

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Vojtěch Scharfen

Diverzita rodu *Frustulia* severní Evropě

Diversity of genus *Frustulia* v severní Evropě

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Pavla Urbánková

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 8. července 2013

.....
Vojtěch Scharfen

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mě podporovali při psaní této práce. Jmenovitě děkuji především mé školitelce Pavle Urbánkové za ochotu, trpělivost a vydatnou pomoc, kdykoli, když jsem se dostal do nesnází. Janě Kulichové a Pavlu Škaloudovi za odborné rady a podnětné nápady. Celému kolektivu algologů a kamarádů z Katedry Botaniky, za milé a inspirující prostředí.

Nakonec vřelý dík patří mým rodičům, přítelkyni, sourozencům a dalším zbylým rodinným příslušníkům, bez jejichž všestranné podpory by pro mě bylo všechno daleko těžší a složitější. Děkuji Vám!

Abstrakt

Rod *Frustulia* byl pro tuto práci vybrán kvůli návaznosti na předchozí výzkum naší algologické skupiny (Veselá 2007; Urbánková 2009; Urbánková 2011; Veselá 2011; Fialová 2013).

Pomocí molekulárních metod bylo zjištěno, že řada morfologicky vymezených druhů rozsivek je komplexem kryptických druhů, které mohou mít omezené rozšíření.

Cílem této práce bylo:

- 1) zhodnotit diverzitu rodu *Frustulia* v severní Evropě. pomocí molekulárních metod a zařadit nalezené druhy do fylogenetického kontextu příbuzných druhů;
- 2) zjistit jestli lze určit izolované druhy i v přírodních vzorcích pomocí morfologických znaků.

Molekulárními metodami bylo analyzováno 234 kmenů. Izolované kmeny spadaly do čtyř kladů. 86% kmenů patřilo k druhovému komplexu *F. crassinervia-saxonica*. Dva kmeny byly určeny jako druhy *F. gaertnerae* a *F. septentrionalis*. Poslední nalezená linie nebyla zatím popsána a byla proto označena *F. sp.* Tato linie je blízké příbuzná druhu *F. maoriana*, který se považuje za endemita Nového Zélandu. Fylogeneze rodu byla vytvořena na základě datasetu ze čtyř molekulárních markerů.

a s publikovanými morfometrickými údaji pak bylo porovnáno 264 fotografií buněk pořízených skenovacím elektronovým mikroskopem.

Kontrolním srovnáním výsledků analýzy kvantitativních a kvalitativních znaků s morfologickými daty uvedenými v dostupných publikacích vyplynulo, že morfologické znaky křemičitých schránek jsou u rodu *Frustulia* jen obtížně použitelné k jednoznačnému druhovému zařazení.

Klíčová slova: *Frustulia*, fylogeneze, morfologie, rozšíření

Abstract

Genus *Frustulia* was chosen for this work due to the continuity of the previous research of our phycological group.

Using molecular techniques, it was found that a number of morphologically defined species of diatoms is cryptic species complex, which may have limited dispersal.

The aim of this study was to:

1) evaluate the diversity of the genus *Frustulia* in northern Europe by molecular methods and classify found species in the phylogenetic context of related species;

2) find out if it possible to identify the isolated species in natural samples by using morphological characters.

There have been analyzed 234 strains by molecular methods. Isolated ones were in four clades. 86 % of the strains belonged to a generic complex *F. crassinervia-saxonica*. Two strains were identified as species *F. gaertnerae* and *F. septentrionalis*. The last line was not described yet so it was labeled as *F. sp.* This line is closely related to the species *F. maoriana*, which is considered to be endemic in New Zealand. Phylogeny of the genus was created based on a dataset of four molecular markers. Published morphometric data were then compared with 264 cells photos taken by scanning electron microscope.

There was done surveillance comparison of the results of the analysis of quantitative and qualitative characters with morphological data listed in the available publications. It showed that morphological characters of siliceous frustules are in case of the genus *Frustulia* hardly applicable to a definite generic classification.

Keywords: *Frustulia*, phylogeny, morphology, dispersal

Obsah

1	Seznam zkratk, odborných termínů a pojmů.....	i
2	Úvod.....	9
2.1	Druh a jeho vymezení	9
2.2	Biogeografie a diverzita sladkovodních rozsivek	12
2.3	Charakteristika rodu <i>Frustulia</i> a jeho zastoupení v severní Evropě	15
3	Materiál a metody	17
3.1	Lokality a sběr vzorků.....	17
3.2	Izolace a kultivace kmenů	18
3.3	Analýza DNA.....	18
3.4	Analýza morfologie.....	22
4	Výsledky	25
4.1	Molekulární data a fylogenetické analýzy	25
4.2	Morfologie a identifikace druhů.....	27
5	Diskuze	32
5.1	Fylogeneze rodu <i>Frustulia</i>	32
5.2	Koncept druhu	34
5.3	Diverzita rodu <i>Frustulia</i> v severní Evropě.....	34
5.4	Nalezené druhy.....	37
5.4.1	<i>Frustulia crassinervia-saxonica</i>	37
5.4.2	<i>Frustulia gaertnerae</i>	39
5.4.3	<i>Frustulia septentrionalis</i>	41
5.4.4	<i>Frustulia</i> sp.	42
6	Závěr	43
7	Literatura.....	44
8	Seznam tabulek	53
9	Seznam obrázků.....	54
10	Seznam příloh	55

1 Seznam zkratek, odborných termínů a pojmů

Alopatrická speciace – vznik druhů, který je způsoben oddělením populací geografickou bariérou

Areoly – otvory v rozsivkové schránce, větší množství uspořádaných areol tvoří strie

BI – Bayesiánská inference (Bayesian inference)

Centrální nodulus – výrazněji silicifikovaná oblast mezi proximálními konci raphe

Clade – větev na fylogenetickém stromu zahrnující společného předka a všechny jeho potomky

con. – konduktivita - γ [$\mu\text{S}/\text{m}^{-1}$] – její hodnota odráží množství látek (solí, živin) rozpuštěných ve vodě

dNTP – deoxynukleotid trifosfát (během PCR slouží jako zdroj stavebních částic pro nukleotidové řetězce)

GTR model – model evoluce DNA (Generalised time reversible model)

Heliktoglosa – rozšířená oblast v apikálních koncích křemičité schránky, kde se u rodu *Frustulia* sbíhají dvě žebra; může sloužit jako charakteristický znak daného druhu

HKY model – model evoluce DNA (Hasegawa, Kishino and Yano)

IUPAC – organizace zabývající se chemickou nomenklaturou a terminologií (International Union of Pure and Applied Chemistry)

LM – světelná mikroskopie (Light Microscopy)

Long branch attraction – artefakt přitahování dlouhých větví (starší linie nebo linie se zrychlenou evolucí jsou společně přitahovány ke kořeni stromu, i když tam nepatří)

LSU – velká podjednotka ribosomální RNA (Large Subunit)

Ma – 1×10^6 let, z anglického „million years ago“

MES – pufr stabilizující pH 4,5 - 6,5 ($\text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$)

ML – metoda maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood)

Monofyletický taxon – soubor všech jednotek (druhů) které se odvíjejí od vzájemně společného předka

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OGM – oligotrofické kultivační médium (návod: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html>)

Outgroupová skupina – srovnávací skupina blízké příbuzná zkoumanému objektu

Parafyletický taxon – skupina organismů, která nezahrnuje všechny potomky jejich společného předka

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

Penátní rozsivky – rozsivky s dvoustranně souměrnou schránkou

psbA - – oblast chloroplastové DNA kódující D1 protein reakčního centra fotosystému II

Pseudokryptický – druhy, které byly primárně stanoveny na základě genetické odlišnosti a teprve druhotně u nich byly nalezeny i jejich unikátní morfologické znaky

Porte-crayon – útvar vzniklý splynutím heliktoglosy a žeber tak, že heliktoglosa vyčnívá mimo obrys žeber podobně jako tuha vyčnívající z verzatilky

PP – posterior probability

Raphe – štěrbina táhnoucí se podélně schránkou některých penátních rozsivek; skrz raphe je vylučován sliz s aktinovými vlákny, který umožňuje pohyb buňky po podkladu

rbcL – část chloroplastové DNA kódující velkou podjednotku „dýchacího“ enzymu ribuloso-1,5-bisfosfát-karboxylázy/oxygenázy (RuBisCo large subunit)

rpm – otáčky za minutu (revolutions per minute)

SEM – skenovací elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy)

SSU – malá podjednotka ribosomální RNA (Small Subunit)

Strie – soubor areol uspořádaných v řadě

Sympatrie – výskyt dvou nebo více blízké příbuzných druhů na stejném území

Synapomorfie - znak společný alespoň dvěma příbuzným taxonům

Valva – plochá část poloviny křemičité schránky

2 Úvod

2.1 Druh a jeho vymezení

Rozsivky jsou v současnosti jednou z nejúspěšnějších fotosyntetizujících protistních skupin. Obývají téměř všechny typy vodního prostředí a mají globální význam v biochemických cyklech uhlíku, kyslíku a křemíku. Přesto je o jejich biologii, biodiverzitě a rozšíření známo jen překvapivě málo (Mann 1999). Na základě dosavadních výsledků je odhadována existence alespoň třiceti tisíc druhů rozsivek, ale dle současného nárůstu nově objevovaných druhů se dá očekávat, že hranice jejich celkového počtu může být několikanásobně vyšší – cca. sto tisíc (Mann & Vanormelingen 2013).

Druh, je základní jednotkou téměř ve všech biologických oborech. Schopnost správně definovat a rozlišovat jednotlivé druhy organismů je zásadní pro jejich další poznání, ochranu, i pro jejich případné biotechnologické využití. Klasifikace živých organismů jde napříč lidskou historií a její pojetí se neustále vyvíjí (Linné 1753; Darwin 1859; Mayr 1942; Wiens 2007). V současnosti existuje okolo šestadvaceti druhových konceptů (Wilkins 2002). Mezi nejčastěji používané druhové koncepty patří morfologický, biologický (Mayr 1942) a fylogenetický druhový koncept (Mayden 1997).

Taxonomický systém rozsivek je historicky založen na morfologickém druhovém konceptu. Struktura rozsivkových křemičitých schránek (frustul) je vědci pozorována pomocí světelného mikroskopu od počátku 18. století (Anonymous 1703) a po dlouhou dobu byla jediným identifikačním vodítkem při určování druhů (Mann 1999). Studium ultrastrukturních znaků schránky a přesnější vymezení druhů umožnila elektronová mikroskopie (Hall 1966). Vysoká morfologická konzervativnost anebo naopak výrazná fenotypová plasticita činí použití samotného morfologického druhového konceptu u rozsivek nespolehlivým (Kociolek & Stoermer 2010).

Druhy rozsivek lze vymežit i na základě biologického druhového konceptu, který popisuje biologický druh jako skupinu organismů, jejichž populace se aktuálně kříží a jsou reprodukčně izolovány od ostatních skupin (Mayr 1942). Aplikovatelnost biologického druhového konceptu je tedy omezena jen na populace sexuálně se rozmnožujících organismů, které se vyskytují sympatricky.

Životní cyklus rozsivek je specifický zmenšováním velikosti buňky během série mitotických dělení. K sexuálnímu rozmnožování dochází vždy ve chvíli, kdy buňka dosáhne svého velikostního minima a je zapotřebí obnovit její původní velikost (Geitler 1932). Přítomnost

sexuálního rozmnožování v životním cyklu rozsivek umožňuje studovat mezidruhové reprodukční bariéry pomocí křížících experimentů (Behnke et al. 2004). Reprodukční bariéry jsou však často neúplné a nedostatečná znalost jejich fungování komplikuje využití biologického druhového konceptu u rozsivek (Vanormelingen et al. 2008; Casteleyn et al. 2009).

Problémy biologického druhového konceptu se pokouší řešit fylogenetický druhový koncept (Cracraft 1983). Jeho definice se různí, ale v zásadě popisuje druh jako skupinu organismů vzájemně sdílejících alespoň jeden unikátně odvozený znak a vzorec rodové linie ve smyslu předeek, rodič, potomek (Mayden 1997). V praxi této definici odpovídá topologie fylogenetických stromů, která je podmíněna variabilitou nukleotidových sekvencí zkoumaných organismů a typem zvolené biostatistické analýzy (např. Felsenstein 1973; Felsenstein 1985). Výhodou molekulárních metod je jejich efektivita a relativní finanční dostupnost, díky čemuž se fylogenetický koncept stal brzy nedílnou součástí i při studiu fylogeneze rozsivek (Medlin et al. 1993; Leliaert et al. 2014). Oproti biologickému druhovému konceptu je fylogenetický druhový koncept uplatnitelný i u asexuálních druhů a alopatrických populací (Agapow et al. 2004).

V současnosti jsou využívány i nové sekvenační a bioinformatické metody, které mají urychlit, zlevnit a zpřesnit determinaci druhů. Jedná se například o tzv. „next-generation sequencing“ metody, které umožňují plošné osekvenování rozsivkových splečnenstev v odebraném vzorku (Kerमारrec et al. 2013), nebo o využití bar-codingových technik pro přesnější vymezení vnitrodruhových a mezidruhových hranic (Evans et al. 2007; Hamsher et al. 2011). I přesto, že je dnes fylogenetický koncept v praxi běžně používán, není samotný speciální proces dosud zcela objasněn a vedou se časté debaty o oprávněnosti popisu nových druhů tímto způsobem (Alverson 2008).

Počet druhů vymezených na základě odlišných druhových konceptů se může lišit (Agapow et al. 2004). Konfliktnost druhových konceptů byla u rozsivek zaznamenána například ve studiích (Geitler 1979), či Vanormelingen et al. (2008). V obou studiích pozorovali vznik hybridních jedinců u sympatricky žijících zástupců rodů *Gomphonema* a *Eunotia*, jejichž linie byly geneticky a morfologicky odlišené.

Queiroz (2007) poukazuje, že je důležité hledat to, co mají jednotlivé koncepty společné spíše než dílčí konfliktnost jednotlivých druhových konceptů. Druhy chápe jako separátní a neustále se vyvíjející metapopulační linie. Znaky na které se zaměřují ostatní koncepty,

získávají linie postupně a v náhodném pořadí během vývoje. Navrhuje tedy používat tzv. jednotný druhový koncept. Ten využívá co možná nejvíce druhových konceptů najednou a může tak poskytnout robustnější základ pro hlubší pochopení evolučních mechanismů (De Queiroz 2007).

2.2 Biogeografie a diverzita sladkovodních rozsivek

Ubikvitní teorie (Beijerinck 1913) říká, že „Všechno je všude, limitující je prostředí“. Tato teorie předpokládá ubikvitní výskyt mikroorganismů na základě jejich malé velikosti a obrovského počtu jedinců v jejich populacích. Její obhájci také tvrdí, že díky neomezenému šíření jsou lokální extinkce druhů prakticky nemožné a že neexistují geograficky izolované oblasti, ve kterých by mohla probíhat alopatriká speciace (Finlay & Fenchel 2004). Tato teorie tedy předpokládá i nízkou druhovou diverzitu mezi mikroskopickými protisty (Finlay et al. 2002).

Znalost biodiverzity a biogeografie sladkovodních rozsivek je výrazně ovlivněna jejich neuspořádanou taxonomií, která je stále z větší části postavena na morfologických znacích křemičitých schránek (Mann, 1999). Proměnlivost morfologických znaků ve vztahu k prostředí (např. vlivem různé teploty či salinity) (Syvertsen 1977; Trobajo et al. 2011), či specifickému životnímu cyklu rozsivek (Round et al. 1990), může vést k nadhodnocení druhové diverzity. Mnohem častěji však dochází k podhodnocení diverzity rozsivek. Může k němu docházet v případě neznalosti, anebo úplné nepřítomnosti rozlišovacích morfologických znaků, (Amato et al. 2007). K podhodnocení druhové diverzity sladkovodních rozsivek vedlo také jednotné a nekritické používání evropských určovacích klíčů i v jiných částech světa (Vanormelingen et al. 2007). Z těchto důvodů nebylo biodiverzitě sladkovodních rozsivek věnováno příliš pozornosti a převažovalo paradigma ubikvitního rozšíření.

S rozvojem molekulárních metod, které umožňují rozlišit kryptické a pseudokryptické druhy, začala být biogeografii rozsivek věnována větší pozornost. Řada současných studií naznačuje, že mnohé druhy rozsivek, obývají geograficky omezené oblasti podobně jako makroorganizmy (Chao et al. 2006; Foissner 2006; Kooistra et al. 2008; Evans et al. 2009). Některé druhy jsou dokonce považovány za endemické (Spaulding et al. 1999; Kilroy et al. 2003; Kociolek et al. 2004). Příkladem je např. druh *Frustulia maoriana* (Beier & Lange-Bertalot 2007), *Luticola desmetii* (Kopalová et al. 2011), či *Nitzschia invisitata* (Trobajo et al. 2013). K popisu endemického výskytu je však nutné přistupovat kriticky. Vzhledem k malému množství biogeografických dat existuje reálné nebezpečí chybných závěrů (Vanormelingen et al. 2007).

Za kosmopolitní je v současnosti považováno jen malé množství sladkovodních rozsivek. Patří mezi ně např. některé druhy rodu *Skeletonema* (Kooistra et al. 2008), některé linie z druhových komplexů *Eunotia bilunaris* (Vanormelingen et al. 2008), *Sellaphora pupula*

(Evans et al. 2009), či *Nitzschia palea* (Trojano et al. 2009). U kosmopolitních druhů je zapotřebí mít na mysli také vliv lidské činnosti (migrace lidí, zvířat, přemísťování materiálů), která by mohla mít vliv na jejich kosmopolitní rozšíření (Harper 1994; Kociolek & Spaulding 2000; Kilroy et al. 2009).

Cenné informace o historickém vývoji a rozšíření rozsivek mohou poskytnout fosilní nálezy. Kvůli jejich nedostatku jsou v současnosti informace tohoto typu spíše útržkovité (Sims et al. 2006).

Fyziologické předpoklady pro mají jistě také vliv na současné rozšíření sladkovodních rozsivek. Mezi stresové faktory, kterým jsou buňky během šíření vystaveny patří osmotický stres, vysychání, změna pH či větší výkyvy teplot.

Během desikačních a teplotních experimentů se čtyřiatřiceti druhy sladkovodních bentických rozsivek zaznamenali Souffreau et al. (2010, 2013) zvýšenou odolnost vůči vysychání a teplotním fluktuacím pouze u terestrických zástupců a jejich klidových stádií. Vegetativní buňky ostatních sladkovodních linií byly vůči zmiňovaným stresovým faktorům velmi citlivé. Pro rozsivky je pravděpodobně fyziologicky velmi náročné přemísťovat se mezi lokalitami pomocí vzdušných proudů, či prostřednictvím vodního prostředí, jako je tomu běžně např. u sinic a mikroskopických zelených řas (Souffreau et al. 2010)

Vyverman et al. (2007) porovnali míru vlivu historických (počet a rozložení vodních ploch v dané oblasti) a environmentálních (pH, mikroprvky) faktorů na globální rozložení diverzity rozsivek. Výsledky této práce připisují větší význam historickým faktorům. Potvrzují tedy, že je rozšíření rozsivek určováno historickými procesy jako je kolonizace, extinkce, šíření či migrace. Diverzitní gradienty souhlasí nejen s vysokou provincialitou a relativně častým endemismem v oblastech Austrálie, Nového Zélandu a Antarktidy, ale i se zvýšenou diverzitou v oblastech severní Evropy a ve východní části USA (Lange-Bertalot & Metzeltin 1996; Potapova & Charles 2002). Roli šíření ukázali i Telford et al. (2006). Ve své práci zkoumali šestnáct datasetů jezerních rozsivek z Evropy a ze Severní Ameriky. Zjistili, že druhová bohatost je maximální v nejčastějším pH v dané oblasti. Kdyby se rozsivky šířily neomezeně, byly by přizpůsobeny průměrnému pH všech oblastí. Na základě tohoto zjištění dochází k závěru, že i přes ohromné populace rozsivek je jejich globální šíření zřejmě příliš pomalé na to, aby překonalo lokální metakomunitní procesy. Verleyen et al. (2009) ve své práci ukázali, že vliv na složení rozsivkových společenstev mají globální (vzdálenost regionů) i lokální (pH, konduktivita) faktory. Faktory se projevují v různé míře podle geografického měřítka dané

studie. Studie na menší geografické měřítku často ukazují velký vliv environmentálních faktorů a minimální vliv šíření. Příkladem je studie Passy (2010). Druhá pestrost rozsivek v lotických habitatech v USA se podle Passy (2010) odvíjí od hierarchického vlivu lokálních (složení půdy, mokřady, přítomnost lesních porostů) a regionálních (celková charakteristika povodí) podmínek.

2.3 Charakteristika rodu *Frustulia* a jeho zastoupení v severní Evropě

Druhy rodu *Frustulia* jsou běžně a v hojném počtu ve fyto-bentosu, epipelonu či epifytonu sladkých až brakických vod, zejména pak v mírně kyselých oligotrofních rašeliništích (Round et al. 1990; Siver & Baskette 2004). Rozšířeny jsou na severní i jižní polokouli. Vyskytují se ve formě jednotlivých buněk nebo v trubičkovitě uspořádaných koloniích obalených slizem. Buňky mají kosočtverečný až kopinatý tvar. Typickou strukturou křemičité schránky jsou dvě žebra, která se táhnou paralelně s raphe po celé délce vnitřní strany obou valv. V distálních částech a proximální oblasti buňky dochází ke styku žebor s heliktoglosami a s centrálním nodulem. U druhů podobných typovému druhu *F. saxonica* tvoří tyto struktury jeden celek. Existují ale výjimky; u druhu *F. vulgaris* nedochází, ke splynutí žebor v centrální oblasti buňky (Cox 1999). Morfologie heliktoglos, centrálního nodulu a míra jejich splynutí s žebry jsou charakteristické pro jednotlivé druhy. Na křemičité schránce jsou v řadách (strie) rozmístěné otvory (areoly). Hustota a uspořádání areol a strií jsou taktéž považovány za určující znaky. Druhově specifický je i způsob zakončení šterbinovitého raphe v centrální a koncových částech buňky. U rodu *Frustulia* může být raphe zakončeno jednoduchým pórem, nebo má tvar tvar písmene T, či Y (Round et al. 1990; Lange-Bertalot & Metzeltin 1996; Lange-Bertalot & Metzeltin 2001).

Vymezení druhů na základě morfologie komplikuje velká morfologická variabilita buněk a častý překryv znaků (Siver & Baskette 2004; Graeff et al. 2012). Fotodokumentace některých druhů je v klíčích Lange-Bertalot & Metzeltin 1996; Lange-Bertalot & Metzeltin 2001 značně nekonzistentní. Obě zmiňované komplikace platí zejména u komplexu druhů *F. crassinervia-saxonica*, jak ukázala Veselá et al. (2012).

Dle webových stránek www.algaebase.org je v současnosti akceptováno 96 druhů rodu *Frustulia*. Za centrum rodové diverzity je považována oblast Austrálie a Nového Zélandu (Vyverman et al. 1998; Sabbe et al. 2001; Kilroy et al. 2003). Většina druhů má pravděpodobně omezené rozšíření a některé jsou považovány za endemické (Foissner 2006; Kilroy 2007). Za kosmopolitní byly donedávna považovány druhy *F. saxonica* a *F. crassinervia* (Lange-Bertalot & Metzeltin 2001). Veselá et al. (2012) ukázala, že je tradiční vymezení těchto druhů problematické. Druhový komplex *Frustulia crassinervia-saxonica* má v současnosti pět linií a jen jedna z nich může být považována za kosmopolitní (Urbánková & Veselá 2013).

V severní Evropě, na kterou je zaměřena tato diplomová práce, byly nalezeny druhy *Frustulia septentrionalis* Lange-Bertalot, *F. gaertnerae* Lange-Bertalot, *F. quadrinuata*

Lange-Bertalot, *F. erifuga* Lange-Bertalot & Kammer, *F. disjuncta* Lange-Bertalot, *F. krammeri* Lange-Bertalot & Metzeltin (Lange-Bertalot & Metzeltin 1996, 2001).

Cílem této diplomové práce bylo:

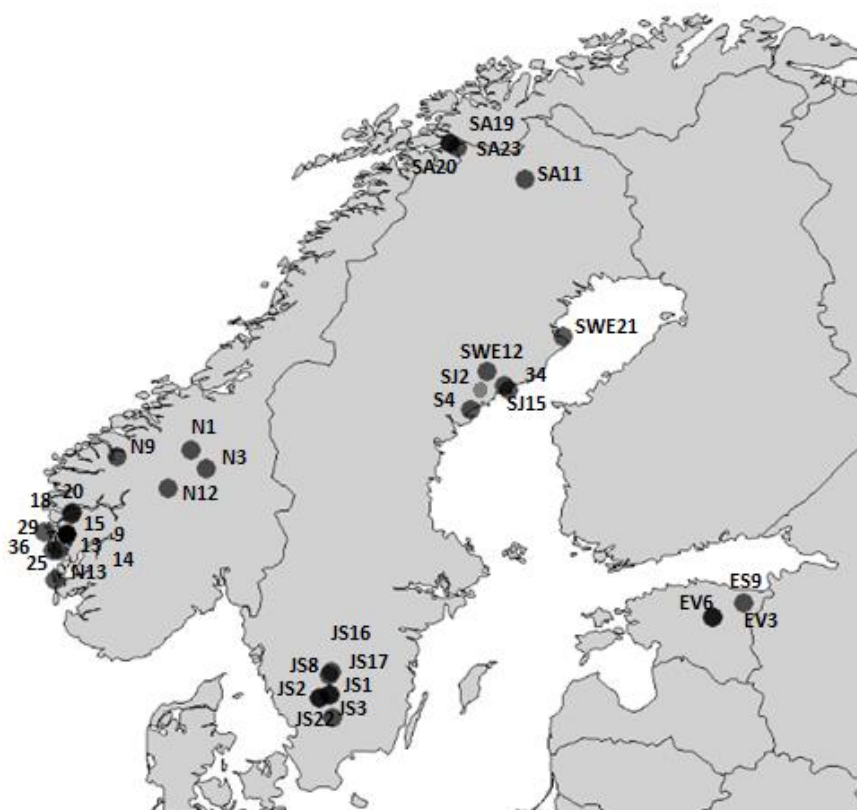
- 1) prozkoumat druhovou diverzitu rodu *Frustulia* v severní Evropě
- 2) zjistit, jestli je i u dalších tradičně vymezených druhů přítomna (pseudo)kryptická diverzita, podobně jako je tomu u komplexu druhů *F. crassinervia-saxonica*
- 3) rekonstruovat fylogenezi rodu *Frustulia* na základě několika molekulárních markerů
- 4) ověřit použitelnost kvalitativních a kvantitativních morfologických znaků rozsivkové schránky pro jednoznačné taxonomické zařazení druhů rodu *Frustulia*

Rod *Frustulia* byl pro tuto práci vybrán kvůli návaznosti na předchozí výzkum naší algologické skupiny (Veselá 2007; Urbánková 2009; Urbánková 2011; Veselá 2011; Fialová 2013).

3 Materiál a metody

3.1 Lokality a sběr vzorků

Vzorky byly získány v průběhu dvou let (květen 2012 - říjen 2013) ze čtyřiatřiceti lokalit v severní Evropě, viz Obr. 1. Odebírány byly ze sladkovodních habitatů (ombrotrofní rašeliniště, minerotrofní slatiniště, rašelinné litorály jezer, efemerní habitaty), jako směs epipelonu a epifytonu. Na každé lokalitě byly zaznamenány GPS souřadnice a změřeny hodnoty pH a konduktivity (multimetr WTW, pH/cond 340i/SET). Podrobná tabulka lokalit a daných naměřených hodnot je v Příloze 1. Vzorek SJ2 byl odebrán v okolí Umea, ale přesné souřadnice odběru nebyly zaznamenány.



Obr. 1 Mapa s vyznačenými místy odběrů

3.2 Izolace a kultivace kmenů

Lahvičky s přírodními vzorky byly umístěny v lednici bez přídavného osvětlení za teploty 17 °C. Při izolaci byl použit světelný mikroskop Olympus CX21. Buňky z přírodních populací byly izolovány pomocí skleněné pipety, která byla nad plamenem vytažena v tenkou kapiláru. Nasáté buňky byly přemísťovány mezi kapkami kultivačního média OGM tak dlouho, dokud se nepodařilo izolovat jedinou buňku. Izolované buňky byly přeneseny do komůrek plastových kultivačních destiček naplněných médiem OGM. Kmeny rostly v lednici při teplotě 18°C za stálého ozáření 5-15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu několika týdnů.

Složení a příprava kultivačního média OGM jsou popsány na stránkách Sbírký řas Přírodovědecké fakulty UK (CAUP). Základní roztok byl doplněn o pufr MES, který stabilizuje kyselé pH. Po sterilizaci v autoklávu byla do média přidána vitaminová směs a křemík ve formě Na_2SiO_3 (v poměru 1:250) pomocí injekční stříkačky a stříkačkového mikrofiltru. pH media bylo upraveno pomocí slabých vodných roztoků HCl, či NaOH ($c_{\text{HCl, NaOH}} = 0,1$ a $0,5 \text{ mol/dm}^{-3}$) na pH = 5,4–5,6.

3.3 Analýza DNA

Izolace DNA, PCR a sekvenace. DNA byla izolována pomocí pufru InstaGene Matrix (Bio-Rad). Z kultivační destičky bylo sterilní mikropipetou odebráno 10 μl rostoucí kultury a přeneseno do stripu. Po centrifugaci (13 500 rpm/ 3 min; SIGMA 4-16K Centrifuge) bylo do stripu přidáno 30 μl pufru. Směs byla vortexována 30 vteřin (vortex Genie 2), krátce stočena v centrifuze a vložena do cykleru (Eppendorf Mastercycler ep S). Pro izolaci byl použit následující cyklus: 1 min - 95 °C, 30 min - 56 °C, 8 min - 99 °C. Po skončení cyklu byly vzorky krátce protřepány na třepačce a zcentrifugovány (3600 rpm / 4min). Vrchní část směsi s přečištěnou DNA byla přenesena do nových stripů, které byly uskladněny v mrazícím boxu jako zásobní roztok pro PCR. Sedlina se zbytky křemičitých schránek byla uschována pro možné pozdější využití při studiu morfologie.

Pro PCR amplifikaci byly vybrány následující genové oblasti s pro ně specifickými primery (Tab 1).

Tab. 1 Primery použité pro amplifikaci vybraných markerů ; * nově navržené primery

molek. markery	forward primery	reverse primery
D1/D2 LSU rDNA	LSU-DF1 (Veselá et al. 2012)	LSU-710DR (Veselá et al. 2012) LSU-740DR (Veselá et al. 2012)
	PUF1 (AGCCCACCATGYGAATCTGC)*	PUR1 (TGCTCACA CT CAGACCGTTCTCCC)*
rbcL-3P	cfD (Hamsher et al. 2011)	DPrbcL-7 (Levialdi Ghiron 2006)
	F1P (TGCTCACA CT CAGACCGTTCTCCC)*	R1P (TGCTCACA CT CAGACCGTTCTCCC)*
psbA	psbA-F (Yoon et al. 2002)	psbA_R1 (Yoon et al. 2002)
SSU	34F (Thüs et al. 2011)	ITS5-DR (Urbánková & Veselá 2013)
+ internal primers	528 F (Montresor et al. 2004) 1055F (Montresor et al. 2004)	536 R (Montresor et al. 2004) 1055 R (Montresor et al. 2004)

K amplifikaci DNA byly použity polymerázy: AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems), nebo MyTaq DNA Polymerase (Bioline). Reakce byla provedena v objemu 20 µl. Složení PCR směsi a PCR cykly pro jednotlivé polymerázy a markery jsou uvedeny v Přílohách 2 a 3.

PCR produkty byly přečištěny octanem v kombinaci s etanolem, nebo pomocí kitu Geneaid (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit). Sekvence byla provedena společností Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Oblast D1/D2 LSU byla osekvenována u všech kmenů, zatímco oblasti psbA, rbcL-3P a SSU byly sekvenovány jen u vybraných vzorků. Vybrány byly vzorky, které měly odlišnou D1/D2 LSU sekvenci, nebo ty, které pocházely ze vzájemně vzdálenějších lokalit.

Zpracování sekvencí. Kvalita sekvencí byla vizuálně zhodnocena v programu SeqAssem (SequentiX). Nečitelné koncové části sekvencí byly odstraněny. Dvojznačné báze byly označeny příslušným kódem dle IUPAC. Nové unikátní sekvence byly dosekvenovány z druhé strany a byly spojeny v programu SeqAssem v jednu konsenzuální sekvenci. Soubor dat pro vytvoření alignmentu byl sestaven z unikátních sekvencí publikovaných v databázi NCBI GenBank, z mnou nalezených unikátních sekvencí a z dosud nepublikovaných psbA sekvencí poskytnutých od Pavly Urbánkové (Tab.2). Navíc byla z databáze GenBank, přidána (jako případná outgroupová skupina) sekvence pro geny rbcL a SSU druhu *Amphipleura pellucida*. Alignmenty sekvencí pro jednotlivé markery byly vytvořeny v programu MEGA 5.2.2 (Tamura et al. 2011) pomocí algoritmu ClustalW.

Tab. 2 Unikátní sekvence použité při tvorbě fylogenetického stromu

* ECT3568Amphipl; UN = vlastní unikátní sekvence, NA = data nebyla k dispozici, NZ = New Zealand, CZ = Česká republika, IE = Irsko, FR = Francie, DK = Dánsko, ZA = Jihoafrická republika, TX = Texas, SWE = Švédsko, NOR = Norsko, EST = Estonsko

vzorek	linie	lokalita	psbA	rbcL-3P	přístupové kódy v GenBank	
					SSU	D1-D2 LSU
NZ162	<i>F. cf. magliesmontana</i>	(NZ)	UN	HF562248	HF562287	HF562280
NZ177	<i>F. aotearoa</i>	(NZ)	UN	HF562249	HF562286	HF562281
F197	<i>F. erifuga</i>	(CZ)	UN	HF562244	HF562295	HE601709
F380	<i>F. erifuga</i>	(IE)	UN	HF562245	UN	HE601710
F378	<i>F. curvata</i>	(IE)	UN	HF562251	HF562297	HE601711
NZ37	<i>F. gondwana</i>	(NZ)	UN	HF562246	HF562288	HF562284
NZ30	<i>F. paulii</i>	(NZ)	UN	HF562250	UN	HF562282
F350	<i>F. crassinervia</i>	(IE)	UN	HE601712	HF562290	HE601712
NZ44	<i>F. maoriana</i>	(NZ)	UN	HF562271	UN	HF562247
NZ184	<i>F. crass.-sax.</i>	(NZ)	F45	HF562254	UN	HF562274
F259	<i>F. crass.-sax.</i>	(FR)	UN	HF562236	HF562292	HE601714
F45	<i>F. crass.-sax.</i>	(FR)	UN	HF562237	HF562291	HE601723
19_2B	<i>F. crass.-sax.</i>	(DK)	F45	HF562240	HF562294	HE601733
MIC10_15	<i>F. vulgaris</i>	(ZA)	UN	HF562253	UN	HF562285
NZ190	<i>F. cassieae</i>	(NZ)	UN	HF562252	HF562289	HF562283
*	<i>Amphipleura pellucida</i>	(TX)	NA	KC309549	KC309477	NA
KD2	<i>F. septentrionalis</i>	(SWE)	UN	UN	UN	UN
KF6	<i>F. gaertnerae</i>	(SWE)	UN	UN	UN	UN
KG11	<i>F. sp.</i>	(SWE)	UN	UN	UN	UN
28-11B	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(NOR)	F45	UN	F45	UN
28-11D	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(NOR)	F45	UN	F45	UN
WB1	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(EST)	F45	UN	F45	UN
WB3	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(EST)	F45	UN	F45	UN
XH6	<i>F. crass.-sax. V</i>	(SWE)	F45	F45	F45	UN
VB2	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(SWE)	F45	F45	F45	UN
VB8	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(SWE)	F45	F45	F45	UN
XD3	<i>F. crass.-sax. VI</i>	(SWE)	F45	F45	F45	UN

Fylogenetické analýzy. V programu PAUP (Swofford 2001) bylo pomocí ILD testu (Incongruence Length Difference test) ověřeno, že jednotlivé markery neprošly signifikantně odlišnou evolucí, a je tedy možné je použít k tvorbě konkatenovaného alignmentu. Alignmenty pro jednotlivé markery byly ručně konkatenovány v programu BioEdit (Hall 1999).

Evoluční modely pro jednotlivé markery byly vybrány na základě Akaikeho informačního kritéria (AIC) v programu jModelTest 0.1 (Guindon & Gascuel 2003). Pro markery rbcL-3P, psbA a D1/D2 LSU byl jako nejvhodnější stanoven model GTR s gamma korekcí (GTR+G). Pro marker SSU byl vybrán model HKY s gamma korekcí (HKY+G).

Fylogenetický strom byl nalezen metodou Bayesiánské fylogenetické inference (BI). BI byla provedena programem MrBayes verze 3. 2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) Použity byly dva paralelní běhy Monte Carlo Markovových řetězců (MCMC), každý se třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Analýza běžela po dobu 5 milionů generací. Stromy byly zaznamenány každých 100 generací. Hodnota burn-in byla získána pomocí příkazu sump.

Dále byl výchozí alignment analyzován v programu Garli (Zwickl 2006) pomocí metody Maximum likelihood (Felsenstein 1973) při nastavené strategii max. 10 000 stromů. ML analýza měla 100 replikací. Bootstrapové podpory větví byly stanoveny v programu PAUP (1000 replikací).

Získaný konsenzuální strom byl zobrazen s hodnotami ML bootstrapu a PP (posterior probability) jako zakořeněný (midpoint rooting) v programu FigTree (Morariu et al. 2009). Dílčí grafické úpravy stromu byly provedeny v programu Adobe Illustrator (Adobe CS3).

3.4 Analýza morfologie

Světelná mikroskopie (LM) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Pro LM byly schránky vyžihány nad plamenem kahanu a fixovány syntetickou pryskyřicí Naphrax (Pouličková 2011). Takto připravené preparáty byly pozorovány pomocí světelného mikroskopu Olympus CX21 s Nomarského kontrastem. Morfometrické údaje získané pomocí LM byly použity pouze u 10 buněk z kmenové kultury vzorku KG11 (*F. sp.*, Příloha 4), neboť od něj chyběla biomasa potřebná pro přípravu vzorků pro SEM.

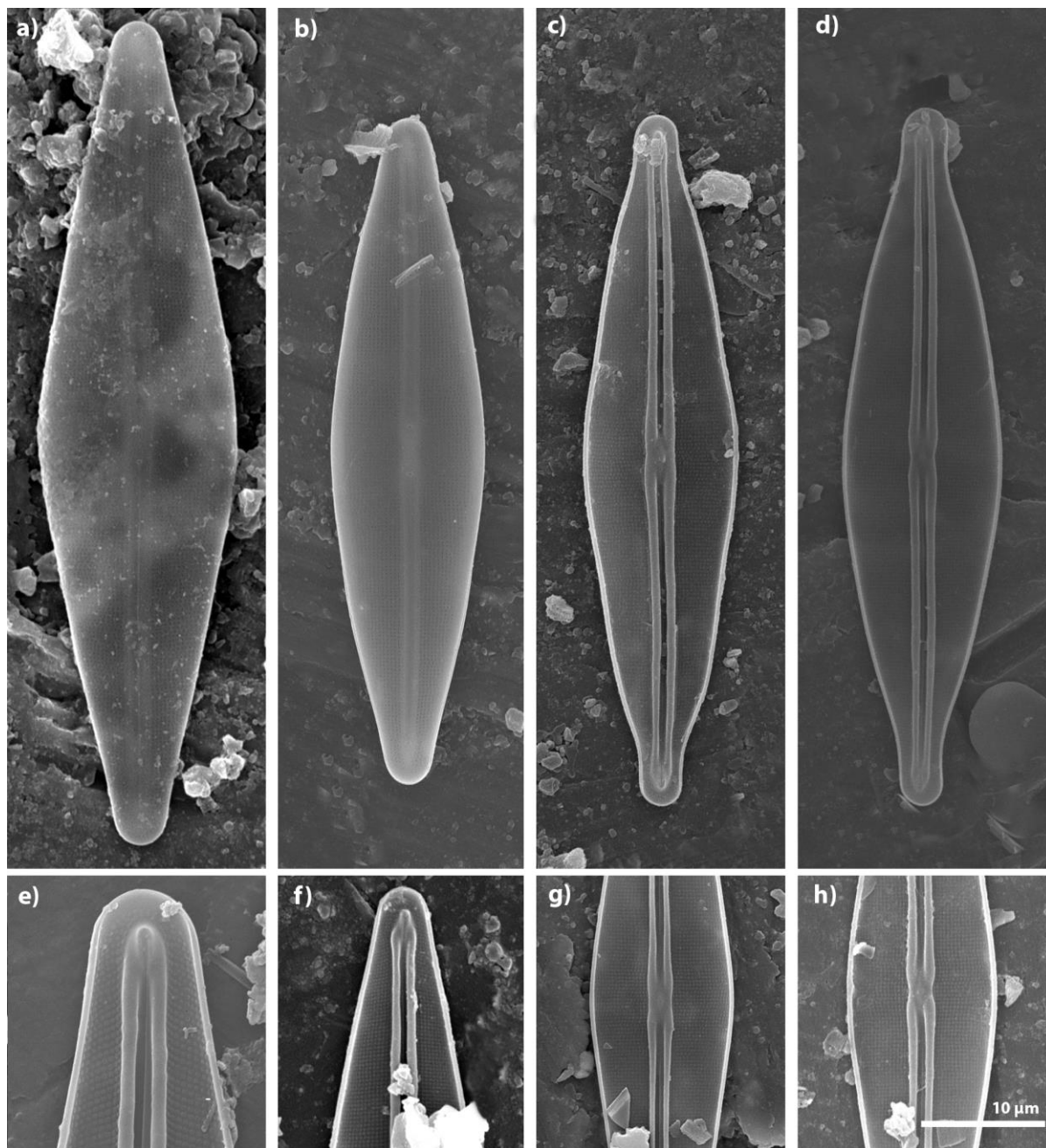
Pro analýzu morfologie byly z izolátů vybrány kmeny na základě zjištěné molekulární variability (tedy zejména ty, které měly jiné sekvence než druhy z komplexu *Frustulia crassinervia-saxonica*) a kmeny ze vzájemně vzdálenějších lokalit. Vybrané kmeny byly pěstovány v petriho miskách, aby byl dostatek biomasy k přípravě vzorků pro SEM (kmeny: 28-9C, 28-9D, 29-9D, 29-4F, 28-7G, 26-4B, 28-10E). U kmenů, u kterých nebyl dostatek biomasy (kmeny: 5E8, 5F8, VB11, VC8, XE10), byla použita pro přípravu SEM vzorků sedlina se zbytky schránek po PCR (Richlen & Barber 2005). Z přírodních vzorků byly pro SEM vybrány lokality podle pozorování v LM a podle jejich geografické polohy (vzorky: 9, 20, 25, 29, 36, JS3, N1, N3, S4, SA11, SA20, SJ15, SJ2, Swe21) (Příloha 5).

Vzorky určené pro SEM byly zbaveny organického materiálu reakcí peroxidu vodíků s dichromanem draselným (Krammer & Lange-Bertalot 1986). Poté byly přeneseny na hliníkové bločky, vysušeny na elektrické plotýnce a pokoveny tenkou vrstvou zlata.

Tradiční morfometrická data a jejich statistické vyhodnocení Morfometrická analýza byla provedena na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu JEOL JSM-6380LV. U preparátů z kultur bylo vždy měřeno 10 buněk. U preparátů z přírodních populací byla snaha naměřit 20 náhodně vybraných buněk rodu *Frustulia*, což se vždy nepodařilo (6 – 20 buněk bylo měřeno u vzorků: 9, 20, 25, 29, 36, S4, SA20 a Swe21). Celkem bylo analyzováno 67 buněk z kultur a 207 buněk z přírodních populací. Pomocí programu ImageJ (Abràmoff 2004) byly na fotografiích ze SEM změřeny: délka a šířka buňky, vzájemný poměr délky a šířky buňky, hustota strií a areol (počet / 10 μm). Strie a areoly byly měřeny třikrát v rámci jedné buňky (středová oblast a obě koncové části) a zprůměrovány.

Vizuálně byly hodnoceny také kvalitativní znaky, které byly podle svého stavu oskórovány nulou nebo jedničkou. Hodnocen byl celkový tvar buňky (kosočtvercový = 0, kopinatý = 1), tvar zakončení buňky (bez hlavičky = 0, s hlavičkou = 1), splynutí žeber a centrálního nodulu

(nodulus bez bočního vykrojení = 0, osmičkovitý tvar nodulu = 1) a heliktoglos (bez porte-crayon = 0, s porte-crayon = 1), zvlnění okrajů buňky (rovný = 0, zvlněný = 1) a uspořádání strií v apikálních částech schránky (paralelní uspořádání = 0, konvergentní uspořádání = 1) (Obr. 2),



Obr. 2 Hodnocené kvalitativní znaky: celkový tvar (a,b) – a) kosočtvercový tvar schránky, b) kopinatý tvar schránky; c) zvlněnost okrajů schránky; (c,d) – buňky s hlavičkatými konci; typ heliktoglosy (e, f) – e) jazýčkovitá heliktoglosa bez porte-crayon, f) heliktoglosa s výrazným porte-crayon; uspořádání strií (e, f) – u obou obrázků je patrná výraznější konvergence strií v horní třetině schránky (např. u obr. b, c, d je tato konvergence strií omezena jen na nejdálší části schránky); charakter centrálního nodulu (g, h) – g) bez výraznějšího bočního vyříznutí, h) centrální nodulus více profilovaný do tvaru osmičky

LM snímky vzorku KG11 neumožnily změřit hustotu strií a areol a zhodnotit některé ultrastrukturní znaky na valvě. Měřena byla tedy pouze délka a šířka buňky a z kvalitativních znaků byl hodnocen celkový tvar, zvlnění okrajů buňky, hlavičkatost konců buňky a tvar heliktoglosy a centrálního nodulu.

Pro účely PCA analýzy (Principal component analysis) kvantitativních znaků, byla všechna data normalizována (odečtením průměrné hodnoty a vydělením směrodatnou odchylkou). Vzorek KG11, u kterého chyběla některá kvantitativní data (hustota strií a areol) byl taktéž zahrnut do analýzy a na místo chybějících dat byly programem přiřazeny nejbližší přítomné hodnoty. Výpočet PCA byl proveden v programu XLSTAT (Adinsoft) a na výsledky byly mapovány hodnocené kvalitativní znaky.

Fotografie buněk získané SEM byly porovnány se snímky v determinační literatuře a publikovaných článcích (Lange-Bertalot & Metzeltin 2001; Beier & Lange-Bertalot 2007; Siver & Baskette 2004). Identifikace druhů byla provedena nezávisle třemi osobami.

Grafické úpravy fotografií byly prováděny v programu Adobe Photoshop (Adobe CS3).

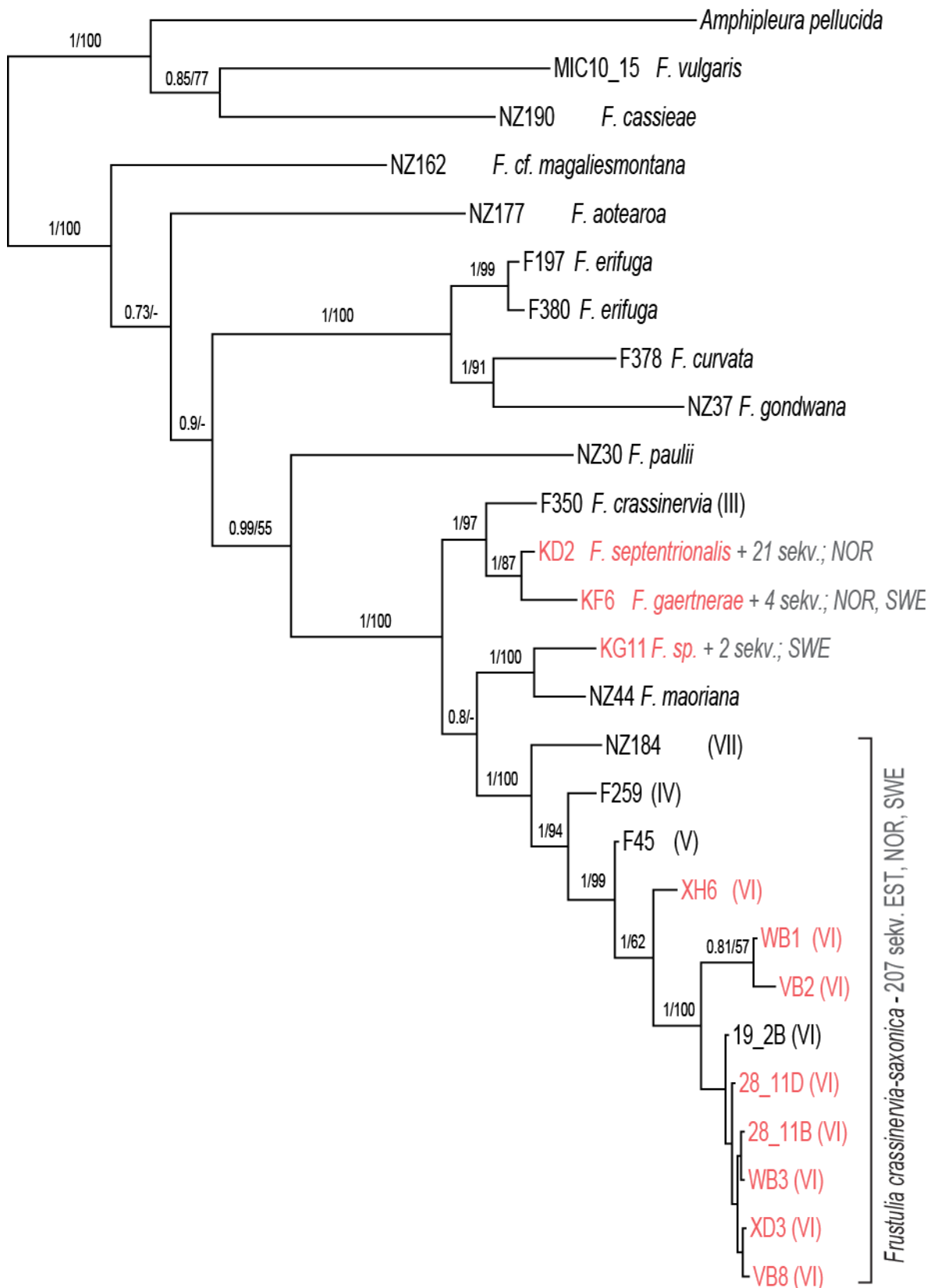
4 Výsledky

4.1 Molekulární data a fylogenetické analýzy

Z celkem 240 monoklonálních izolátů se podařilo získat 234 sekvencí (sekv.) D1/D2 LSU. Sekvence D1/D2 LSU byly porovnány se sekvencemi rodu *Frustulia*, které jsou uloženy v databázi GenBank a byly přiřazeny k jednotlivým druhům či liniím na základě 99-100% podobnosti. Nejvíce izolátů patřilo k druhovému komplexu *F. crassinervia-saxonica* - 201 sekv. bylo z linie VI a 6 sekv. z linie V (Veselá et al. 2012). Protože linie nelze morfologicky odlišit (Veselá et al. 2012), jsou v následující morfologické analýze jednotně označeny jako *F. crassinervia-saxonica*. Zbylé sekvence tvořily tři klastry, které nebylo možné přiřadit k druhům v GenBank. Na základě morfologie byly dva z nich určeny jako *F. septentrionalis* (21 sekv.) a *F. gaertnerae* (4 sekv.). Poslední je pravděpodobně nový druh a byl označen *F. sp.* (2 sekv.). Porovnání morfologie kmenů s determinační literaturou je v tabulce 3. Tyto druhy neměly žádnou vnitrodruhovou variabilitu nejvariabilnějšího markeru (D1/D2 LSU), ale mezidruhové rozdíly byly velké.

Markery *rbcL-3P*, *psbA* a *SSU* poskytovaly u všech zkušebních vzorků v rámci jednoho druhu stejné sekvence, a proto byly osekvenovány jen u vybraných kmenů. Kmeny pro sekvenaci těchto markerů byly vybrány na základě variability D1/D2 LSU a nebo podle polohy zdrojové lokality. Celkem bylo získáno 57 sekv. *rbcL-3P* (Příloha 1), 16 sekv. *psbA*, a 8 sekv. *SSU* (Tab. 2). *ILD* test potvrdil, že jednotlivé markery podporují stejnou evoluční hypotézu ($p = 0.226000$; markery nelze konkatenovat v případě, že je $p < 0,05$). Výsledný konkatenovaný alignment měl 4192 párů bazí (bp) a tvořilo ho sedmadvacet unikátních sekvencí. Délka dílčích částí alignmentu byla: *psbA* - 965 bp., *rbcL-3P* - 867 bp, *SSU* -1736 bp. a D1/D2 LSU - 624 bp.

Linie IV- VII druhového komplexu *F. crassinervia-saxonica* (Veselá et al. 2012, Urbánková & Veselá 2013) tvoří ve fylogenetickém stromě dobře podpořený clade 1/100 (BI/ML). Linie III (F350) s morfologií *F. crassinervia* tvoří skupinu s *F. septentrionalis* a *F. gaertnerae* (1/97). Sekvence druhu *F. sp.* (kmen KG11) spadají s vysokou podporou BI a ML (1/100) ke druhu *F. maoriana*.



Obr. 3 Fylogenetický strom nalezený metodou BI. Statistická podpora větví byla spočítána i metodou ML. Podpory větví jsou uvedeny v pořadí BI/ML; červeně vlastní odběry; čísla v závorce označují linie podle Veselá et al. 2012

4.2 Morfologie a identifikace druhů

Celkem bylo vyhodnoceno 264 SEM fotografií buněk (57 z kultur, 207 z přírodních populací) a 10 buněk z LM (druh *F. sp.* - kmen KG11). Morfologie kmenů byla porovnána s determinační literaturou (Tab. 3).

Tab. 3 Porovnání maximálních a minimálních hodnot naměřených u vzorků z kultur, z přírodních populací a hodnot udávaných v publikacích. Všechny hodnoty jsou udávány v mikrometrech (μm); určeno dle: Lange-Bertalot & Metzeltin 1996, 2001 [1, 2]; Lange-Bertalot & Beier 2007 [3]

		délka valvy	šířka valvy	areoly/10 μm	strie/10 μm
<i>F. crassinervia-saxonica</i>	kultura	44 - 67	11-16	35 - 40	33 - 35
	přírodní	38 - 91	10 - 17	31 - 48	31 - 37
	Publikace [1, 2]	60-80	12-15	30	30
	Publikace [1, 2]	30 – 55	8 – 12.5	30 - 35	30-35
<i>F. septentrionalis</i>	kultura	58 - 86	13 - 20	32 - 40	30 - 35
	přírodní	58 - 92	14 - 21	33 - 36	29 - 35
	Publikace [1, 2]	70-90	17-20	28-29	28-29
<i>F. gaertnerae</i>	kultura	29 - 47	7-12	39 - 60	29 - 54
	přírodní	39 - 34	10 - 8	40 - 48	35 - 44
	Publikace [1, 2]	33-48	9-11	40	31-33
<i>F. sp.</i>	kultura	45 - 49	13 - 16	NA	NA
	přírodní	37 - 46	10 - 12	35 - 40	33 - 38
	Publikace [3]	36-53	12.5-14	27-29	28-30

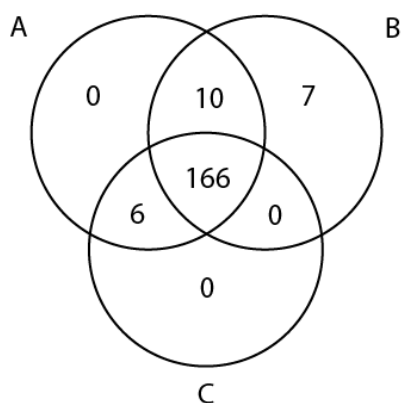
Poměr druhů zastoupených v izolovaných liniích a druhů stanovených v přírodních populacích byl podobný (Tab. 4)

Tab. 4 Počty buněk jednotlivých druhů u vzorků z kultur a z přírodních populací

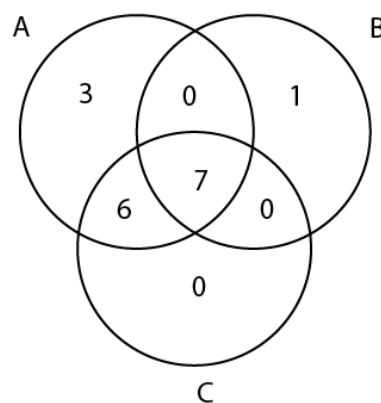
	Přírodní	Kultura
<i>F. crass.-sax.</i>	184	207
<i>F. septentrionalis</i>	13	21
<i>F. gaertnerae</i>	5	4
<i>F. sp.</i>	5	2

Druhové zastoupení v přírodních vzorcích bylo stanoveno nezávisle třemi osobami (Obr. 4). Jako nejproblematictější druh pro určování na základě morfologie z tohoto experimentu vyšel druh *F. gaertnerae*. Do odlišných druhů byl zařazen celkem desetkrát. Po něm následuje komplex druhů *F. crassinervia-saxonica* se sedmi rozdílnými stanoveními. Jako nejsnadněji určitelný vyšly druhy *F. septentrionalis* a *F. sp.* Oba byli určeny jako jiný druh čtyřikrát.

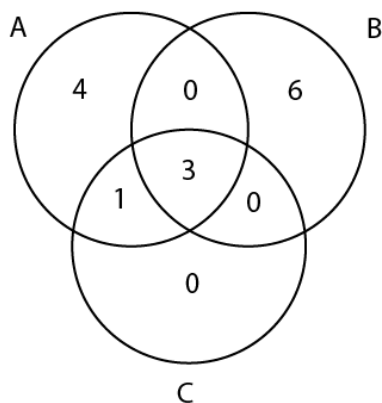
komplex druhů *F. crassinervia-saxonica*



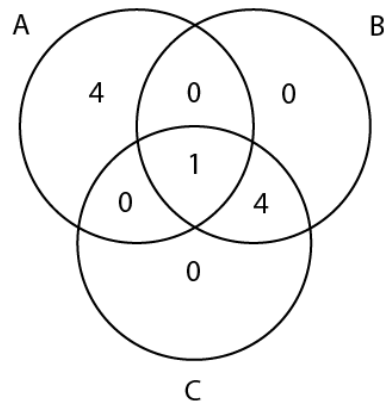
F. septentrionalis



F. gaertnerae

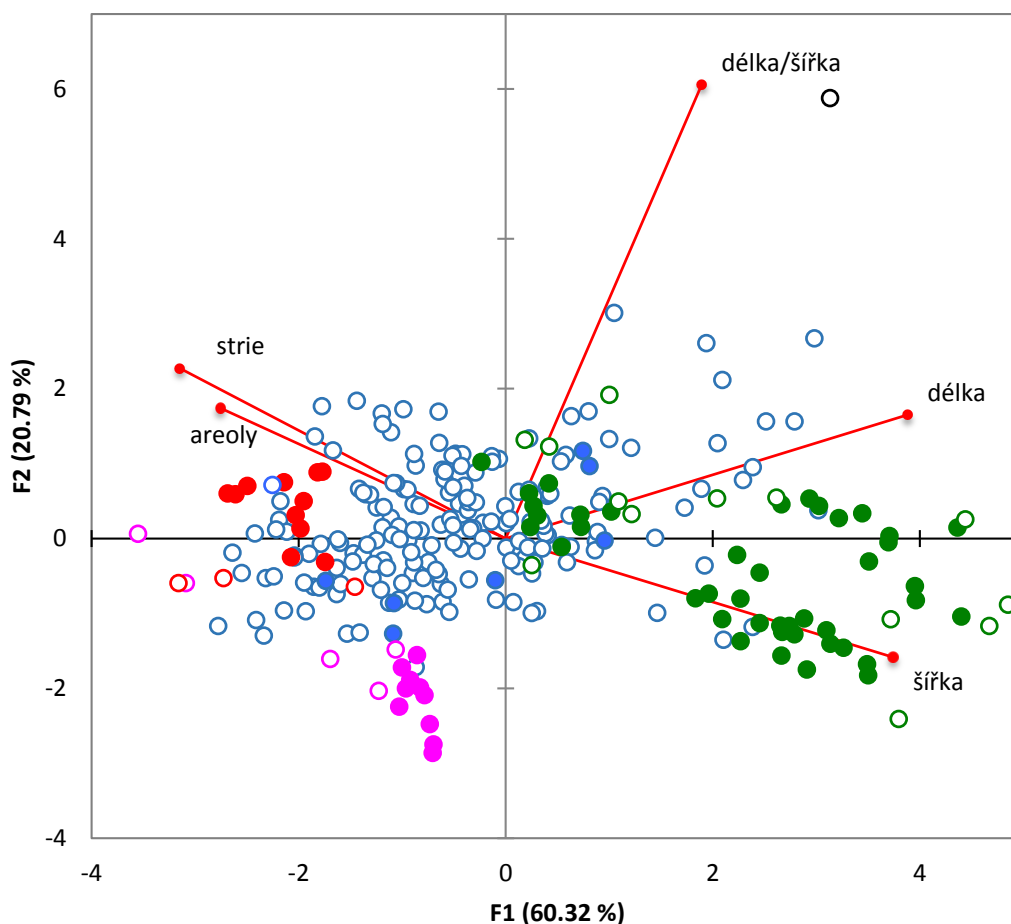


F. sp.



Obr. 4 Tři nezávislá stanovení druhů dle SEM fotografií buněk z přírodních populací; A, B, C = jednotlivá stanovení; čísla v diagramech znázorňují vzájemnou shodu určení

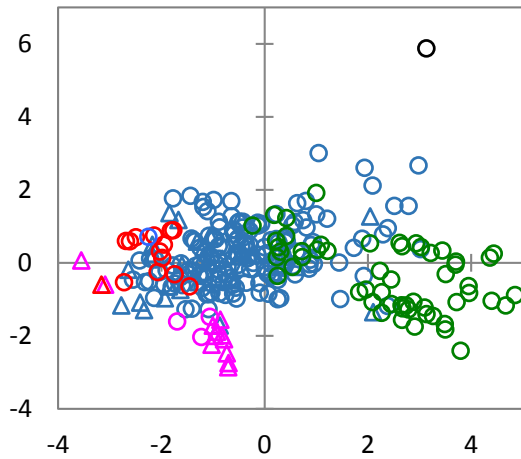
PCA analýza pomohla zhodnotit významnosť jednotlivých kvalitativních znaků, použitých při zařazení pozorovaného objektu do druhu (Siver & Baskette 2004). Výsledné PCA grafy, vypovídají o celkové variabilitě a rozložení pozorovaných kvantitativních (Obr. 5) a kvalitativních (Obr. 6-9) proměnných u všech 274 (SEM, LM) měřených buněk z kmenových kultur a z přírodních populací.



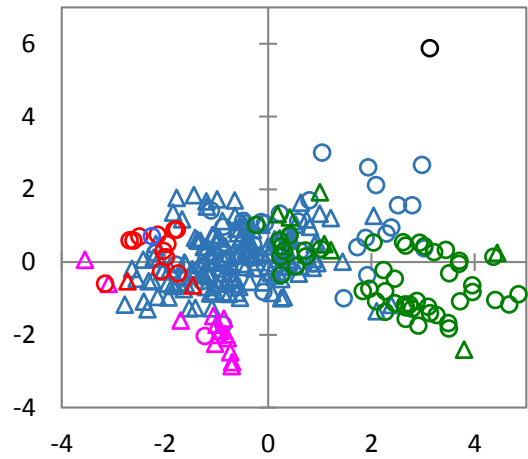
Obr. 5 PCA analýza kvantitativních znaků měřených na buňkách z kultur a z přírodních populací *F. gaertnerae* = červená; *F. septentrionalis* = zelená; *F. sp.* = růžová; *F. crassinervia-saxonica* = modrá; *F. crass.-sax.* iniciační buňka = černá; prázdný znak = buňka z přírodní populace; plný znak = buňka z kultury

První tři osy vysvětlily 93,9% variability. První osa vysvětlila 60,3%, druhá osa 20,8% a třetí osa 12,8% celkové variability. S první osou pozitivně koreluje délka (0,952) a šířka (0,917). Negativně s ní koreluje hustota areol (-0,676) a strií (-0,772). S druhou osou koreluje především poměr délky a šířky (0,872). S třetí osou koreluje především hustota areol (0,678)

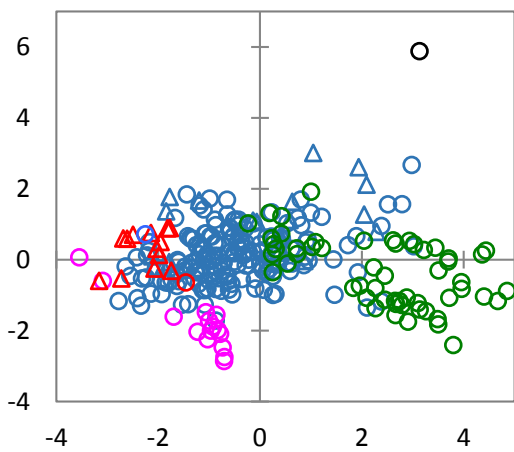
Popisky: *F. gaertnerae* = červená; *F. septentrionalis* = zelená; *F. sp.* = růžová; *F. crassinervia.-saxonica* = modrá; *F. crass.-sax.* Iničiální buňka = černá; prázdný znak = buňka z přírodní populace; plný znak = buňka z kultury



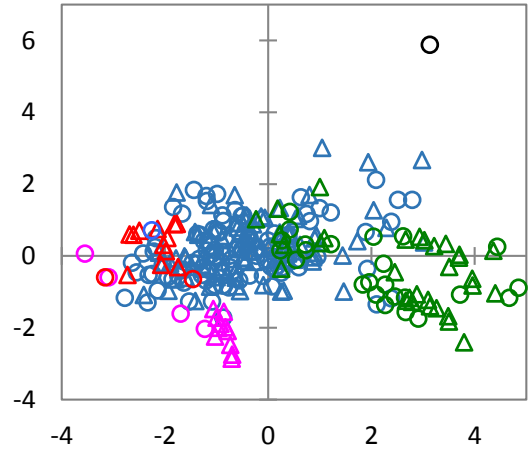
Obr. 6 Celkový tvar schránky. Trojúhelník = kopinatý tvar buňky, kroužek = kosočtvercový tvar buňky



Obr. 7 Hlavičkatost. Trojúhelník = hlavičkaté zakončení buňky, kroužek = zakončení bez hlavičky

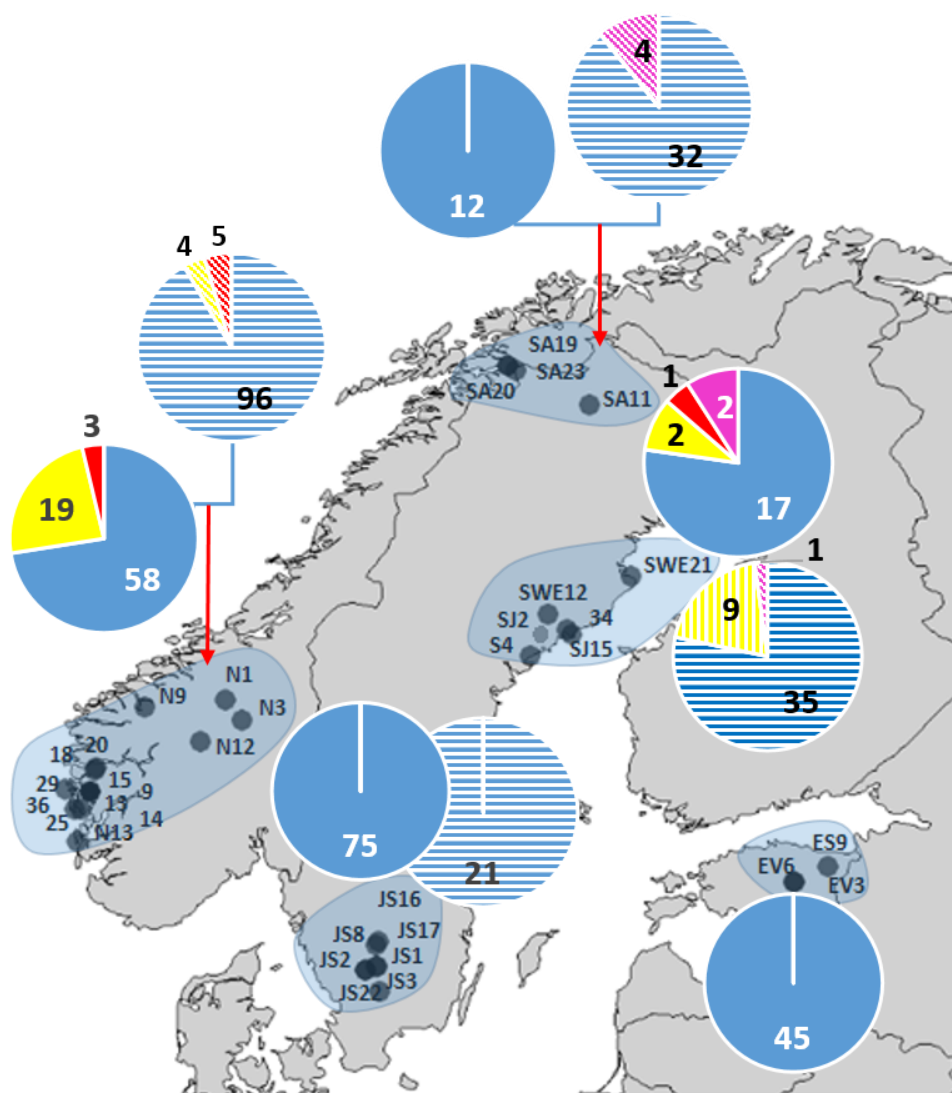


Obr. 8 Splynutí žeber a centrálního nodulu. Trojúhelník = osmičkovitý tvar nodulu, kroužek = nodulus bez bočního vykrojení



Obr.9 Splynutí žeber a heliktoglos. Trojúhelník = s porte-crayon; kroužek = bez porte-crayon

Na všech lokalitách dominovali ve vzorcích zástupci druhového komplexu *F. crassinervia-saxonica* (Veselá et al. 2012). Druhy *F. septentrionalis* a *F. gaertnerae* byly nalezeny v oblasti jihozápadního Norska a na východě středního Švédska. Druh *F. sp.* byl určen ve vzorcích ze severu a z východní oblasti středního Švédska (Obr. 10). Fyzikálně-chemické parametry (pH a konduktivita) jednotlivých odběrových stanovišť jsou uvedeny v Příloze 1.



Obr. 10 Druhové zastoupení na odebraných lokalitách. Modrá = *F. crassinervia-saxonica*; žlutá = *F. septentrionalis*; červená = *F. gaertnerae*; růžová = *F. sp.*; Souvislá výplň = kmeny analyzované molekulárními metodami (234 sekvencí); vzorková výplň = druhy z přírodních populací určené dle morfologie (207 SEM fotografií)

5 Diskuze

5.1 Fylogeneze rodu *Frustulia*

Rod *Frustulia* je řazen do čeledi Amphipleuraceae spolu s rody *Amphipleura*, *Frickea*, a *Cistula*. Synapomorfii čeledi je přítomnost paralelních žeber, která se táhnou podél celé buňky (Round et al. 1990). U typového druhu, *F. saxonica*, splývají žebra s heliktoglosami a s centrálním nodulem. U některých druhů řazených do rodu *Frustulia* však tyto struktury nesplývají (např. *F. vulgaris*), nebo žebra chybí a konce raphe jsou zahnutá k jedné straně buňky (např. *F. creuzbergensis*) (Kociolek et al. 2011). Na základě kladistické analýzy morfologických znaků zpochybňuje prof. Kociolek monofylii rodu (nepublikováno). Rod *Amphipleura* má stejně jako typické druhy rodu *Frustulia* kontinuální systém žeber na vnitřní straně valvy. V kladistické analýze založené na morfologii schránky je rod *Amphipleura* uvnitř rodu *Frustulia* (Cox & Williams 2006). Sekvence druhu *Amphipleura pellucida* byla přidána do analyzovaného alignmentu. Fylogenetické vztahy na bázi výsledné fylogeneze bohužel neumožňují otázku monofylie rodu *Frustulia* zodpovědět. Druhy umístěné na bázi fylogenetického stromu jsou morfologicky hodně odlišné. Toto uspořádání na fylogenetickém stromě by mohlo být způsobeno přitahováním dlouhých větví (long branch attraction). K artefaktu dochází jsou-li ve stromě druhy s dlouhými větvemi. Lepších výsledků by šlo dosáhnout rozšířením datasetu o netypické druhy rodu *Frustulia*, zařazením outgroupových skupin nebo osekvenováním více molekulárních markerů (Verbruggen & Theriot 2008). Srovnávací skupiny se ale špatně hledají, protože detailní fylogeneze penátních rozsivek zatím není (Theriot et al. 2010).

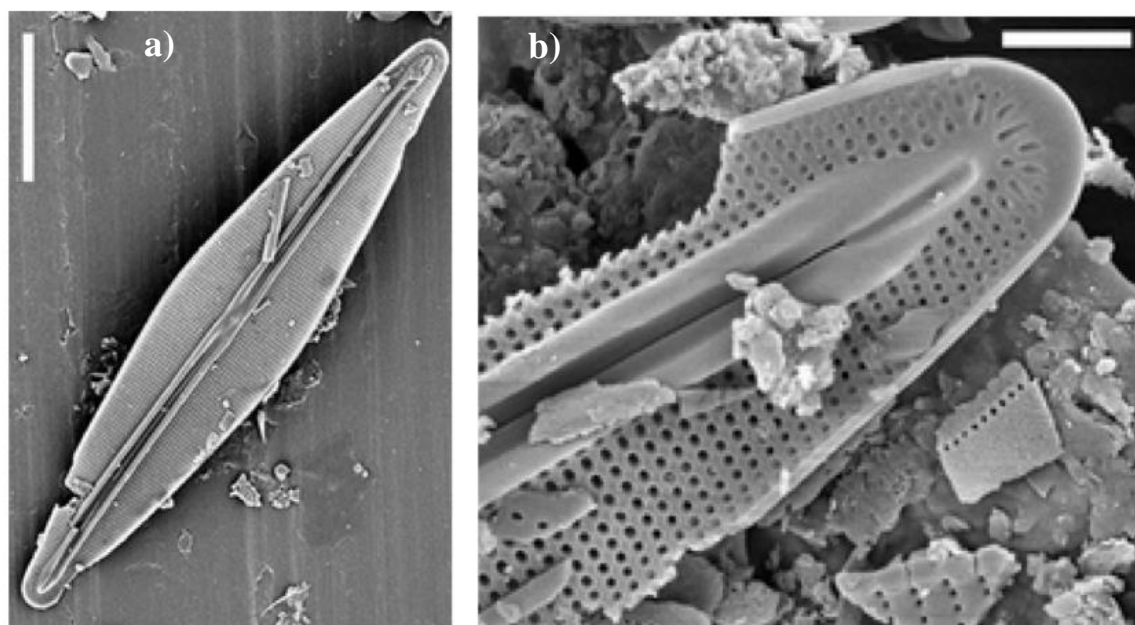
Co se týče zastoupení druhů je situace lepší u „typických druhů“ (podle Graeff et al. 2012) rodu *Frustulia*.

Multigenová fylogeneze prezentována v této práci byla v takovémto rozsahu u rodu *Frustulia* provedena poprvé. Fylogeneze je založena na čtyřech molekulárních markerech (D1/D2 LSU, rbcL-3P, psbA, SSU) a vyústila rozdělením izolovaných kmenů do čtyř skupin. Dvě skupiny byly podle své morfologie (Lange-Bertalot & Metzeltin 2001) určeny jako *Frustulia septentrionalis* a *Frustulia gaertnerae*. Oba tyto druhy tvoří společný dobře podpořený clade. Jejich sekvence jsou vzájemně snadno vymezitelné a mají nulovou vnitrodruhovou variabilitu. U těch to druhů se tedy nepotvrdila možná přítomnost (pseudo-) kryptických linií, jako tomu bylo v případě komplexu *F. crassinervia-saxonica* ve studii Veselá et al. (2012). Parafyleticky je k *F. septentrionalis* a *F. gaertnerae* připojen ještě druh

F. crassinervia (linie III, Veselá et al. 2012). Třetí linii tvoří nově nalezený druh *F. sp.*, která je statisticky velmi dobře podpořena a tvoří samostatný clade spolu s druhem *F. maoriana*. Čtvrtá skupina zahrnuje ve vzorcích hojně zastoupené druhové linie IV – VII z druhového komplexu *F. crassinervia-saxonica* (Veselá et al. 2012, Urbánková & Veselá 2013).

Dalo by se očekávat, že oproti ostatním druhům celkově dobře vymezené severské druhy *F. gaertnerae* a *F. septentrionalis* budou ve fylogenetickém stromě vytvářet společný jednotný clade, ale není tomu tak. Nově objevený nezařazený druh *F. sp.* spadá totiž do odlehlejšího cladu k novozélandskému druhu *F. maoriana*. Některé případy ale naznačují, že nalezený druh může být původem evropský, jen odtud nebyl zatím popsán (Vijver et al. 2008).

Zatímco u rodu *Pinnularia* našla Souffreau et al. (2011) morfologické trendy u jednotlivých cladů, u rodu *Frustulia* jsou morfologické rozdíly jen malé a morfologické trendy nejsou v rámci cladů patrné. Nejstarší nález rodu *Frustulia* pochází je z Giraffe Pipe v Kanadě a z Florissant Formation v Coloradu (Kociolek & Benson 2012). Oba nálezy jsou stejně staré jako nejstarší nález rodu *Pinnularia* (Souffreau et al. 2011). (Obr. 11). Oproti rodu *Pinnularia* mají zástupci rodu *Frustulia* i méně diverzifikované ekologické nároky, a je možné že během evoluce tolik nespeciovali.



Obr. 11 Dosud nejstarší nalezená fosílie křemičité schránky rodu *Frustulia*; a) celá schránka (měřítko 10 μm), b) detailní záběr heliktoglosy (měřítko 2 μm); fotografie převzata z: fmp.conncoll.edu/fmi/iwp/cgi?-db=Giraffe_Pipe_Fossils

5.2 Koncept druhu

Druh je základní jednotkou v naprosté většině biologických oborů. Vymezování a určování rozsivkových druhů na základě morfologie je problematické kvůli kryptické diverzitě a morfologické variabilitě způsobené specifickým životním cyklem rozsivek (Mann 1999). V praxi je určování rozsivkových druhů zatíženo značnou subjektivitou. Objektivnější zhodnocení diverzity rozsivek umožňují molekulární metody a fylogenetický druhový koncept (Mayden 1997), který je základem barcodingu. Barcoding využívá krátkých molekulárních markerů k identifikaci druhů a u méně prostudovaných skupin i k jejich vymezení (Hebert et al. 2003). Nevýhodou barcodingu je, že používá většinou jen jeden marker. Ten se může v rámci skupiny vyvíjet různě rychle (Urbánková & Veselá 2013).

Přesnější je vymezení druhů na základě více markerů (Alverson et al. 2007). Ve své práci jsem použil čtyři molekulární markery. Dva z nich, *rbcL-3P* a *LSU*, jsou kandidáty na barcode rozsivek (Hamsher et al. 2011, Urbánková & Veselá 2013). Všechny druhy byly jednoznačně identifikovatelné oběma markery. Jediný problém činí linie V a VI komplexu *F. crassinervia-saxonica* (Urbánková & Veselá 2013). Veselá et al. (2012) ukázala, že se tyto linie liší i svou ekologií. Aby bylo možné rozhodnout, jestli jsou to druhy, nebo jen ekotypy, které se kříží, bylo by nutné provést křížící experimenty, či molekulární studii na populační úrovni (mikrosatelity, metoda využívající next generation sequencing).

I když není morfologie vždy spolehlivá, nelze jí opomíjet, protože se používá pro hodnocení kvality vody, paleobiologické rekonstrukce klimatu a i v době next generation sequencing je stále hlavním zdrojem informací o ekologii a biogeografii druhu. Ve své práci jsem se tedy zaměřil i na to, jestli lze nalezené druhy odlišit na základě morfologie a to nejen v kulturách, ale i v přírodních populacích. Tam je morfologická variabilita způsobena také odlišnými podmínkami prostředí, které jsou v kulturách stejné. I když je identifikace druhů pomocí LM běžnější, byl pro analýzu morfologie použit SEM. Důvodem pro tuto volbu byla i) nižší kvalita světelného mikroskopu, který je v laboratoři k dispozici; ii) možnost analyzovat ultrastrukturní znaky schránky, které jsou důležité pro určování druhů v rámci rodu *Frustulia*. Morfologická data byla vyhodnocena pomocí PCA. PCA Diagramy mi poskytly prostřednictvím funkce biplot představu o rozložení měřených znaků v rámci pozorovaných druhů a o míře vlivu těchto znaků na celkovou morfologickou variabilitu křemičitých schránek. Distribuce znaků byla zobrazena na PCA. Žádný s takto namapovaných

znaků nejevil jednoznačnou druhovou specifičnost. Kopinatý tvar buňky byl výrazněji zastoupen u druhu *F. sp.*, osmičkovitý tvar centrálního nodulu u *F. gaertnerae*.

Protože je určování subjektivní, byly druhy z přírodních populací určeny nezávisle třemi osobami. V rámci jednotlivých stanovení byly značné rozdíly, což upevňuje tvrzení, že morfologické znaky rozsivkových druhů nejsou vhodné pro jednoznačné zařazení do druhu.

Rozsivky jsou jednou z druhově nejbohatších skupin na světě. Mann & Vanormelingen (2013) vzali v úvahu výsledky studií zabývajících se kryptickou diverzitou a odhadli minimální počet rozsivkových druhů na třicet tisíc, s tím, že do budoucna by se jejich celkový počet mohl pohybovat okolo sto tisíc. Pseudokryprická nebo kryptická diverzita byla dokumentována u mnoha druhů rozsivek (Evans et al. 2009; Caroline Souffreau et al. 2013)(Caroline Souffreau et al. 2013). Většina studií se zaměřuje na problematiku druhů, takže není známo jaký je skutečný rozsah tohoto problému. U rodu *Frustulia* se problematice kryptické diverzity věnovala Veselá et al. (2012) a Urbánková & Veselá (2013). I když je šíření na dlouhé vzdálenosti u rozsivek možné (Atkinson 1988), většinou není tak efektivní, aby zajistilo dostatečný genový tok mezi vzdálenými populacemi (Evans et al. 2009). Časem dochází k rozrůznění populací a nakonec i ke speciaci (Mann & Vanormelingen 2013). Příkladem takovéto vzdálené lokality s omezenou možností genového toku může být Nový Zéland, který je často uváděn jako centrum rozsivkové biodiverzity (Sabbe et al. 2001; Kilroy et al. 2003). Je velmi pravděpodobné, že díky specifickým podmínkám se v této oblasti vyvinuly nové separátní druhy.

Je otázkou, zda diverzita odhadovaná ve studii Mann & Vanormelingen (2013) je skutečně tak veliká. Pro lepší odhad celkové diverzity rozsivek by pomohlo více studií na populační úrovni, které by ukázaly limity efektivního šíření a genový tok mezi populacemi. A možná také další výzkum toho, jaké jsou vlastně mechanismy šíření (Souffreau et al. 2010; C Souffreau et al. 2013).

5.3 Diverzita rodu *Frustulia* v severní Evropě

Diverzita rozsivkových druhů není rozmístěna homogenně. U mnoha skupin byl pozorován latitudinální gradient diverzity a existují biodiverzitní hotspoty. Rozmístěním diverzity rozsivek se zabýval Vyverman et al. (2007). Kvůli neustálenému druhovému konceptu a omezenému množství studií, které se doposud diverzitou sladkovodních rozsivek zabývaly, je zapotřebí k dílčím zprávám o endemickém, či kosmopolitním rozšíření některých druhů, přistupovat opatrně (Vanormelingen et al. 2007). Na severní polokouli má diverzita unimodální rozložení s maximem mezi 55° a 70° S. Zasahuje tedy celou oblast severní Evropy. Diverzita v severní Evropě koreluje s hustotou jezer, která má maximum mezi 55° a 65° S (Wetzel 2001; Vyverman et al. 2007). Vysokou diverzitu rodu *Frustulia* v této oblasti potvrzují i určovací klíče (Lange-Bertalot & Metzeltin 1996; Lange-Bertalot & Metzeltin 2001). Podle Lange-Bertalot & Metzeltin (1996, 2001) zde bylo nalezeno celkem pět druhů, které jsou považovány za severské (*F. erifuga*, *F. gaertnerae*, *F. krammeri*, *F. quadrisinuata* a *F. septentrionalis*). Z těchto pěti jsem ve své práci zaznamenal druhy *F. gaertnerae* a *F. septentrionalis*. Kromě zmiňovaných severských druhů jsou zde hojně přítomny i druhy z komplexu *F. crassinervia saxonica*, které jsou běžně popisovány i ze střední Evropy (Lange-Bertalot & Metzeltin 2001; Veselá et al. 2012). Během mých pozorování jsem z komplexu *F. crassinervia-saonica* zaznamenal linie V a VI. (Veselá et al. 2012).

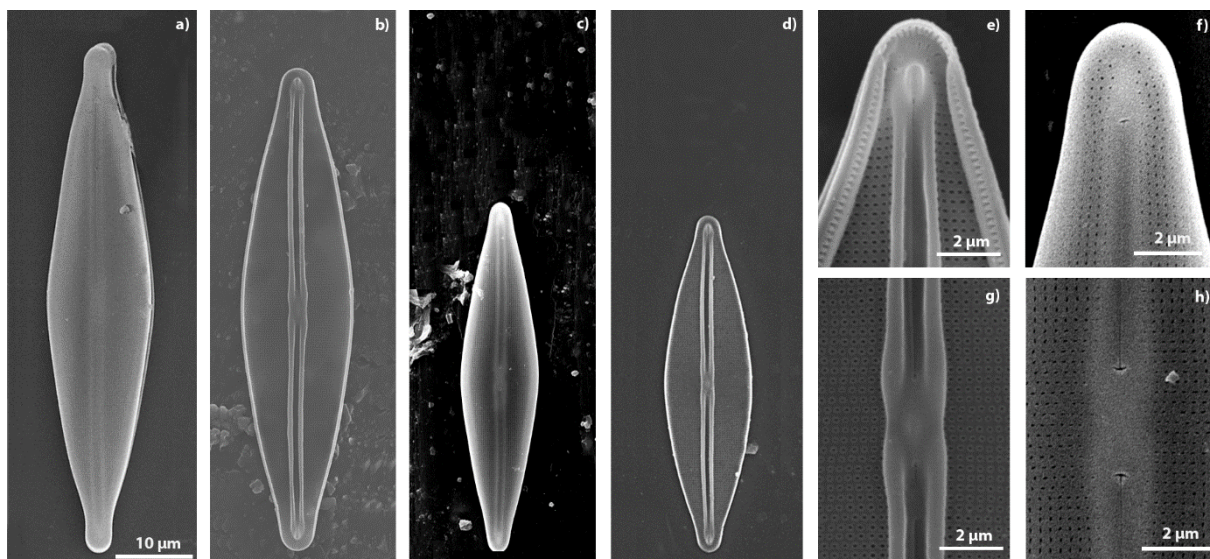
5.4 Nalezené druhy

5.4.1 *Frustulia crassinervia-saxonica*

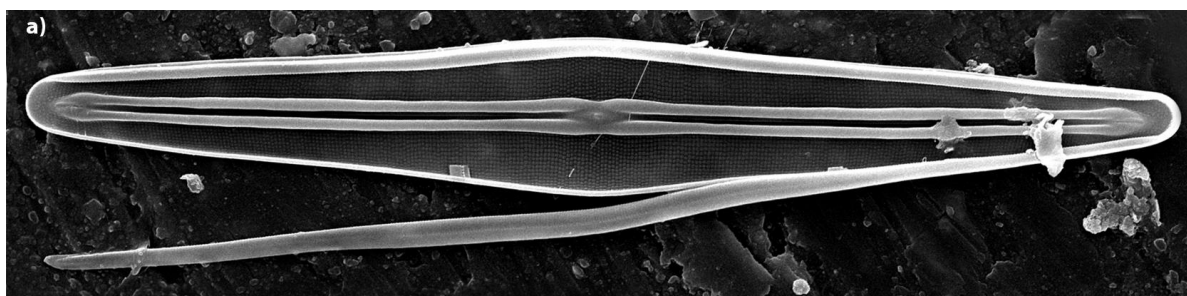
Komplex druhů *Frustulia crassinervia* (Brébisson) Lange-Bertalot & Metzeltin 1996 a *Frustulia saxonica* Rabenhorst 1848 – 1860 (Obr. 12, 13, Tab. 3)

Veselá et al. (2012) analyzovala monoklonální kultury rodu *Frustulia*, získané ze střední a západní Evropy. Pro stanovení druhů použila molekulární marker D1/D2 LSU rDNA a geometrické morfometriky. Tímto způsobem stanovila komplex druhů *F. crassinervia-saxonica*, který sestává ze čtyř fylogeneticky vytyčených linií druhů *F. crassinervia* a *F. saxonica*. Oba dva druhy jsou běžně zaznamenávány po celém světě a jsou považovány za kosmopolitní (Beier & Lange-Bertalot 2007).

Morfologie izolovaných kmenů: Celkový tvar buňky kosočtverečný, u menších buněk někdy kopinatý (Obr. 12 a-d). Okraj buňky rovný nebo nepatrně zvlněný. Délka 44-67 μm , šířka 11-16 μm . Tvar koncových částí buňky je variabilní. U některých je před konci buňky přítomno různě intenzivní zúžení, dávající vzniknout koncovým hlavičkám (dříve tyto buňky s hlavičkami označovány jako *F. crassinervia*), u jiných toto zúžení chybí. Přítomnost a velikost porte-cryon struktury je variabilní. Pokud výraznější porte-cryon chybí, má heliktoglosa jazýčkovitý tvar (Obr. 12e). Splynutí žeber a centrálního nodulu je většinou úzké a bez výraznějšího bočního vykrojení (Obr. 12g). Strie v distálních částech buňky jsou mírně konvergentní a směrem ke středové oblasti se stávají paralelní (Obr. 12 e-h). V SEM 33 - 35 stríí / 10 μm , 35 - 40 areol / 10 μm . Zakončení štěrbinového raphe, které lze vidět z vnější strany valvy, má tvar písmene T (Lange-Bertalot & Metzeltin 1996). U domnělé iniciální buňky z komplexu *F. crassinervia-saxonica* bylo pozorováno pinzetovité odloučení bočního pásku (Obr. 13), které bylo v přírodních vzorcích pozorováno i u jiných buněk druhového komplexu *F. crass.-sax.*



Obr. 12 *Frustulia crassinervia-saxonica* (SEM). a), c) celkový pohled na vnější stranu valvy; b), d) celkový pohled na vnitřní stranu valvy; e) koncová oblast s detailem poerte-crayon a striace; g) uspořádání centrálního nodulu; f), h) „T“ zakončení štěrbinového raphe v centrální a koncových oblastech na vnější straně valvy



Obr. 13 Domnělá iniciální buňka z druhového komplexu *F. crassinervia-saxonica*;

Ekologie a rozšíření: Pravděpodobně kosmopolitní komplex druhů s větší frekvencí výskytu v holarktické oblasti (Lange-Bertalot & Metzeltin 2001). Mnoho druhů na jižní polokouli bylo pravděpodobně chybně považováno za linie druhového komplexu *F. crassinervia-saxonica*. Tyto linie byly popsány z Evropy a předpokládal se jejich kosmopolitní výskyt. Později byly často tyto domnělé linie z jižní polokoule popsány jako nové samostatné druhy (Metzeltin & Lange-Bertalot 1998; Beier & Lange-Bertalot 2007). *F. crassinervia-saxonica* se běžně vyskytuje v přirozeně kyselých rašelinných vodách ve formě kolonií v trubičkovitém slizu, anebo jako jednotlivé buňky. Často v asociaci s *Frustulia septentrionalis*, a *F. gaertnerae* (Lange-Bertalot & Metzeltin 1996; Lange-Bertalot & Metzeltin 2001; Beier & Lange-Bertalot 2007)

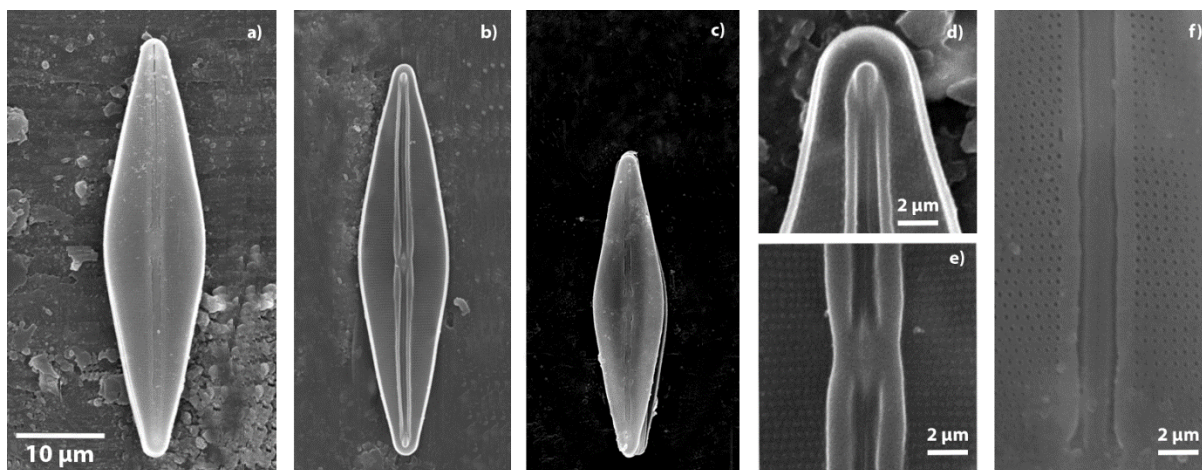
Ani jeden z následujících druhů nebyl zaznamenán ve střední a západní Evropě, kde intenzivně izolovala Veselá et al. (2012).

5.4.2 *Frustulia gaertnerae*

Lange-Bertalot & Metzeltin 1996

(Obr. 14, Tab. 3)

Morfologie izolovaných kmenů: Celkový tvar buňky kosočtvercový (Obr. 14 a-c). Délka: 43–47 μm , šířka: 10–12 μm . Oproti *F. crassinervia-saxonica* výraznější undulace okrajů buňky. Heliktoglosa je drobná a krátká (Obr. 14 d). Centrální nodulus je kopinatého tvaru a spolu s žebry vytváří často osmičkovitý útvar (Obr. 14 e). Z vnější strany valvy jsou podél obou stran raphe typické paralelní rýhy, které dosud nebyl zaznamenány u žádného jiného druhu (Lange-Bertalot & Metzeltin 2001) (Obr. 14 f). Raphe končí v centrální oblasti tvarem T a v koncových oblastech terminálním pórem. Striace je ve středové oblasti buňky paralelní. Směrem k distálním koncům jsou strie výrazně konvergentní. Počet strií 29 – 36 / 10 μm . Počet areol 39 – 44 / 10 μm .



Obr. 14 *Frustulia gaertnerae* (SEM). a), c) celkový pohled na vnější stranu valvy; b) celkový pohled na vnitřní stranu valvy; d) detail heliktoglosy s výrazným porte-crayon; e) centrální nodulus, který tvoří olivkovitý útvar mezi žebry; f) typické paralelní rýhy podél raphe na vnější straně valvy

Ekologie a rozšíření: Rozšíření druhu *Frustulia gaertnerae* není přesně známo. Lange-Bertalot & Metzeltin (2001) uvádí výskyt druhu v holarktické oblasti. Typové položky jsou popsány z oblasti Julma Ölky ve Finsku. Výskyt druhu obvykle spjat s druhy z komplexu *F.*

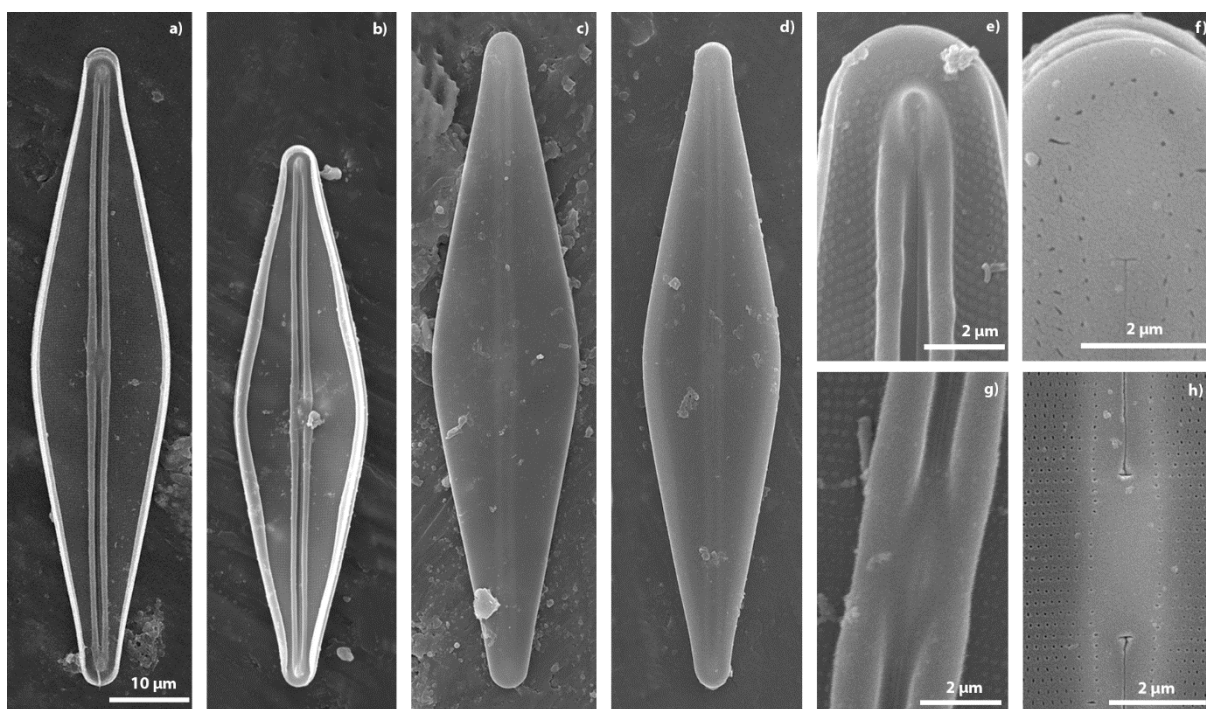
crass.-sax., ale díky charakteristickým rýhám u *F. gaertnerae* jsou v SEM navzájem snadno odlišitelné. (Lange-Bertalot & Matzeltin 1996). Dle Urbánkové (nepublikováno) byla *F. gaertnerae* nalezena i v USA a v Grónsku. Nalezené izoláty mají typické zářezy kolem raphe, ale jsou geneticky variabilní. Je tedy možné, že se jedná o další druhy s podobnou struktuou kolem raphe. *F. gaertnerae* se obvykle vyskytuje s druhy z komplexu *F. cras.-sax.* Díky charakteristickým rýhám u *F. gaertnerae* jsou navzájem snadno (Lange-Bertalot & Matzeltin 1996).

5.4.3 *Frustulia septentrionalis*

Lange-Bertalot & Metzeltin 1996

(Obr. 15, Tab. 3)

Morfologie izolovaných kmenů: Buňky kosočtvercového tvaru (Obr. 15 a-d). Délka 58–86 μm , šířka 13–20 μm . Okraje buňky bez undulace. Porte-crayon není patrný, protože heliktoglosa nevystupuje za žebra (Obr. 15 e). Strie směrem k distálním koncům buňky výrazně konvergují (Obr. 15 e), paralelní uspořádání mají pouze ve středové oblasti buňky. Počet strií 30–35 / 10 μm . Počet areol 32–40 / 10 μm . Centrální nodulus většinou nevýrazný, bez vykrojení (Obr. 15 g). Raphe je v proximální i distálních částech buňky na vnější straně valvy zakončeno ve tvaru T.



Obr. 15 *Frustulia septentrionalis* (SEM). a), b) celkový pohled na vnitřní stranu valvy; c), d) celkový pohled na vnější stranu valvy; e) mělký plochý porte-crayon, spolu s konvergentní striací; f) způsob zakončení kanálkového raphe v koncových částech buňky; g) splynutí žebér a centrálního nodulu; h) zakončení raphe ve tvaru T ve středové oblasti buňky.

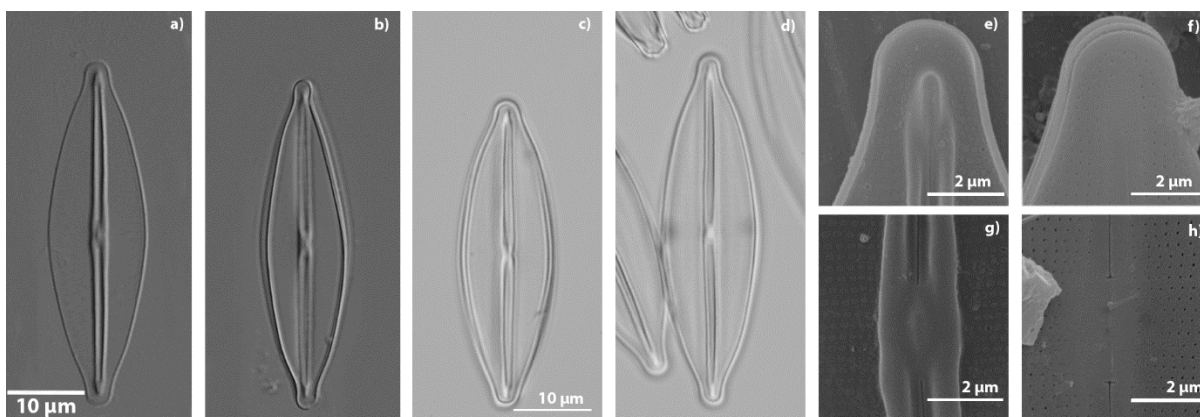
Ekologie a rozšíření: Dle Lange-Bertalot & Metzeltin (1996) je rozšíření druhu *F. septentrionalis* nedostatečně známé. Výskyt byl potvrzen ze Skandinávie a z Aljašky. Ekologie druhu obdobná jako u předchozích (viz výše).

5.4.4 *Frustulia* sp.

(Srovnání s *Frustulia maoriana* Beier & Lange-Bertalo 2007)

(Obr. 16, Tab. 3)

Morfologie izolovaných kmenů: Malé široké lanceolátní buňky (Obr. 16 a, b), délka 45–49 μm , šířka 13–16 μm , Porte-crayon je úzký, dlouhý, výrazně vystouplý až špičatý (Obr. 16 e). Distální části buňky mají často hlavičkovité zúženiny. Centrální nodulus je drobný a bez bočního vykrojení. Způsob zakončení raphe ani počty strií a areol nebylo možné na snímcích z LM stanovit. Druh srovnáván na základě podobných sekvencí i podobné morfologií s druhem *Frustulia maoriana*.



Obr. 16 *Frustulia* sp. a), b) (LM) a *Frustulia maoriana* (c-h) (LM a SEM). a), b) pohled z vnitřní strany valvy na mnou analyzované buňky *F.* sp.; c), d) srovnávací pohled z vnitřní strany valvy na podobné buňky druhu *Frustulia maoriana*

Ekologie a rozšíření: *Frustulia* sp. nebyla v Evropě dosud popsána, může to být způsobeno velikou podobností s druhy z komplexu *F. crass.-sax.* Z kvantitativních a kvalitativních znaků se podle Beier & Lange-Bertalot (2007) buňky druhů navzájem liší svojí šířkou (*F. maoriana* 12,5–14 μm ; *F. crassinervia* 8–12,5 μm) a uspořádáním strií (*F. maoriana* je má paralelně po celé délce buňky, zatímco u komplexu *F. crass.-sax.* strie v koncových částech buňky mírně konvergují. Zatímco při mých pozorováních jsem zaznamenal hodnoty šířky buněk v přírodních populacích *F. crass.-sax.* 10-17 μm a v koncových částech byly strie též někdy paralelní.

Frustulia maoriana je popsána z jihozápadního pobřeží jižního ostrovu Nového Zélandu a je považována za endemita Nového Zélandu. Vyskytuje se zejména v mírně kyselých oligomezotrofních rašeliništích (Beier & Lange-Bertalot 2007).

6 Závěr

Ve své práci jsem se zabýval diverzitou rodu *Frustulia* v severní Evropě. Molekulární analýza pomocí multigenového datasetu (molekulární markery pro: *rbcL*, *psbA*, *LSU*, *SSU*) rozdělila zkoumané kmeny do čtyř skupin. První skupina kmenů byla po srovnání se sekvencemi v GenBanku přiřaditelná ke druhovým liniím komplexu *Frustulia crassinervia-saxonica*. Zbylé sekvence tvořily tři klastry, které nebylo možno přiřadit k sekvencím v GenBanku. Na základě morfologie byly dva z nich určeny jako *Frustulia septentrionalis* a *Frustulia gaertnerae*. Poslední, třetí klastr byl označen jako *Frustulia sp.*, neboť se k němu nenašel žádný morfologicky ekvivalentní druh, který by byl již dříve ze severní Evropy popsán.

Analýza vybraných kvantitativních a kvalitativních znaků se ukázala být spornou metodou, která nevede k jednoznačnému druhovému zařazení. V rámci této analýzy byla použita objektivní metoda rozdělení v mnoharozměrném prostoru na základě kvantitativních proměnných, a také subjektivní vyhodnocení taxonomicky důležitých kvalitativních znaků rozsivkové schránky.

Moje výsledky potvrdily přítomnost některých druhů, které byly ze severní Evropy popsány již dříve a navíc byl zaznamenán jeden nový nezařazený druh.

7 Literatura

- Abràmoff, M., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), pp.36–41.
- Agapow, P.-M. et al., 2004. The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies John L Gittleman , Georgina M Mace , Jonathon C Marshall , and Andy Purvis Published by : The University of Chicago Press *Quarterly Review of Biology* . , 79(2), pp.161–179.
- Alverson, A.J., 2008. Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, 159(3), pp.339–53.
- Alverson, A.J., Jansen, R.K. & Theriot, E.C., 2007. Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosirid diatoms. *Molecular phylogenetics and evolution*, 45(1), pp.193–210.
- Amato, A. et al., 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*, 158(2), pp.193–207.
- Anonymous, 1703. Two Letters from a Gentleman in the Country, Relating to Mr Leuwenhoeck's Letter in Transaction, No. 283. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 23(283), pp.1494–1501.
- Atkinson, K.M., 1988. Developmnet of net phytoplankton in Cow Green Reservoir (Upper Teesdale), a new impoundment in Northern Engladn. In *Algae and the aquatic environment*. Biopress. Bristol, pp. 30–43.
- Behnke, A. et al., 2004. Reproductive Compatibility and Rdna Sequence Analyses in the Sellaphora Pupula Species Complex (Bacillariophyta)1. *Journal of Phycology*, 40(1), pp.193–208.
- Beier, T. & Lange-Bertalot, H., 2007. A synopsis of cosmopolitan, rare and new Frustulia species (Bacillariophyceae) from ombrotrophic peat bogs and minerotrophic swamps in New Zealand. *Nova Hedwigia*, 85(1), pp.73–91.

- Beijerinck, M.W., 1913. *De infusies en de ontdekking der bacteriën*, Amsterdam: Jaarboek van de Koninklijke Akademie v. Wetenschappen, Müller.
- Casteleyn, G. et al., 2009. Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence. *Protist*, 160(2), pp.343–54.
- CAUP, Culture Collection of Algae of Charles University in Prague. Available at: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html> [Accessed July 16, 2014].
- Cox, E., 1999. Variation in patterns of valve morphogenesis between representatives of six biraphid diatom genera (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 1312, pp.1297–1312.
- Cracraft, J., 1983. Species Concepts and Speciation Analysis. In R. F. Johnston, ed. *Current Ornithology*. Springer US, pp. 159–187.
- Darwin, C., 1859. *On the origin of species by means of natural selection*, London: J. Murray.
- Evans, K.M. et al., 2009. Highly differentiated populations of the freshwater diatom *Sellaphora capitata* suggest limited dispersal and opportunities for allopatric speciation. *Protist*, 160(3), pp.386–96.
- Evans, K.M., Wortley, A.H. & Mann, D.G., 2007. An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, 158(3), pp.349–64.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), pp.783–791.
- Felsenstein, J., 1973. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *American journal of human genetics*, 25(5), pp.471–92.
- Fialová, M., 2013. *Ekologický pohled na morfologii rozsivek*. Univerzita Karlova v Praze.
- Finlay, B. & Fenchel, T., 2004. Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. *Protist*, 155(June), pp.237–244.

- Finlay, B.J., Monaghan, E.B. & Maberly, S.C., 2002. Hypothesis: the rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance. *Protist*, 153(3), pp.261–73.
- Foissner, W., 2006. Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, pp.111–136.
- Geitler, L., 1932. *Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen)*, Archiv für Protistenkunde 78: 1-226.
- Geitler, L., 1979. On some peculiarities in the life history of pennate diatoms hitherto overlooked. *American Journal of Botany*, 66(1), pp.91–97.
- Graeff, C., Kociolek, J. & Burliga, A., 2012. Valve morphology of four species of Frustulia (Bacillariophyta), including two described as new. *PHYTOTAXA*, 76, pp.62–76.
- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), pp.696–704.
- Hamsher, S.E. et al., 2011. Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P. *Protist*, 162(3), pp.405–22.
- Harper, M., 1994. Did Europeans introduce *Asterionella formosa* Hassall to New Zealand. *11th international diatom symposium. Memoirs of*
- Hebert, P.D.N. et al., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270(1512), pp.313–21.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 17(8), pp.754–5.
- Chao, A. et al., 2006. A statistical approach to estimate soil ciliate diversity and distribution based on data from five continents. *Oikos*, 114(3), pp.479–493.

- Kermarrec, L. et al., 2013. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. *Molecular ecology resources*, 13(4), pp.607–19.
- Kilroy, C., 2007. *Diatom communities in New Zealand subalpine mire pools: distribution, ecology and taxonomy of endemic and cosmopolitan taxa*. University of Canterbury.
- Kilroy, C. et al., 2003. New species of Fragilariforma (Bacillariophyceae) from New Zealand and Australia. *New Zealand Journal of Botany*, 41(3), pp.535–554.
- Kilroy, C., Larned, S.T. & Biggs, B.J.F., 2009. The non-indigenous diatom *Didymosphenia geminata* alters benthic communities in New Zealand rivers. *Freshwater Biology*, 54(9), pp.1990–2002.
- Kociolek, J. & Stoermer, E., 2010. Variation and polymorphism in diatoms: the triple helix of development, genetics and environment. A review of the literature. *Vie et milieu*, 60(2), pp.75–87.
- Kociolek, J.P. et al., 2004. New Gomphonema (Bacillariophyta) species from Tasmania. *Phycologia*, 43(4), pp.427–444.
- Kociolek, J.P. & Benson, M.E., 2012. Freshwater diatom floristics of the late Eocene Florissant Formation, Clares Quarry site, central Colorado, USA. *Bibliotheca diatomologica*, 58, pp.1–136.
- Kociolek, P. & Spaulding, S.A., 2000. Freshwater diatom biogeography. *Nova Hedwigia*, 71(1-2), pp.223–241.
- Kooistra, W.H.C.F. et al., 2008. Global diversity and biogeography of Skeletonema species (bacillariophyta). *Protist*, 159(2), pp.177–93.
- Kopalová, K.Ř.I.N.A. et al., 2011. Description of five new species of the diatom genus. , 60, pp.44–60.

- Krammer K., L.-B.H., 1986. *Bacillariophyceae, 1. Teil: Naviculaceae*. In Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (eds.) *Siisswasserflora von Mitteleuropa, Band 2*. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag,
- Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D., 2001. *Diatoms of Europe Vol. 2. Navicula sensu stricto, 10 genera separated from Navicula sensu lato, Frustulia: 1-526*. - A.R.G. Gantner, Ruggell, Liechtenstein.,
- Lange-Bertalot, H. & Metzeltin, D., 1996. *Oligotrophic-Indikatoren, 800 Taxa representativ für drei diverse Seen-Typen, kalkreich - oligodystroph - schwach gepuffertes Weichwasser.*, Iconographia Diatomologica 2.
- Leliaert, F., Verbruggen, H. & Vanormelingen, P., 2014. DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, 49, pp.179–196.
- Linné, C. von, 1753. *Species plantarum*, Stockholm: Ray Society.
- Mann, D., 1999. The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38(December), pp.437–495.
- Mann, D.G. & Vanormelingen, P., 2013. An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 60(4), pp.414–20.
- Mayden, R., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *Species: The units of biodiversity*.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*, Harvard University Press.
- Medlin, L.K., Williams, D.M. & Sims, P. a., 1993. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology*, 28(4), pp.261–275.
- Metzeltin, D. & Lange-Bertalot, H., 1998. Tropical diatoms of South America I. About 700 predominantly rarely known or new taxa representative for the neotropical flora. *Iconographia Diatomologica*, p.5.695.

- Morariu, V. & Srinivasan, B., 2009. *Automatic online tuning for fast Gaussian summation* D. Koller et al., eds., Curran Associates, Inc.
- Passy, S., 2010. A distinct latitudinal gradient of diatom diversity is linked to resource supply. *Ecology*, 91(1), pp.36–41.
- Potapova, M.G. & Charles, D.F., 2002. Benthic diatoms in USA rivers: distributions along spatial and environmental gradients. *Journal of Biogeography*, 29(2), pp.167–187.
- Pouličková, A., 2011. *Základy ekologie sinic a řas*, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), pp.879–86.
- Richlen, M.L. & Barber, P.H., 2005. A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), pp.688–691.
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G., 1990. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*, Cambridge: Cambridge Press.
- Sabbe, K. et al., 2001. Six new Actinella (Bacillariophyta) species from Papua New Guinea, Australia and New Zealand: further evidence for widespread diatom endemism in the Australasian region. *European Journal of Phycology*, 36(4), pp.321–340.
- Sims, P. a., Mann, D.G. & Medlin, L.K., 2006. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia*, 45(4), pp.361–402.
- Siver, P. a., Hamilton, P.B. & Pelczar, J., 2009. New species of freshwater diatoms from acidic localities along the Atlantic Coastal Plain of the United States. *Botany*, 87(4), pp.409–427.
- Siver, P.A. & Baskette, G., 2004. A morphological examination of Frustulia (Bacillariophyceae) from the Ocala National Forest, Florida, USA. *Canadian Journal of Botany*, 82(5), pp.629–644.

- Souffreau, C. et al., 2011. A time-calibrated multi-gene phylogeny of the diatom genus *Pinnularia*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61(3), pp.866–79.
- Souffreau, C. et al., 2013. Molecular evidence for distinct Antarctic lineages in the cosmopolitan terrestrial diatoms *Pinnularia borealis* and *Hantzschia amphioxys*. *Protist*, 164(1), pp.101–15.
- Souffreau, C. et al., 2010. Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. *Phycologia*, 49(4), pp.309–324.
- Souffreau, C. et al., 2013. Tolerance of resting cells of freshwater and terrestrial benthic diatoms to experimental desiccation and freezing is habitat-dependent. *Phycologia*, 52(May), pp.246–255.
- Spaulding, S., Kociolek, J. & Wong, D., 1999. A taxonomic and systematic revision of the genus *Muelleria* (Bacillariophyta). *Phycologia*, 38(4), pp.314–341.
- Swofford, D.L., 2001. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. , pp.1–130.
- Syvertsen, E.E., 1977. *Thalassiosira rotula* and *T. gravida*_ecology and morphology. *Nova Hedwigia*, (54), pp.99–112.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), pp.2731–9.
- Telford, R.J., Vandvik, V. & Birks, H.J.B., 2006. Dispersal limitations matter for microbial morphospecies. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5776), p.1015.
- Trobajo, R. et al., 2011. Effects of salinity on growth and on valve morphology of five estuarine diatoms. *Phycological Research*, 59(2), pp.83–90.
- Trobajo, R. et al., 2009. Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, (48), pp.443–459.

- Trobajo, R. et al., 2013. Morphology and identity of some ecologically important small *Nitzschia* species. *Diatom Research*, 28(1), pp.37–59.
- Urbánková, P., 2009. *Alopatrická a sympatrická diverzita populací penátních rozsivek (Bacillariophyceae)*. Univerzita Karlova v Praze.
- Urbánková, P., 2011. *Molekulární variabilita a rozšíření druhového komplexu Frustulia rhomboides (Bacillariophyceae)*. Univerzita Karlova v Praze.
- Urbánková, P. & Veselá, J., 2013. DNA-barcoding: A case study in the diatom genus *Frustulia* (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia*, (September), pp.147–162.
- Vanormelingen, P. et al., 2008. Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). *Protist*, 159(1), pp.73–90.
- Vanormelingen, P., Verleyen, E. & Vyverman, W., 2007. The diversity and distribution of diatoms: from cosmopolitanism to narrow endemism. *Biodiversity and Conservation*, 17(2), pp.393–405.
- Verleyen, E. et al., 2009. The importance of dispersal related and local factors in shaping the taxonomic structure of diatom metacommunities. *Oikos*, 118(8), pp.1239–1249.
- Veselá, J. et al., 2012. Ecological variation within traditional diatom morphospecies: diversity of *Frustulia rhomboides* sensu lato (Bacillariophyceae) in European freshwater habitats. *Phycologia*, 51(5), pp.552–561.
- Veselá, J., 2007. *Ekologie a rozšíření sinic a řas malých vodních toků v NP České Švýcarsko*. Univerzita Karlova v Praze.
- Veselá, J., 2011. *Phylogenetic, morphological, and ecological context of microevolution in pennate diatoms*. Univerzita Karlova v Praze.
- Vijver, B. Van De, Kelly, M.G. & Blanco, S., 2008. The unmasking of a sub-antarctic endemic: *Psammothidium abundans* (Manguin) Bukhtiyarova et round in European rivers. *Diatom Research*, 21(1), pp.233–242.

- Vyverman, W. et al., 1998. *Eunophora* gen. nov. (Bacillariophyta) from Tasmania and New Zealand: description and comparison with *Eunotia* and amphoroid diatoms. *European Journal of Phycology*, 33(2), pp.95–111.
- Vyverman, W. et al., 2007. Historical processes constrain patterns in global diatom diversity. *Ecology*, 88(8), pp.1924–31.
- Wetzel, R.G., 2001. *Limnology: lake and river ecosystems.*, Sand Diego, California, USA: Academic Press.
- Wiens, J.J., 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic biology*, 56(6), pp.875–8.
- Wilkins, J., 2002. Summary of 26 species concepts. , (Mayden 1997).
- Zwickl, D.J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. , pp.1–115.

8 Seznam tabulek

Tab. 1 Primery použité pro amplifikaci vybraných markerů.....	19
Tab. 2 Unikátní sekvence použité při tvorbě fylogenetického stromu	20
Tab. 3 Naměřené kvantitativní hodnoty porovnávané s literaturou	27
Tab. 4 Počty buněk jednotlivých druhů u vzorků z kultur a z přírodních populací	27

9 Seznam obrázků

Obr. 1	Mapka s vyznačenými místy odběrů	17
Obr. 2	Hodnocené kvalitativní znaky	23
Obr. 3	Fylogenetický strom nalezený metodou BI	26
Obr. 4	Tři nezávislá stanovení druhů dle 207 SEM fotografií.....	28
Obr. 5	PCA Rozložení druhového zastoupení	29
Obr. 6	PCA Celkový tvar buňky.....	30
Obr. 7	PCA Hlavičkatost	30
Obr. 8	PCA Splynutí žeber s centrálním nodulem.....	30
Obr.9	PCA Splynutí žeber s heliktoglosou.....	30
Obr. 10	Zaznamenané druhové zastoupení rodu <i>Frustulia</i> na odebraných lokalitách	31
Obr. 11	Dosud nejstarší nalezená fosílie křemičité schránky rodu <i>Frustulia</i>	33
Obr. 12	<i>Frustulia crassinervia-saxonica</i> (SEM).....	38
Obr. 13	Srovnání <i>F. cras.-saxonica</i> s <i>F. crispula</i>	38
Obr. 14	<i>Frustulia gaertnerae</i> (SEM).....	39
Obr. 15	<i>Frustulia septentrionalis</i> (SEM).....	41
Obr. 16	<i>Frustulia. sp.</i> a <i>Frustulia maoriana</i>	42

10 Seznam příloh

Příloha 1 Všechny získané sekvence a hodnoty prostředí naměřené v místě odběrů.....	56
Příloha 2 Složení PCR směsí pro jednotlivé polymerázy	63
Příloha 3 PCR cykly pro jednotlivé primery a polymerázy.....	63
Příloha 4 Morfometrické a kvalitativní znaky buněk z kmenových kultur (SEM a LM)	64
Příloha 5 Morfometrické a kvalitativní znaky buněk z přírodních populací (SEM).....	68

Přílohy

Příloha 1 Všechny získané sekvence a hodnoty prostředí naměřené v místě odběru

vz. = vzorek, kód = kód osekvenovaných kmenů (tučně kmeny, u kterých sekvenováno rbcL), dat. = datum sběru (měsíc – rok), , zemp. š. = zeměpisná šířka, zemp. d. = zeměpisná délka, m n. m. = nadmořská výška (měřena v aplikaci Google Earth), con. = konduktivita,; Pozn.: vzorek SJ2 odebrán v okolí švédského města Umea

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí				
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.
Swe12	KG5 KG8 KG10 KG11	V-12	63.870283	19.040000	278	4,1	11	3				1
Swe21	KD2	V-12	64.576986	21.459222	1	6	27			1		
34	26-4B 26-5C 26-5E 26-6D 26-6E 26-7B 26-7E	V-12	63.575642	19.572619	47	5,1	14	6		1		
SJ15	KF6 KF2	V-12	63.487264	19.710611	19	5,1	27	1			1	
SJ2	JD4 JD7 JD10 JG5 JG8 JG11	V-12	NA	NA	NA	NA	NA	5				1
vz9	28-9C 28-9D 28-9F 28-9G 28-10B	X-12	60.570541	5.568478	150	5,3	25	2		1	2	
vz13	29-5E 29-5F 29-6B 29-6C 29-6D 29-6E 29-6F	X-12	60.566456	5.575151	152	5	21	4		2	1	
vz14	29-7B 29-7D 29-7E 29-8B	X-12	60.565899	5.576197	152	5	22	4				

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí				
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.
vz15	29-9B 29-9D 29-9E 29-9F 29-10B	X-12	60.565567	5.579416	152	5	26	1		4		
vz18	29-2C 29-2D 29-2E 29-2F 29-3C 29-3D 29-4B 29-4C 29-4D	X-12	60.962563	5.706421	490	5	11	9				
vz20	29-10C 29-10D 29-10E 29-10F 29-10G 29-11B 29-11C 29-11D 29-11E 29-11F	X-12	60.996479	5.743232	713	5	6	10				
vz25	29-4E 29-4F 29-5B	X-12	60.236477	5.125970	63	5	62	1	1	1		
vz29	28-7C 28-7D 28-7E 28-7F 28-7G 28-8B 28-8D 28-8E 28-8F 28-8G 28-9B	X-12	60.605015	4.827536	25	5	46	5		6		

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí				
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.
vz36	28-10C 28-10D 28-10E 28-10F 28-10G 28-11B 28-11C 28-11D 28-11E 28-11F 28-11G	X-12	60.237167	5.305941	54	5	36	6		5		
EV3	4F5 9D2 9D3 9D4	V-13	58.875942	26.247858	81	4,5	23	4				
EV6	5C6 5C7 5C11 5D2 5D3 5D8 6B5 6B7 6C3 6C4 6C6 6B10 6C10 8E9 8E10 8F3 8F5 9B3 9C2 9C3 9C4 9C5 9C6	V-13	58.874611	26.255417	82	4,3	44	23				

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí					
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.	
ES9	2B9	V-13	59.172410	27.259178	58	4,5	20	18					
	5E4												
	5E5												
	5E6												
	5E8												
	5F3												
	5F8												
	5F9												
	7G3												
	7G4												
	8F10												
	8G3												
	8G4												
	8G5												
	8G6												
	9B6												
	WB1												
WB3													
SA11	XH3	VI-13	67.786983	20.228317	479	7	57		5				
	XH4												
	XH6												
	XH8												
	XH9												
SA19	XC6	VI-13	68.512017	17.844983	356	7,9	51	2					
	XD10												
SA20	XG10	VI-13	68.511983	17.845683	353	6,8	10	1					
SA23	8B3	VI-13	68.435083	18.066867	519	5,4	51	4					
	XE8												
	XE9												
	XE10												
S4	5B3	VIII-13	63.098889	18.498644	173	5,28	26	2					
	5G7												
N1	8D10	VIII-13	62.281111	9.560556	1028	6,21	65	1					
N3	3F9	VIII-13	61.899755	10.020861	925	4,8	12	1					
N9	8D4	VIII-13	62.133056	7.180306	632	5,5	20	3					
	8D5												
	8D6												
N12	3G3	VIII-13	61.503917	8.810000	1237	6,2	14	4					
	3G4												
	3G5												
	3G6												

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí					
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.	
N13	5G9 5G10 8B2 8B7 8B8 8B9	VIII-13	59.638352	5.201403	94	4,9	51	6					
JS1	10G2 10G10 11B7 11C4 11B8 11C6 11C8	X-13	57.234670	13.663940	163	4	98	7					
JS2	10E9 10E6 10E9 10E10 11D4 11D9 11E4 11E5 VD2 VD3 VD4 VD5 VD6 VD7 VD8 VD9 VD10 VE2 VE3 VE4 VE5 VE6 VD11 10D6	X-13	57.234060	13.663580	161	4	92	24					

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí					
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.	
JS3	10D8 10E4 VB2 VB3 VB4 VB6 VB7 VB8 VB9 VB10 VB11 VC2 VC3 VC4 VC5 VC6 VC7 VC8 VB5	X-13	57.290500	13.974930	172	4	108	19					
JS8	11E9 11F8	X-13	57.304880	14.012640	168	4	89	2					
JS16	10C10 10C11 VE7 VE8 VE9 VE10 VF2 VF3 VF5 VF6 VF7	X-13	57.699700	13.970033	254	4	115	11					

vz.	kód	dat.	zemp. š.	zemp. d.	m n. m.	pH	con.	počet sekvencí					
								VI.	V.	septr.	gaer.	sp.	
JS17	VF8 VF9 VF10 VG2 VG3 VG4 VG6 VG8 VG9 VG10 VG11	X-13	57.766467	14.027450	228	4	83	11					
JS22	10D6	X-13	56.824100	14.088733	154	4	97	1					
Celkový počet sekvencí:								201	6	21	4	2	

Příloha 2 Složení PCR směsí pro jednotlivé polymerázy

AmpliTaq Gold DNA Polymerase		MyTaq DNA polymerase	
H ₂ O	13.9 µl	H ₂ O	14.3 µl
puf ^r Gold	2.00 µl	puf ^r	4.00 µl
dNTP	0.40 µl	Fp	0.25 µl
Fp	0.25 µl	Rp	0.25 µl
Rp	0.25 µl	polymeráza	0.20 µl
DNA polymeráza Gold	0.20 µl	DNA	1.00 µl
DNA	1.00 µl	celkový objem směsi /1 vzorek	19.0 µl
MgCl ₂	2.00 µl		
celkový objem směsi /1 vzorek	19.0 µl		

Příloha 3 PCR cykly pro jednotlivé primery a polymerázy; sec. = sekunda, min. = minuta

LSU (Gold)		SSU (Gold)		psbA (Gold)	
94 °C	3 min.	94 °C	10 min.	94 °C	2 min
94 °C	1 min.	95 °C	1 min.	94 °C	50 sec
51 °C	1 min.	51 °C	1 min.	54 °C	50 sec
72 °C	1 min.	72 °C	21 min.	72 °C	2 min
72 °C	10 min.	72 °C	10 min.	72 °C	10 min
rbcL (Gold)		LSU (MyTaq)			
95 °C	10 min.	94 °C	1 min.		
94 °C	1 min.	94 °C	15 sec.		
48 °C	1 min.	58 °C	15 sec.		
72 °C	2.5 min.	74 °C	10 sec.		
72 °C	10 min.	72 °C	7 min.		

Příloha 4 Morfometrické a kvalitativní znaky buněk z kmenových kultur (SEM a LM); levý sloupec = druh, kód kmenu (vzorek); na = nebylo možno změřit

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
<i>F. gaertnerae</i>											
28-9C (vz. 9)	43.98	10.599	4.149	40.000	34.667	0	0	1	1	1	1
	44.898	10.857	4.135	42.667	36.000	0	0	1	1	1	1
	45.862	10.637	4.312	41.333	35.333	0	0	1	1	1	1
	46.126	11.633	3.965	40.000	34.667	0	0	1	1	1	1
	43.918	10.576	4.153	44.000	35.333	0	0	1	1	1	1
	45.083	10.042	4.489	41.333	34.000	0	0	1	1	1	1
	45.242	10.033	4.509	42.667	33.333	0	0	1	1	1	1
	45.107	10.787	4.182	41.333	34.667	0	0	1	1	1	1
	43.912	10.161	4.322	41.333	34.000	0	0	1	1	1	1
	43.829	10.296	4.257	44.000	34.667	0	0	1	1	1	1
28-9D (vz. 9)	43.125	10.825	3.984	40.000	34.667	0	0	1	1	1	1
<i>F. septentrionalis</i>											
29-9D (vz. 15)	66.502	15.826	4.202	33.333	32.667	0	0	1	0	0	0
	67.430	15.672	4.303	32.000	32.000	0	0	1	0	0	0
	67.554	15.917	4.244	34.667	32.000	0	0	1	0	0	0
	66.940	16.293	4.109	32.000	30.667	0	0	1	0	0	0
	67.342	16.460	4.091	32.000	30.000	0	0	1	0	0	0
	68.641	15.153	4.530	36.000	30.667	0	0	1	0	0	0
	68.605	16.388	4.186	33.333	31.333	0	0	1	0	0	0
	68.753	16.254	4.230	33.333	30.667	0	0	1	0	0	0
	66.804	16.407	4.072	32.000	32.000	0	0	1	0	0	0
	66.706	16.029	4.162	34.667	31.333	0	0	1	0	0	0

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
<i>F. septentrionalis</i>											
29-4F (vz. 25)	58.538	13.375	4.377	36.000	34.000	0	0	1	0	0	0
	58.507	12.776	4.579	32.000	34.000	0	0	1	0	0	0
	59.108	12.705	4.652	33.333	34.667	0	0	1	0	0	0
	57.945	13.264	4.369	34.667	33.333	0	0	1	0	0	0
	58.542	12.978	4.511	32.000	34.000	0	0	1	0	0	0
	59.481	13.318	4.466	33.333	35.333	0	0	1	0	0	0
<i>F. septentrionalis</i>											
29-4F (vz. 25)	59.110	13.029	4.537	33.333	35.333	0	0	1	0	1	0
	57.908	12.526	4.623	36.000	35.333	0	0	1	0	1	0
	61.194	13.260	4.615	33.333	33.333	0	0	1	0	1	0
28-7G (vz. 29)											
	83.957	18.175	4.619	33.333	32.000	0	0	1	0	1	0
	83.818	18.177	4.611	38.667	32.000	0	0	1	0	1	0
26-4B (vz. 34)											
	78.302	16.398	4.775	34.667	32.000	0	0	1	0	1	0
	80.904	17.321	4.671	34.667	32.000	0	0	1	0	1	0
	81.794	18.644	4.387	33.333	30.667	0	0	1	0	1	0
	79.978	17.273	4.630	40.000	31.333	0	0	1	0	1	0
	81.553	18.203	4.480	33.333	32.000	0	0	1	0	1	0
	81.990	18.374	4.462	33.333	30.667	0	0	1	0	1	0
	81.676	17.231	4.740	33.333	32.000	0	0	1	0	1	0
	83.670	17.144	4.880	32.000	30.000	0	0	1	0	1	0
	85.666	19.892	4.307	33.333	30.667	0	0	1	0	1	0
	81.734	17.556	4.656	34.667	30.667	0	0	1	0	1	0

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
<i>F. septentrionalis</i>											
28-10E (vz. 36)											
	70.737	17.130	4.129	32.000	32.000	0	0	1	0	1	0
	74.187	17.75	4.180	34.667	31.333	0	0	1	0	1	0
	72.765	17.869	4.072	32.000	30.000	0	0	1	0	1	0
	72.574	16.624	4.366	34.667	32.000	0	0	1	0	1	0
	72.460	17.457	4.151	36.000	30.667	0	0	1	0	1	0
	73.243	17.746	4.127	32.000	31.333	0	0	1	0	1	0
	74.137	17.982	4.123	33.333	30.667	0	0	1	0	1	0
	74.295	18.157	4.092	33.333	30.000	0	0	1	0	1	0
	72.972	17.828	4.093	34.667	31.333	0	0	1	0	1	0
	74.570	17.928	4.159	33.333	31.333	0	0	1	0	1	0
<i>F. crassineriva-saxonica</i>											
5E8 (vz. ES9)											
	44.120	11.629	3.794	34.667	34.000	0	1	0	0	0	0
5F8 (vz. ES9)											
	46.060	11.775	3.912	34.667	34.667	0	1	0	0	0	0
VB11 (vz. JS3)											
	67.063	15.748	4.259	36.000	34.667	0	1	0	0	0	0
	65.798	13.846	4.752	36.000	34.667	0	1	0	0	0	0
	66.095	14.115	4.683	37.333	34.000	0	1	0	0	0	0
VC8 (vz. JS3)											
	53.201	12.882	4.130	36.000	33.333	0	1	0	0	0	0
XE10 (vz. SA23)											
	44.366	11.336	3.914	40.000	34.000	0	1	0	0	0	0

LM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
F. sp											
KG11 (Swe 12)	45.245	13.484	3.355	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	47.388	13.009	3.643	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	46.525	13.275	3.505	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	47.224	13.623	3.466	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	47.274	14.934	3.166	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	47.395	14.484	3.272	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	47.479	13.857	3.426	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	47.03	15.072	3.120	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	46.055	13.324	3.457	na.	na.	1	1	na.	0	1	0
	45.994	12.882	3.570	na.	na.	1	1	na.	0	1	0

Příloha 5 Morfometrické a kvalitativní znaky buněk z přírodních populací (SEM); posti.b. = postiniciální buněka druhového komplexu *F. crassinervia-saxonica*; *F. sept.* = *Frustulia septentrionalis*; *F. gae.* = *Frustulia gaertnerae*, *F. crass.-sax.* = *Frustulia crassinervia saxonica*

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
vz.9											
<i>F. crass.-sax.</i>	54.263	13.057	4.156	38.667	36.000	1	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	54.788	11.851	4.623	37.333	36.667	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	52.246	11.162	4.681	45.333	34.667	0	1	1	1	1	0
<i>F. gae.</i>	36.344	9.751	3.727	42.667	34.667	1	0	1	1	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	62.122	14.540	4.272	36.000	34.000	1	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	47.661	11.539	4.130	40.000	36.667	1	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	44.434	10.817	4.108	37.333	36.667	1	0	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.344	12.018	4.688	44.000	34.667	0	1	1	1	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	48.625	11.238	4.327	34.667	34.667	1	1	0	0	0	0
<i>F. sept.</i>	89.200	21.055	4.237	36.000	30.000	0	0	0	0	0	0
vz.20											
<i>F. gae.</i>	38.980	10.276	3.793	40.000	35.333	0	1	1	1	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	56.837	13.158	4.320	40.000	34.000	1	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	46.066	11.370	4.052	38.667	35.333	0	0	0	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	60.235	13.103	4.597	36.000	34.000	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	51.787	12.050	4.298	40.000	35.333	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	51.201	11.830	4.328	40.000	35.333	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	49.345	11.412	4.324	38.667	34.667	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	48.106	10.516	4.575	42.667	34.000	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	44.056	11.098	3.970	37.333	37.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	62.266	13.040	4.775	37.333	34.667	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	45.596	11.214	4.066	32.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	49.295	11.292	4.365	36.000	36.000	1	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	59.306	12.734	4.657	37.333	34.667	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	44.239	11.023	4.013	38.000	35.333	0	1	0	1	1	1

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
vz.20											
<i>F. crass.-sax.</i>	56.938	12.075	4.715	36.000	34.667	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	44.114	10.987	4.015	37.333	34.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	42.562	10.893	3.907	36.000	34.667	1	1	0	0	0	0
vz.25											
<i>F. crass.-sax.</i>	79.959	15.634	5.114	32.000	34.000	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	59.868	13.512	4.431	32.000	34.000	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	73.539	14.956	4.917	32.000	33.333	0	0	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	62.843	13.896	4.522	30.667	32.000	0	0	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	59.070	12.154	4.860	32.000	34.667	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.580	12.916	4.381	34.667	34.667	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	73.863	15.334	4.817	34.667	32.667	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.374	11.984	4.621	36.000	34.667	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	68.104	17.035	3.998	34.667	32.000	1	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	60.554	13.340	4.539	34.667	34.667	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	78.787	14.737	5.346	34.667	35.333	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	71.678	15.772	4.545	34.667	34.000	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	69.334	16.808	4.125	34.667	31.333	0	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	58.119	13.121	4.429	36.000	36.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	81.294	14.443	5.629	36.000	32.000	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	66.329	13.525	4.904	37.333	32.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	51.454	12.037	4.275	38.667	32.667	1	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	61.357	14.763	4.156	32.000	32.667	0	0	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	76.226	14.494	5.259	34.667	34.000	0	0	1	1	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	73.797	14.916	4.948	33.333	34.000	1	1	1	1	1	0

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
vz.29											
<i>F. crass.-sax.</i>	61.602	13.861	4.444	34.667	36.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	51.885	12.38	4.191	36.000	36.000	0	0	1	0	0	0
<i>F. gae.</i>	46.887	12.061	3.887	40.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	54.320	12.443	4.366	34.667	35.333	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.814	12.761	4.452	38.667	36.000	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	58.15	13.116	4.434	36.000	34.667	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	61.752	13.211	4.674	36.000	32.667	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	48.301	11.351	4.255	37.333	34.667	1	0	0	0	0	0
vz.36											
<i>F. gae.</i>	44.511	10.331	4.308	42.667	34.667	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	53.184	12.29	4.327	32.000	34.000	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	50.151	11.9	4.214	32.000	36.000	0	1	0	0	0	0
<i>F. sept.</i>	73.738	15.341	4.807	32.000	32.667	0	0	0	0	0	0
<i>F. sept.</i>	63.403	13.818	4.588	32.000	34.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. sept.</i>	60.55	12.529	4.833	36.000	34.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	53.073	11.956	4.439	33.333	32.000	0	1	0	0	0	0
posti. b.	91.192	13.524	6.743	34.667	35.333	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	58.600	12.723	4.606	34.667	34.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	54.829	12.13	4.520	36.000	32.667	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.099	12.314	4.475	33.333	33.333	0	1	0	0	0	0
vz.JS3											
<i>F. crass.-sax.</i>	46.919	12.080	3.884	40.000	36.000	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	44.314	11.814	3.751	40.000	36.000	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.621	12.881	4.318	38.667	36.000	0	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	56.598	12.116	4.671	41.333	34.000	0	1	0	0	0	0

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
vz.,JS3											
<i>F. crass.-sax.</i>	57.564	13.399	4.296	37.333	34.667	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.200	13.226	4.174	40.000	36.000	1	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.996	13.080	4.357	38.667	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	39.980	11.522	3.470	40.000	36.000	1	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	58.581	13.657	4.289	36.000	35.333	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	46.909	12.111	3.873	40.000	36.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	45.003	11.960	3.763	40.000	36.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	52.243	12.650	4.130	40.000	34.667	1	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.698	12.115	4.020	40.000	34.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	58.330	14.161	4.119	36.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	54.352	12.618	4.307	40.000	34.667	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	52.080	12.055	4.320	36.000	34.667	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	52.073	12.755	4.083	38.667	34.000	0	1	0	0	0	1
vz.,JS3											
<i>F. crass.-sax.</i>	44.478	11.690	3.805	42.667	36.000	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	50.657	12.798	3.958	40.000	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	56.931	13.646	4.172	37.333	33.333	0	1	0	0	0	1
vz.,N1											
<i>F. crass.-sax.</i>	54.078	13.407	4.034	37.333	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	60.499	13.801	4.384	37.333	32.000	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	63.332	13.820	4.583	36.000	33.333	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	49.878	12.685	3.932	40.000	32.000	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	39.088	10.935	3.575	38.667	34.667	1	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.845	11.993	4.073	38.667	33.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	52.513	12.011	4.372	36.000	32.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	54.773	12.235	4.477	36.000	33.333	0	1	0	0	0	1

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
vz.N1											
<i>F. crass.-sax.</i>	49.005	11.802	4.152	40.000	34.000	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.174	12.880	4.284	38.667	35.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	51.904	12.479	4.159	40.000	34.000	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	47.113	12.167	3.872	36.000	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	57.809	13.095	4.415	37.333	32.667	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.443	11.827	4.772	44.000	34.000	0	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.125	12.032	4.000	37.333	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	58.084	12.438	4.670	40.000	33.333	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	49.802	12.273	4.058	37.333	33.333	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.685	12.398	3.927	36.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	44.219	12.025	3.677	40.000	33.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	49.559	12.262	4.042	40.000	34.000	0	1	0	0	1	1
vz.N3											
<i>F. crass.-sax.</i>	46.360	11.543	4.016	40.000	36.000	0	1	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	57.420	13.362	4.297	36.000	34.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	38.264	10.413	3.675	40.000	34.000	1	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	58.977	12.964	4.549	36.000	34.000	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	40.654	10.881	3.736	40.000	34.000	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	48.012	11.843	4.054	38.667	34.667	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	48.241	11.802	4.088	37.333	33.333	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	47.093	10.117	4.655	48.000	32.000	1	1	1	1	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	66.148	13.254	4.991	37.333	34.000	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	60.186	13.246	4.544	37.333	34.000	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	50.124	12.401	4.042	38.667	32.667	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	66.133	13.444	4.919	38.667	34.000	0	1	1	1	0	0

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	Undulace
vz.N3											
<i>F. crass.-sax.</i>	45.905	11.818	3.884	38.667	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	70.000	12.672	5.524	40.000	33.333	0	0	1	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	60.344	13.298	4.538	40.000	35.333	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.847	13.033	4.285	40.000	34.000	0	1	0	1	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.179	11.713	4.711	40.000	33.333	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	45.016	11.775	3.823	40.000	34.667	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	43.928	11.933	3.681	36.000	32.667	1	0	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	50.178	12.289	4.083	34.667	34.667	1	1	1	0	1	1
vz.S4											
<i>F. crass.-sax.</i>	50.267	10.530	4.774	36.000	36.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	56.271	14.325	3.928	37.333	34.000	0	0	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	54.638	12.404	4.405	36.000	34.667	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	60.443	13.423	4.503	36.000	33.333	0	0	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.659	14.280	3.968	36.000	33.333	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	59.647	14.262	4.182	40.000	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	54.257	12.536	4.328	38.667	33.333	0	0	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.492	12.309	3.940	40.000	34.000	1	0	0	0	0	0
vz.SA11											
<i>F. crass.-sax.</i>	58.189	13.649	4.263	36.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.683	12.114	4.019	40.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	60.054	13.265	4.527	40.000	35.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	48.953	12.613	3.881	40.000	33.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	60.573	13.267	4.566	36.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	52.444	12.437	4.217	40.000	34.000	0	1	0	0	0	1

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	Undulace
vz.SA20	55.232	12.109	4.561	40.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	57.048	12.442	4.585	40.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	55.754	12.560	4.439	40.000	33.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	49.146	12.677	3.877	40.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	51.120	12.276	4.164	40.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	62.559	13.747	4.551	32.667	32.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	51.938	11.685	4.445	40.000	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	59.246	13.420	4.415	38.667	32.667	1	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	52.785	11.936	4.422	40.000	34.667	1	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	49.960	12.273	4.071	40.000	34.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	64.721	13.835	4.678	40.000	33.333	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	51.209	12.549	4.081	37.333	34.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	55.355	12.938	4.278	38.667	33.333	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	56.101	12.697	4.418	38.667	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	53.502	11.867	4.508	36.000	34.000	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	43.791	11.302	3.875	40.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	49.529	12.071	4.103	36.000	34.667	0	0	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	49.836	12.063	4.131	33.333	36.000	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	51.379	12.010	4.278	36.000	34.000	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	43.238	11.217	3.855	36.000	36.000	0	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	47.675	10.002	4.767	34.667	34.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. sp</i>	37.476	10.128	3.700	40.000	36.000	1	1	0	0	0	1
<i>F. sp</i>	40.067	11.143	3.596	36.000	34.000	0	1	0	0	0	0
vz.SA20											
<i>F. crass.-sax.</i>	40.818	10.704	3.813	38.667	36.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. sp</i>	38.619	10.153	3.804	40.000	38.000	1	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	47.775	11.766	4.060	38.667	35.333	1	1	0	0	1	1
<i>F. sp</i>	40.882	11.600	3.524	34.667	33.333	0	0	0	0	0	0

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	undulace
vz.SA20											
<i>F. crass.-sax.</i>	46.930	11.776	3.985	41.333	36.000	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	45.798	11.074	4.136	38.667	34.667	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	44.016	10.744	4.097	36.000	34.667	0	1	0	0	1	1
vz.SJ15											
<i>F. sept.</i>	70.561	14.084	5.010	36.000	35.333	0	1	0	0	1	0
<i>F. sept.</i>	66.757	14.688	4.545	37.333	33.333	0	1	0	0	1	1
<i>F. sept.</i>	87.992	18.231	4.827	33.333	30.667	0	1	1	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	51.16	12.411	4.122	36.000	32.000	0	1	0	0	0	0
<i>F. sept.</i>	65.136	13.917	4.680	40.000	34.667	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.552	13.508	4.187	36.000	34.000	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	42.748	11.481	3.723	38.667	34.667	1	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	46.431	11.696	3.970	33.333	34.667	0	1	0	0	0	0
<i>F. sept.</i>	73.056	15.692	4.656	34.667	33.333	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	50.637	11.302	4.480	40.000	34.000	0	1	0	0	1	1
vz.SJ2											
<i>F. crass.-sax.</i>	56.981	12.159	4.686	48.000	34.000	0	1	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	57.689	13.128	4.394	36.000	32.667	0	0	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	76.489	14.869	5.144	34.667	32.667	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	53.727	12.731	4.220	34.667	34.667	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	60.178	12.68	4.746	42.667	34.667	0	1	1	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	55.866	13.151	4.248	32.000	34.667	0	0	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	75.569	15.707	4.811	33.333	31.333	0	0	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	68.084	14.16	4.808	33.333	32.667	0	0	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	56.910	13.056	4.359	40.000	31.333	0	1	0	0	1	1

SEM	délka	šířka	délka/šířka	areoly	strie	celkový tvar	hlavička	striace	nodulus	heliktoglosa	Undulace
vz.SJ2											
<i>F. sept.</i>	58.132	13.907	4.180	37.333	33.333	0	0	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	61.652	13.881	4.441	33.333	34.000	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	44.129	11.888	3.712	37.333	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	55.651	12.469	4.463	40.000	33.333	0	1	0	0	0	0
<i>F. sp</i>	45.649	12.446	3.668	36.000	34.000	0	1	0	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	52.756	12.98	4.064	36.000	32.000	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	50.463	10.88	4.638	36.000	34.000	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	53.206	12.319	4.319	36.000	34.667	0	0	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	57.453	12.808	4.486	37.333	32.667	0	1	0	0	1	0
<i>F. crass.-sax.</i>	48.600	12.07	4.027	37.333	34.667	0	1	0	0	0	1
<i>F. crass.-sax.</i>	55.229	13.167	4.195	40.000	36.667	0	1	0	0	0	0
vz.Swe21											
<i>F. sept.</i>	74.232	19.221	3.862	33.333	29.333	0	1	1	0	1	1
<i>F. crass.-sax.</i>	55.174	12.323	4.477	36.000	35.333	0	1	1	0	1	0
<i>F. sept.</i>	92.148	21.385	4.309	32.000	32.000	0	0	0	0	0	0
<i>F. sept.</i>	80.483	18.969	4.243	34.667	30.667	0	0	1	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	68.975	14.399	4.790	33.333	36.000	0	1	0	0	0	0
<i>F. crass.-sax.</i>	57.393	12.771	4.494	40.000	34.667	0	0	0	0	0	0