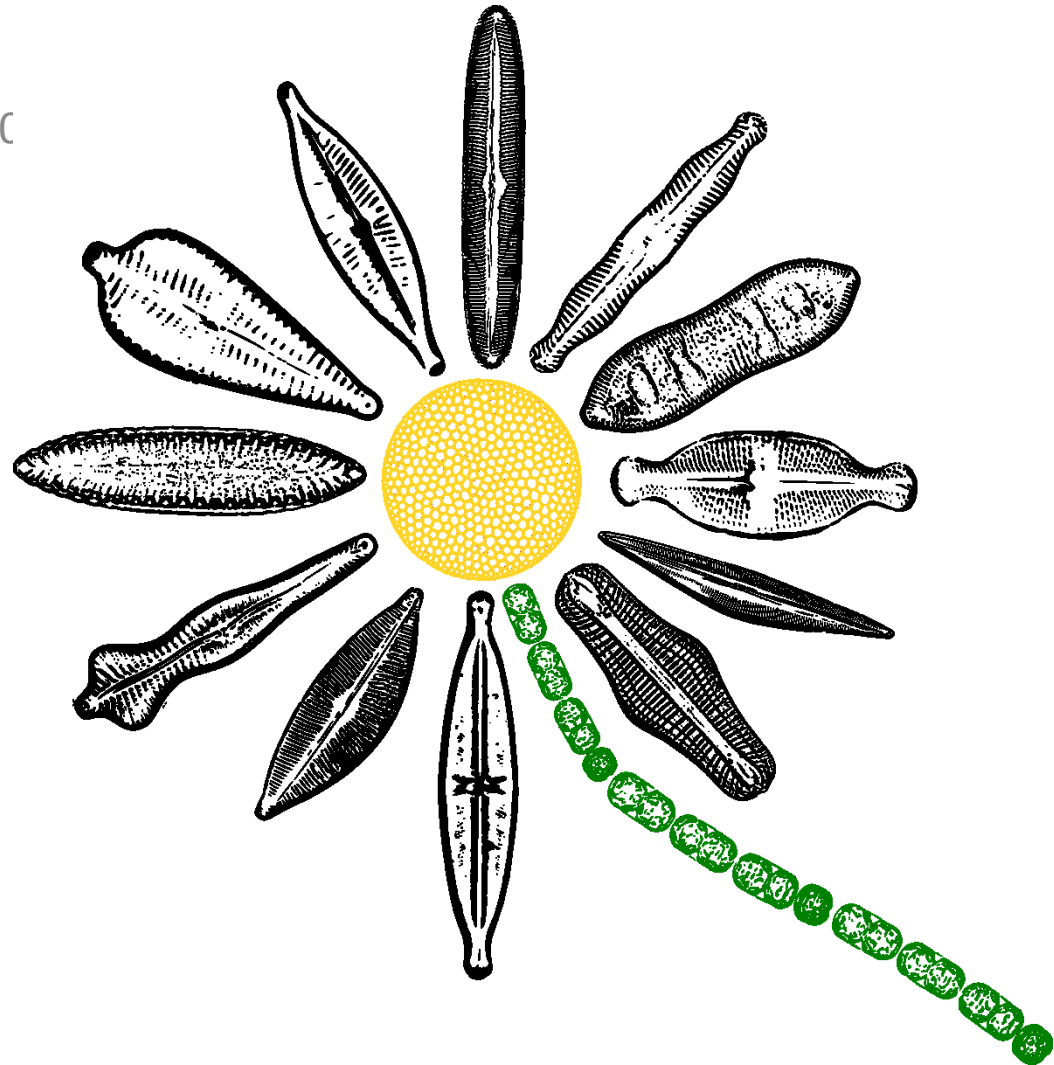
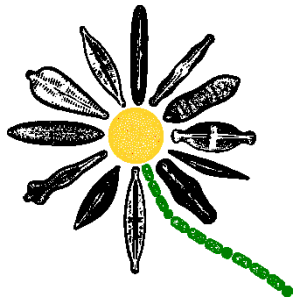


# Úvod do diatomologie - Metodiky

10

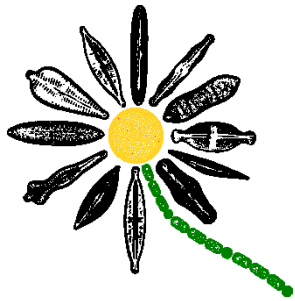




# Odběr fytoENTOSU

[http://www.mzp.cz/cz/prehled\\_akceptovanych\\_metodik\\_tekouci\\_ch\\_vod](http://www.mzp.cz/cz/prehled_akceptovanych_metodik_tekouci_ch_vod)

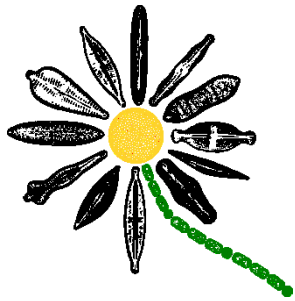
- V souladu s WFD je termín fytoentos používán pro označení souboru fototrofních mikrofyt osidlujících dno.
- Výběr vhodného podkladu
- Oškrab epilítónu
- Transport v chladu a temnu
- Mikroskopický rozbor
- Zhotovení trvalých preparátů rozsivek
- Fixace formaldehydem



# Odběr fyto bentosu

Terénní pomůcky:

- rybářské holinky
- zubní kartáček, nůž, zabroušená lžice nebo skalpel, pinzeta
- plastová miska
- plastová lahvička (optimálně 100 ml) se šroubovacím uzávěrem
- nesmazatelný fix
- chladicí box
- fotoaparát
- GPS přístroj
- terénní přístroje pro analýzu vody (pH, obsah kyslíku, teplota, vodivost)
- gumové rukavice



# Odběr fytoENTOSU

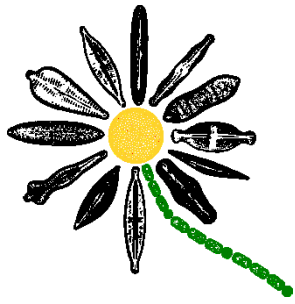
## Vzorkování

### **Vzorkovací období:**

Odběr vzorku je optimálně prováděn **čtvrtletně**, zimní odběr je možné vynechat.

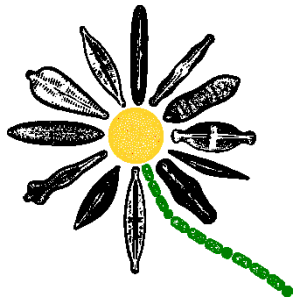
Odběry vzorku se provádějí:

- v jarním období (březen – polovina května)
- v letním období (konec června – polovina srpna)
- v podzimním období (říjen – polovina listopadu)



# Odběr fyto-bentosu

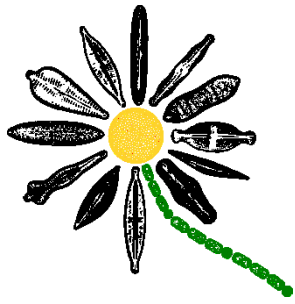
- Výběr reprezentativního- charakteristického úseku toku (s větším množstvím vyjmutelných kamenů)
  - Označení odběrového úseku (slovní, GPS souřadnice, fotografie)
  - Výběr podkladu- odebírá se přednostně epiliton (nárost na kamenech; vedle fototrofních organismů (sinic a řas) obsahuje i heterotrofní složku)
  - Preferovány kameny o velikosti 10-20 cm (stabilní, umožňují rozvoj společenstva)
  - Odběr z cca 5 kamenů
  - Odběr z hlavního proudu řeky
- + Základní měření: (teplota vody, koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH a elektrická vodivost)



# Odběr fyto bentosu

## Vlastní odběr

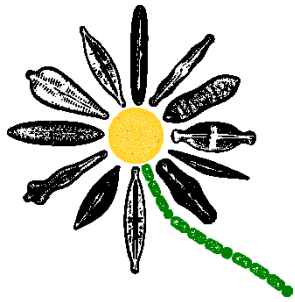
- Odstranění nečistot, detritu
- Dále možné dva způsoby: přímý seškrab do vzorkovnice, či oškrábání nárostu do misky + v misce kamen opláchnout
- K odběru lze použít: kartáček, skalpel, nůž, lžíci- nutno vždy opláchnout v říční vodě
- Odběrová lahvička se neplní až po okraj (ideálně do  $\frac{3}{4}$ ), aby se nevyčerpal kyslík
- Popis
- Transport
- Zpracování do 48 hodin od odběru, jinak nutná konzervace formaldehydem



# Odběr fyto bentosu

## Zpracování vzorku

- Analýza v čerstvém stavu
- Determinace
- Kvantifikace
- Registruje se stav organismů
- Fotodokumentace
- Determinace



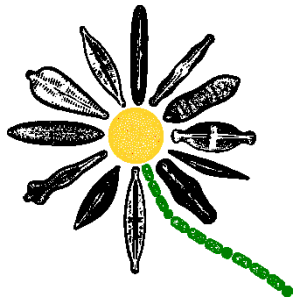
# Odběr fyto bentosu

Kvantifikace: Kvantitativní zastoupení jednotlivých druhů se provádí při slabším zvětšení, pomocí odhadní stupnice, která druhy zařazuje do určitých intervalů na základě odhadu jejich abundance v mikroskopickém preparátu analyzovaného vzorku (Sládečková & Marvan 1978).

Nejčastěji je používána stupnice:

- 6 - druh masově zastoupený, s pokryvností 90 - 100%
- 5 - druh velmi hojný, s pokryvností 50 - 90%
- 4 - druh hojný, s pokryvností 20 - 50%
- 3 - druh dost hojný, s pokryvností 5 - 20%
- 2 - druh zřídka, s pokryvností 1 - 5%
- 1 - druh velmi zřídka, s pokryvností 0,1 - 1%
- + - druh ojediněle zastoupený, s pokryvností do 0,1%

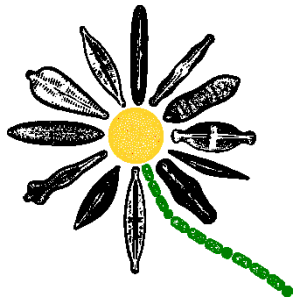




# Odběr fytoENTOSU

Zpracování vzorku rozsivek

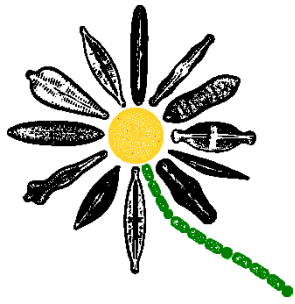
- Odstranění buněčného obsahu oxidačními činidly
- Poté připravení preparátu pomocí uzavíratelných médií



# Molekulární metody

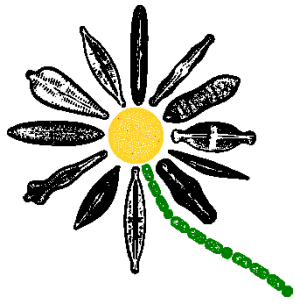
1. Izolace DNA (extrakční kity)
2. Amplifikace DNA (vybraného úseku) – PCR
3. Naklonování DNA (produktů PCR)
4. Sekvenace
5. Analýza (srovnání na [www.algaterra.org](http://www.algaterra.org))

Příklad- výběr 18S SSU rRNA (ideální marker pro rozsivky, z ní výběr např 480 pb pro amplifikaci)



# Molekulární metody

- **Extrakce** probíhá podle návodu výrobce vybraného extrakčního kitu (pro rozsivky se používají např. Dneasy Mini Plant kit a Dynabeads DNA Direct Universal Kit)
- **Amplifikace** pomocí primerů (denaturace vlákna, navázání primerů)
- **Klonování** pomocí klonovacích kitů (TOPO TA Cloning™ Kit, klonování často v buňkách E-coli)
- **Sekvenování** (rekombinantních plazmidů E-coli)



# Molekulární metody

Důležité nalézt vhodný marker (měla by to být krátká sekvence DNA, která půjde lehce naamplifikovat)

Část DNA pro analýzu by však měla být dostatečně variabilní aby odlišila jednotlivé druhy



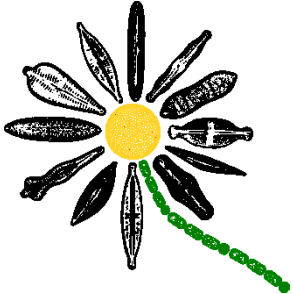
# Znaky používané (nejen) pro rozlišení druhů

- **Molekulární analýzy**

- Využívání vedlo k odhalení nečekané kryptické diverzity u rozsivek
- V současné době jsou osekvenovány 2 kompletní genomy rozsivek:
  - centrická *Thalassiosira pseudonana*
  - penátní *Phaeodactylum tricornutum*

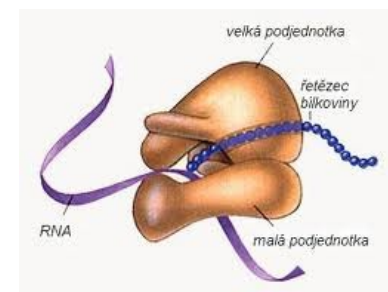
- **Využívání molekulárních dat:**

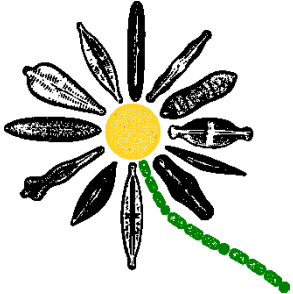
- ITS
- SSU rDNA a LSU rDNA
- plastidové geny *rbcL*
- mitochondriální gen *cox1*



# Molekulární analýzy

- **SSU neboli 18S rDNA** (malá ribozómová podjednotka)
  - využití pro rekonstrukci fylogeneze celé třídy rozsivek (zařazení druhu v rámci třídy), méně variabilní
- **LSU neboli 28S rDNA** (velká ribozomální podjednotka)
- **ITS1 a ITS2** (mezerníkové oblasti oddělující ribozomální podjednotku), velmi variabilní
  - ITS2 má schopnost rozlišit reprodukčně izolované druhy
- (Fce ribozomu: tvorba proteinů, probíhá na nich translace, při níž je z řetězce RNA syntetizován polypeptid)





# Molekulární analýzy

- **Mitochondriální genom**

- Využívá se oblast kódující proteinovou podjednotku cytochrom oxidasy (**cox1**)

- **Plastidový genom**

- Využívá se oblast kódující proteinovou velkou podjednotku enzymu RUBISCO

- Výhody oproti rDNA: jsou obsaženy

v genomu pouze v jedné kopii+ minimalizuje možnost amplifikace DNA z případné kontaminace houbami, která je poměrně běžná. Nevýhodou je nedostatečná znalost dědičnosti a dalších vlastností organelové DNA