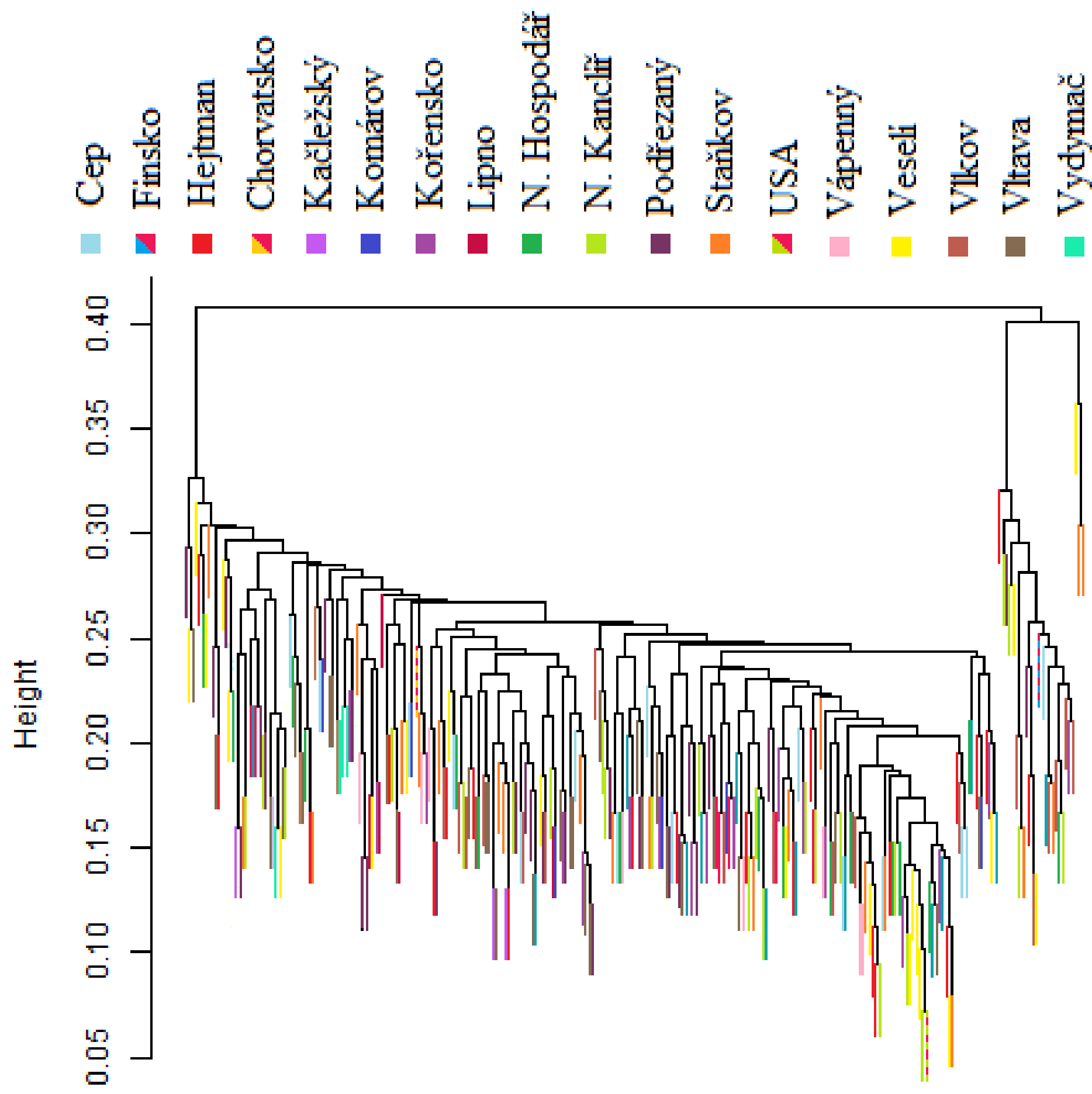
(Online: Fig. 1)

Příloha 24. Schéma techniky AFLP (Mueller a Wolfengarger, 1999)



Příloha 25. Schéma techniky ISSR ([www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))





Příloha 27. Shlukovací analýza všechny vzorky třízení dle lokalit

---

## Seznam publikací

### Impaktové publikace

1. Moravcová, V., Moravcová, J., Čurn, V., Balounová, Z., Rajchard, J., a Havlíčková, L. (2017). AFLP reveals low genetic diversity of the bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) in the Czech Republic. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 24(1), 1-6.
2. Moravcova, J., Moravcova, V., Pavlicek, T., a Novakova, N. (2022). Land Use Has Changed through the Last 200 Years in Various Production Areas of South Bohemia. *Land*, 11(10), 1619.

### Kapitola v knize

1. Moravcová, J., Pecenka, J., Pekna, D., Novakova, N., a Moravcova, V. (2018). The Role of Ornamental Gardens of Rural Settlements in Landscape Architecture. In *Landscape Architecture-The Sense of Places, Models and Applications*. IntechOpen.
2. Moravcová, J., Pecenka, J., Pekna, D., Moravcova, V., a Novakova, N. (2020). The Role of Public Spaces in Small Municipality. In *Sustainability in Urban Planning and Design*. IntechOpen.

### Příspěvky na konferenci

#### Aktivní příspěvek na konferenci

1. 17th International Scientific GeoConference SGEM 2017 (Albena)
2. XVI. seminář z ekologie mokřadů a hydrobotaniky 2018
3. Enviro 2021 (Nitra)
4. SDEWES 2021 (Dubrovnik)
5. Věda mladých 2022 (Banská Štiavnica)
6. SGEM 2022 (Vienna)
7. KNOWCON 2022

### Poster

1. Freshwater Invasives – Networking for Strategy 2016 (Zagreb)
2. Enviro 2019 (Kežmarské Žleby)

---

### **Další výstupy**

- 5. úplná aktualizace ÚAP Týn nad Vltavou
- Mapové podklady pro územní plán obcí Dasný, Dvory, Pavlov, Radostice, Římov, Zeleneč-Mstětice
- Územní studie Lišov
- Výukové texty TVOK (Tvorba a ochrana krajiny)
- Výukové texty UPLA (Územní plánování)
- Výukové texty ARCHV (Architektura venkova)

---

## Životopis

Jméno a příjmení: **Ing. Vendula Moravcová**  
Narození: 8.1.1991 v Českých Budějovicích  
Trvalé bydliště: Mánesova 19, 370 01, České Budějovice

### Vzdělání:

- 2002 - 2010 **České reálné gymnázium České Budějovice**  
2010 - 2013 **Bakalářské studium**
- Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
  - Zemědělská fakulta
  - Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
  - Téma bakalářské práce: Analýza metabolických efektů transkripčních faktorů chmelu (*H. lupulus*) u heterologního systému *Petunia hybrida*
- 2013 - 2015 **Magisterské navazující studium**
- Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
  - Zemědělská fakulta
  - Studijní obor: Zemědělské biotechnologie navazující
  - Téma diplomové práce: Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*
- 2015 – 2023 **Doktorské studium**
- Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
  - Zemědělská a technologická fakulta
  - 2015–2019 Katedra biologických disciplín
  - 2019 - 2023 Katedra genetiky a biotechnologií
    - Změna školitele z důvodu úmrtí
  - Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie
  - Téma disertační práce: Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*
- 2021 – 2023 **Magisterské studium**
- Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
  - Zemědělská a technologická fakulta
  - Studijní obor: Pozemkové úpravy a převody nemovitostí navazující
  - Téma diplomové práce: Vývoj zastavitelných oblastí v územních plánech Jihočeského kraje

### Státní závěrečné zkoušky:

- Ekologie invazních vodních živočichů
- Aplikovaná ekologie vodních ekosystémů
- Molekulární ekologie a využití molekulárních technik v ekologii

### Praxe:

- 2013 – měsíční stáž University of Barcelona, Facultat de Biologia
- 2015 – měsíční stáž Závod za javno zdravstvo županije Splitsko – Dalmatinske
- 2018 – měsíční stáž Povodí Vltavy s.p.
- 2019 – měsíční stáž Slovenská poľnohospodarská univerzita v Nitre
- Aktivní účast na mezinárodních konferencích
- Účast na projekci územních plánů a na veřejných jednáních a setkáních s občany

- 
- Zpracování územně analytických podkladů pro ORP Týn nad Vltavou
  - Zpracování mapových podkladů územně plánovací dokumentace
  - Terénní výzkum a hydrobiologická měření
  - Terénní průzkumy pro potřeby zpracování územně plánovací dokumentace a územně analytických podkladů
  - Hodnocení projektů TAČR
  - Spolupráce na hodnocení akreditačních žádostí národního akreditačního ústavu
  - Účast na výuce předmětů: Agrometeorologie, Architektura venkova, Fyziologie rostlin, Krajinné inženýrství, Tvorba a ochrana krajiny, Územní plánování

Pracovní zkušenosti:

- 2018 – 2023 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- 2019 – 2022 StudioMap (územní plánování, zpracování ÚAP)
- 2021 – 2023 PRO-PLANS s.r.o. (územní plánování)
- 2019 – 2023 hodnotitel TAČR
- 2019 – 2023 hodnotitel NAU

Znalosti:

- Anglický jazyk – pokročilý
- Německý jazyk – středně pokročilý
- Chorvatština – základy
- Francouzština – mluvená základy
- Znalost PC – Microsoft Office, Microsoft Teams, Statistica, ArcGIS, GIS Pro, Moodle

Kurzy:

- Jazykový kurz ve Velké Británii s certifikátem

Dosavadní odborná činnost:

- Terénní spolupráce na projektu GAČR P503/12/0337 Invazní mechovka *Pectinatella magnifica* v České republice: její biologie a sekundární metabolity
- Projekt GA JU 081/2016/Z: Funkce vody v kulturní krajině v období klimatické změny / Functions of water in the cultural landscape in the period of climate change
- Projekt GAJU 045/2019/Z: Vliv hospodaření na ekosystémy, funkci krajiny a organismy / The impact of landscape management on ecosystems, landscape function and organisms
- Projekt INTERREG Poznat a zažít historii pivovarnictví v příhraničním regionu Jižní Čechy a Dolní Bavorsko
- Projekt TAČR TL02000322 Teplotní komfort v obcích, pocitový vjem obyvatel, fyzikální skutečnost, role zeleně

---

Kontakt: e-mail: moravv@fzt.jcu.cz  
Vendula.Moravcova@seznam.cz  
Telefon: + 420 728 647 401  
+ 420 387 772 776