



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

Autoreferát 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

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Vendula Moravcová
Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí
Studijní obor: Aplikovaná a krajinná ekologie
Název práce: Studium genetické diverzity kolonií *Pectinatella magnifica*

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

Oponenti:
doc. Ing. Zdeněk Adámek, CSc.
prof. Ing. Miroslav Dumbrovský, CSc.
doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Obhajoba disertační práce se koná dne 15.3.2023 v zasedací místnosti budovy ZR FZT JU v Českých Budějovicích

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské a technologické fakulty JU v Českých Budějovicích.

Doc. RNDr. Libor Pechar, CSc.
Předseda oborové rady
Aplikovaná a krajinná ekologie
FZT JU v Českých Budějovicích

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 Leidym 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

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární přehled.....	7
2.1	Utváření kolonií <i>Pectinatella magnifica</i>	7
2.2	Reprodukční systém <i>Pectinatella magnifica</i>	8
2.3	Podmínky pro výskyt druhu <i>Pectinatella magnifica</i>	9
2.3.1	Teplota vody.....	9
2.3.2	Složení vody.....	9
2.3.3	Vliv substrátu na růst kolonií <i>Pectinatella magnifica</i>	10
2.4	Rozšíření <i>Pectinatella magnifica</i>	10
2.5	Význam druhu <i>Pectinatella magnifica</i>	11
3	Cíle práce	12
4	Experimentální část a výsledky.....	13
4.1	Lokality a technika sběru vzorků	13
4.2	Hodnocení vývoje výskytu <i>Pectinatella magnifica</i>	14
4.3	Technika izolace a analýzy DNA.....	14
4.4	Analýza vlivu stáří použitého vzorku na DNA	15
4.5	Vliv zmražení vzorku na kvalitu a množství DNA	15
4.6	Analýza AFLP	16
4.7	Analýza ISSR	18
5	Závěr	19
6	Použitá literatura	21
	Seznam publikací	25
	Životopis	27

1 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.

2 Literární přehled

Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) je sladkovodním zástupcem živočišného kmene mechovci (*Bryozoa*), který byl popsán roku 1851 americkým přírodovědcem Josephem Leidyem v oblasti města Philadelphia (Leidy, 1851). Tento druh původně obývající americký kontinent je v současné době znám jako invazní organismus na většině zeměkoule.

Tabulka 2.1: 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)

2.1 Utváření kolonií *Pectinatella magnifica*

Charakteristickým znakem druhu *Pectinatella magnifica* je vytváření kolonií kulovitěho či protáhlého tvaru. Samotný vzhled kolonie je ovlivněn podkladem, ke kterému je přirostlá a životním prostorem, který dokáže osídlit. S ohledem na životní podmínky pak mohou dosahovat velikosti 0,25 – 70 kg (Balounová, et al., 2007).



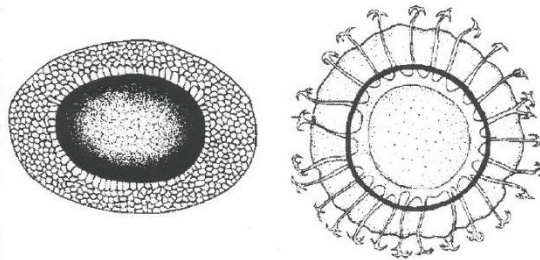
Kolonie *Pectinatella magnifica* (vlastní foto)

Kolonie *Pectinatella magnifica* je utvářena až několika tisíci jedinci druhu, kteří jsou rozmístěni po povrchu kulovité kolonie v útvarech označovaných jako rozety. Každá rozeta je pak složena za cca 12 až 18 jedinců (Morse, 1930). Ačkoliv kolonie může dosahovat značných rozměrů, samotní zástupci *Pectinatella magnifica* se nacházejí pouze na jejím povrchu. Jádrem kolonie je složeno z gelovité hmoty, produkované statoblasty. Tento gel je z 99 % složen z vody a zbývajících 1 % připadá na bílkoviny, chitinová mikrovlákná, vápník a chlorid sodný (Šetlíková, et al., 2013).

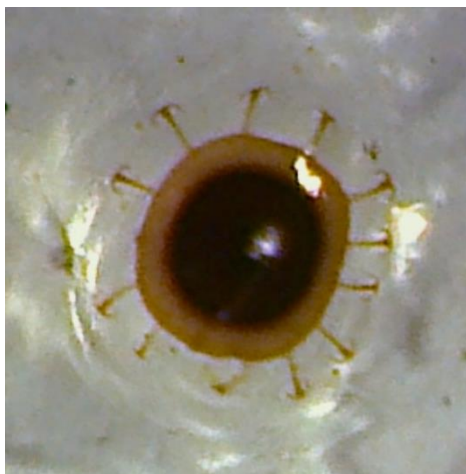
2.2 Reprodukční systém *Pectinatella magnifica*

Druh *Pectinatella magnifica* jako všichni zástupci třídy *Phylactolaemata* je schopna pohlavního rozmnožování. Tato fáze reprodukce probíhá v krátkém období mezi červnem a zářím, kdy dochází k vrcholu vegetačního období (Wood, 2010). Jedinci skupiny *Phylactolaemata* jsou často schopni produkovat vajíčka i spermie a jsou tudíž hermafrodité (Zrzavý, 2006). Embryo se postupně vyvíjí až do formy volně plovoucí struktury označené jako larva trochoforového typu, přestože technicky vzato se jedná o pohyblivou kolonii (Wood a Wood, 2000). 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 a vytvoření primárního zooidu budoucí kolonie. (Wood, 2001).

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, 2001b). 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 (Wood, 2010).



Statoblasty *Pectinatella magnifica* (Barnes a Golding, 2009)



Statoblast *Pectinatella magnifica* (Vlastní foto)

2.3 Podmínky pro výskyt druhu *Pectinatella magnifica*

2.3.1 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). Déletrvajícím pokles teplot potom má za následek úhyn a rozpad kolonií a uvolnění statoblastů. V podmínkách střední a západní Evropy, a tedy i České republiky, dochází k prvnímu nárůstu kolonií a jejich rozvoji většinou v průběhu června a července (Wood, et al., 2006). Výskyt kolonií pak bývá zaznamenáván až do září a ojediněle až do konce října, v závislosti na průběhu teplot (Williams, 1921).

2.3.2 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, 2001c). 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).

2.3.3 Vliv substrátu na růst kolonií *Pectinatella magnifica*

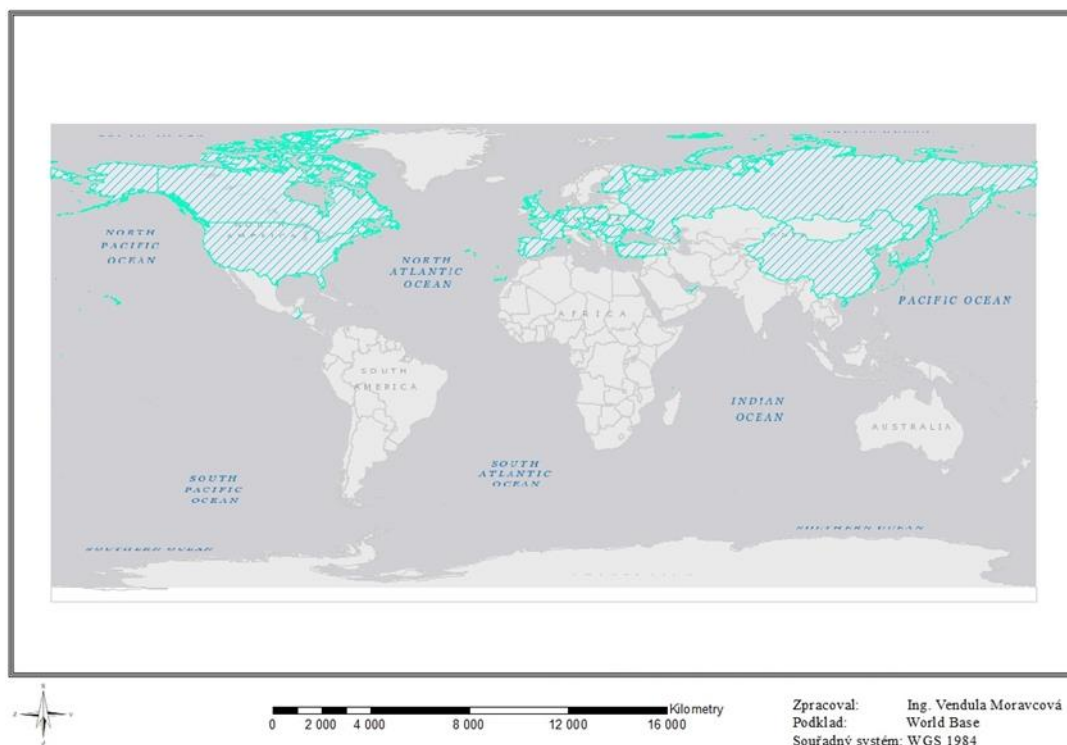
Přestože je substrát významným faktorem, který promlouvá do růstu kolonií *Pectinatella*, není možné jednoznačně určit preferovaný typ substrátu. Při opakovaném pozorování na jednotlivých vodních nádržích byly zaznamenány různé preference substrátu v rámci jedné nádrže, a i v průběhu jednotlivých sezón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

2.4 Rozšíření *Pectinatella magnifica*

Ačkoliv se jedná o původně severoamerický druh přirozeně se vyskytující ve východní části kontinentu, dnes je znám jako invazní druh na většině severní polokoule. První zaznamenané rozšíření mimo Severní Ameriku bylo již na konci 19. století na řece Labi nedaleko Hamburku (Kraepelin, 1887). Toto zavlečení bylo přisuzováno zachycení statoblastů na trupech lodí plujících z amerických přístavů. Od té doby se tento druh rozšířil nejen říční cestou po většině Evropy, ale i díky lodní dopravě i do značné části Asie. Zajímavostí je, že do nedávna byla jako severní hranice výskytu kolonií mechovky považována 55 rovnoběžka, avšak v posledních letech byl zaznamenán výskyt kolonií i nad touto hranicí. Příkladem mohou být zprávy o výskytu

v jižní oblasti Finska (Vuorio, et al., 2018; Selänpää, 2022) a Ruska, konkrétně oblasti Petrohradu (Starunova, et al., 2021).



Rozšíření *Pectinatella magnifica*

2.5 Význam druhu *Pectinatella magnifica*

Význam výskytu druhu pro vodní prostředí je záležitost výzkumů. Konkrétní vliv přítomnosti kolonií na složení vody je obtížné stanovit, vzhledem k náročným podmínkám kultivace kolonií v umělém prostředí.

Z hlediska soužití s dalšími vodními organismy je nejvýznamnější potenciální rizikovost tohoto druhu pro lososovité ryby, z důvodu mezihostitelství druhů rodů *Trichonosema* a *Tetracapsula* (Okamura, Wood, 2002). Tyto parazitické druhy způsobují závažná onemocnění ledvin 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 %). 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).

3 Cíle práce

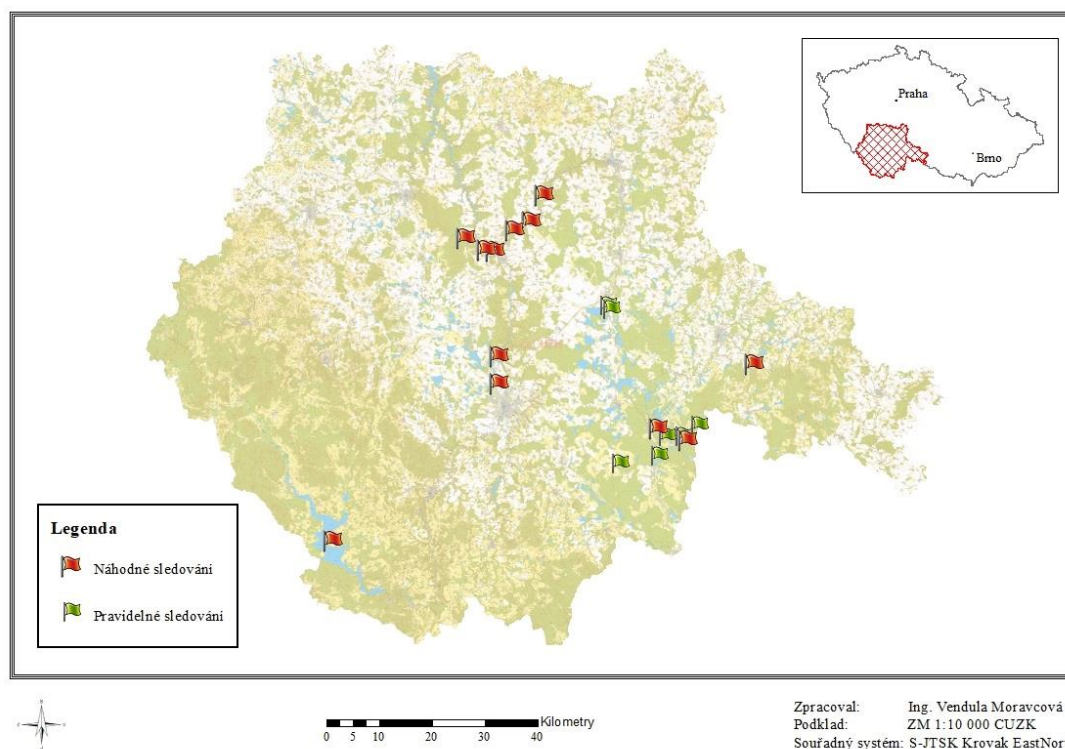
- Hlavním cílem práce bylo stanovit genetickou diverzitu kolonií *Pectinatella magnifica* na území České republiky.
 - Kromě hlavního cíle, byly stanoveny cíle vedlejší
 - Monitoring průběžného stavu kolonií mechovky na vodních nádržích
 - Stanovení vlivu délky skladování odebraných vzorků na množství a kvalitu DNA
 - 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.
 - Druhou hypotézou bylo, že stáří uskladněného živočišného materiálu kolonií *Pectinatella magnifica* ve stálých podmínkách neovlivní výtěžnost a kvalitu izolované DNA.
 - Jako třetí hypotéza byl stanoven předpoklad, že zmrazení kolonie *Pectinatella magnifica* neovlivní množství ani kvalitu vytěžené DNA v porovnání se vzorky izolovanými ihned po odběru z lokality.
-

4 Experimentální část a výsledky

4.1 Lokality a technika sběru vzorků

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. Vzorky pocházející z České republiky jsou děleny na vzorky pocházející z břehů řek z oblastí Bechyně, sportovní kanál v Českých Budějovicích, Dobronice, Hluboká nad Vltavou, Nuzice a Neznášov, a vzorky z vodních nádrží: Cep, Hejtman, Kořensko, Lipno, Nový Hospodář, Nový Kanclíř, Podřezanský, Vápenný, Veselí, Vlkov, Vydymač. Mezi pokusným materiálem se nacházejí 3 vzorky získané ze zahraničí, konkrétně z USA, Chorvatska a Finska.

Vzorky použité pro experimentální část byly odebírané na výše zmíněných lokalitách. Samotná technika sběru vzorku spočívala v seškrábnutí kolonie zooidů se statoblasty a uskladnění v mikrozskumavkách při teplotě -20°C . Pro samotné analýzy DNA pak byly použity očištěné statoblasty pocházející z výše zmíněných odběrů.



Mapa lokalit jižní Čechy



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

4.2 Hodnocení vývoje výskytu *Pectinatella magnifica*

Na základě dat, získaných terénním pozorováním na lokalitách s pravidelným sledováním byl pozorován vývoj kolonií druhu *Pectinatella magnifica*. 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.

Během těchto pozorování byl zjištěn posun ve vrcholu vegetační sezóny. Z počátku sledování kolonie postupně narůstaly, během letní sezóny dosáhly svého vrcholu a s nástupem podzimu postupně odumřely. V posledních letech se ukazuje změna v chování mechovek, kdy na začátku sezóny dojde k prudkému nárůstu kolonií a během druhé poloviny léta nastane rychlý pokles následovaný odumíráním zbytku kolonií.

4.3 Technika izolace a analýzy DNA

DNA vzorků o připravené navážce cca 1 mg byla izolována pomocí metody izolační techniky využívající CTAB-PVP. Podrobný protokol této izolační techniky je dostupný v publikaci Metodika detekce a molekulární selekce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.) (Čurn, et al., 2012).

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. Metodou, která byla využívána okamžitě po provedené izolaci, byla analýza pomocí spektrofotometru BioSpec Nano (SHIMADZU). 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.

4.4 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. Měřené vzorky byly rozděleny do kategorií, vzorky mladší 1 roku (<1), jednoleté, dvouleté, tříleté, čtyřleté a starší pěti let (>5). U jednotlivých kategorií zjištěny průměrné hodnoty získané pomocí spektrofotometru BioSpec Nano. Na základě těchto dat byl vyhodnocen vliv stáří vzorku na množství a kvalitu vytěžené DNA.

Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že největší množství DNA o požadované kvalitě lze získat ze vzorků o stáří jednoho až dvou let. Mladší vzorky vykazovaly vysokou míru znečištění, pravděpodobně pocházející ze zásobních látek určených pro výživu zárodku zooidu. Starší vzorky naopak byly kontaminovány degradující DNA.

4.5 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. 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 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, byly

na zvolené lokalitě odebrány shluky statoblastů a ty následně spolu se vzorky uskladněnými v -20 °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 °C a vzorky ponechanými k přirozenému přezimování ve vodní nádrži a odebranými až v následujícím roce.

Z výsledků izolací bylo patrné, že vzorky izolované ihned po odběru vykazovaly výrazně nižší výtěžnost DNA se zvýšeným obsahem kontaminantů. Oproti tomu uměle zmražené vzorky a vzorky přirozeně přezimované vykazovaly velice podobné hodnoty. Tento jev by mohl naznačovat potřebu krátkodobého zmražení statoblastů kolonií *Pectinatella magnifica* pro jejich následný vývoj a vylíhnutí nového zoidu a zároveň by mohl vysvětlovat šíření kolonií do severských oblastí Evropy.

4.6 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.

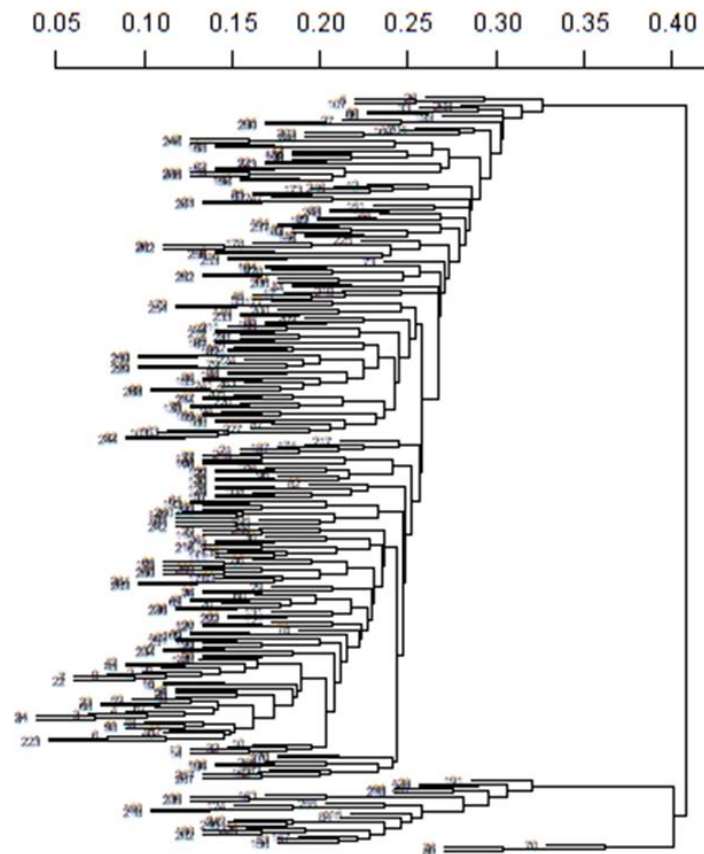
Pro analýzy AFLP byla zvolena primerová kombinace *EcoRI*+ACG/*MseI*+AGT, která byla zvolena na základě předcházející diplomové práce. Primer ACG, použitý v reakční směsi, byl fluorescenčně označený, za účelem zpracování výsledků pomocí kapilární elektroforézy za sekvenačním přístroji.

Vzhledem k faktu, že technika AFLP byla ověřena již během pilotní studie v rámci diplomové práce, analýzy dopadly 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 amplifikovaných vzorků se jako odlišných ukázalo 26, tedy 9,67 %.

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 (70, 202, 207, 210, 213, 218, 255), Staňkov (76, 80, 235), Kořensko (53), Cep (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.

Vzhledem k nízkému procentu vzorků tvořících druhý klastr je velmi těžké usuzovat, zda u druhu *Pectinatella magnifica* došlo ke specializaci v rámci studovaného areálu.



Výsledky shlukovací analýzy

4.7 Analýza ISSR

Jako druhá rozšiřující technika byla zvolena analýza ISSR, která je založena na použití mikrosatelitových sekvencí v pozici primeru. Výhodou této metody je, že se jedná o sekvence DNA, které se náhodně vyskytují v genomu všech eukaryontních organismů. Díky tomu je možné odhalit různé dlouhé řetězce DNA, ohraničené těmito úseky, které následně slouží ke stanovení genetické diverzity mezi jednotlivými jedinci studovaného druhu. 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.

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.

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 najít řešení a úspěšnou amplifikaci ISSR DNA fingerprintingu výsledek analýz ISSR dopadl neuspokojivě.

5 Závěr

Na 270 vzorcích odebraných převážně na lokalitách jižních Čech byla provedena série pokusu, 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, 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 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. 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 klastrů, kdy cca 90 % 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, Veselí, Staňkov, Kořensko, Cep, Finsko, Hejtman, Nový Hospodář, Nový Kanclíř a Vydymač. Z výsledků shlukovacích analýz a celkového obrazu pak hypotézu, že celková genetická struktura druhu *Pectinatella magnifica* je velmi nízká nelze vyvrátit.

6 Použitá literatura

1. 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.
 2. Balounová, Z., Šmahel, L., Rajchard, J. (2007). Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová, J., Štěřba, O. (Eds.). *Proceedings of the Říční krajina 4*, Olomouc..
 3. 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.
 4. 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)..
 5. Barnes, R. S. K. a Golding, D. (2009). *Invertebrates : A Synthesis* (3rd Edition). Hoboken: Wiley-Blackwell, 512 s., ISBN 9781444312331.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Kellicott, D. (1882). *Polyzoa: Observations on Species Detected near Buffalo, NY*. *Proceedings of the American Society of Microscopists*, 4, 217-229
 9. Komárek, J. (1952). *Zoologie bezobratlých* (Vol. 1). Přírodovědecké vydavatelství.
 10. Kraepelin, K. (1887). *Die deutschen süßwasser-bryozoen: Eine monographie*. Hamburk: L. Friederichsen & Company, 48 s.
 11. Leidy, J. (1851). On *Cristatella magnifica*. *Proceedings of Academy of Natural sciences Philadelphia*, 5, 265-266.
 12. Morse, W. (1930). The chemical constitution of *Pectintalla*. *Science*, 71(1836), 265.
 13. Okamura, B. a Wood, T. (2002). Bryozoans as hosts for *Tetracapsula bryosalmonae*, the PKX organism. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), 469-475.
-

-
14. Selänpää, T. (2022). Kunnallisen vieraslajityön kehittäminen: Lempäälän kunnan vieraslajiohjelma.
 15. 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
 16. Šetlíková, I., et al. (2005). Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku. *Živa*, 53, 172-173.
 17. 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.
 18. Vuorio, K., et al. (2018). Invasion of Finnish inland waters by the alien moss animal *Pectinatella magnifica* Leidy, 1851 and associated potential risks. *Management of Biological Invasions*, 9.
 19. Wilcox, A. W. (1906). Locomotion in young colonies of *Pectinatella magnifica*. *The Biological Bulletin*, 11(5), 245-252.
 20. Williams, S. R. (1921). Concerning" larval" colonies of *Pectinatella*. *The Ohio Journal of Science*, 21(4), 123-127.
 21. Wood, T.S., (2001). Bryozoans. In: Thorp, J., Covich, J., (eds) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrate*, (Second Edition). Academic Press, 505–525
 22. Wood, T. (2001b). Freshwater bryozoans: a zoogeographical reassessment. *Bryozoan studies*, 21, 339-345
 23. Wood, T. S. (2001c). Three new species of plumatellid bryozoans (*Ectoprocta: Phylactolaemata*) defined by statoblast nodules. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(1), 133-143.
 24. 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
 25. 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
-

-
26. Wood, T. S., Anurakpongsatorn, P., A Mahujchariyawong, J. (2006). Freshwater bryozoans of Thailand (*Ectoprocta* and *Entoprocta*). *Tropical Natural History*, 6(2), 83-119
27. Zrzavý, J. (2006). *Fylogeneze živočišné říše*. Scientia, 156 s., ISBN 9788086960081
-

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

Poster

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

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)
 3. Věda mladých 2022 (Banská Štiavnica)
 4. SGEM 2022 (Vienna)
 5. KNOWCON 2022
-

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)

Publikace v přípravě

- Vliv meteorologických charakteristik na růst kolonií *Pectinatella magnifica*
- Vliv mrazu na DNA statoblastů druhu *Pectinatella magnifica*

Plánovaná publikace

- Výstup z disertační práce na téma analýz AFLP
-

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 – nyní **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 – nyní **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 poľnohospodárska 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 – nyní Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- 2019–2022 StudioMap (územní plánování, zpracování ÚAP)
- 2021 – nyní Pro Plans, s.r.o. (územní plánování)
- 2019 – nyní hodnotitel TAČR
- 2019 – nyní 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