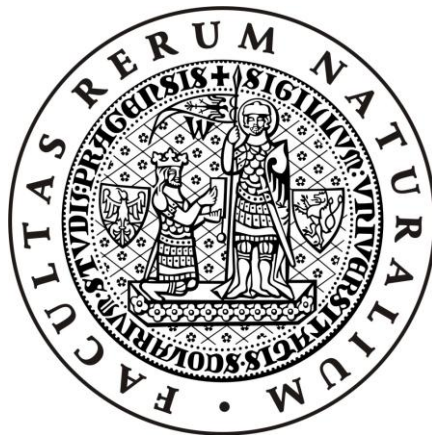


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie



MARTINA SAILEROVÁ

Experimentální ovlivnění líhnutí diapauzujících stádií perloočky
Daphnia obtusa

Influence of experimental conditions on hatching of diapausing stages
of the cladoceran *Daphnia obtusa*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha, září 2010

školitel: Doc. RNDr. Adam Petrušek, PhD.

PODĚKOVÁNÍ

Nejdříve bych ráda velmi poděkovala svému školiteli za jeho nekonečnou trpělivost a hlavně neocenitelné rady a připomínky během studia a při vzniku této práce.

Za rady při zpracování výsledků též děkuji Aleně Černíkové a Petru Juračkovi.

Za nezapomenutelné zážitky během studia a terénních kurzů, na které budu ráda vzpomínat, děkuji všem svým spolužákům: Hance, Evě, Scientíkovi, Danovi, Verče, Jirkovi, Martinovi, Markétě, Jakubovi, Tondovi, Saše a ostatním.

Můj největší dík patří mým rodičům, kteří mi umožnili studovat na vysoké škole a po celou dobu studia mě podporovali. Děkuji, že při psaní této závěrečné práce mi dodávali sílu a energii.

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	2
OBSAH	3
ABSTRACT	4
ABSTRAKT	5
1. ÚVOD	6
Dočasné vodní habitaty	6
Dormance, diapauza a bet-hedging	7
Faktory ovlivňující líhnutí diapauzujících stádií lupenonožců (Branchiopoda)	10
Charakteristika druhu Daphnia obtusa a rozmnožování perlooček (Cladocera)	14
Dosavadní poznatky o líhnutí diapauzujících stádií druhu Daphnia obtusa	15
Cíle práce	16
2. METODIKA	17
2.1 Lokalita a materiál	17
2.2 Zpracování vzorků a líhnutí	18
2.3 Používané světelné zdroje	23
2.4 Inkubace celého sedimentu	25
3. VÝSLEDKY	27
3.1 Porovnání úspěšnosti líhnutí při různých intenzitách osvětlení	27
3.2 Porovnání časového průběhu líhnutí při různých intenzitách osvětlení	30
3.3 Inkubace celého sedimentu	33
4. DISKUZE	34
5. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	41

ABSTRACT

Diapause is often an adaptation for survival during periods of harsh environmental conditions. Some diapausing stages do not terminate the dormancy once the favourable conditions are restored. Such prolonged diapause may be enforced by environment if a diapausing stage cannot be reached by the cues inducing termination of dormancy. However, it may also be an advantageous bet-hedging strategy to allow only a fraction of dormant stages produced in any given season to hatch the next time conditions become favourable. I tested whether such strategy can be observed in hatching patterns of dormant eggs of *Daphnia obtusa* – a cladoceran occurring in small Central European temporary waters. I investigated the influence of intensity of illumination on hatching success, and effect of isolating the eggs encased in ephippia from the sediment. Fraction of eggs terminating diapause, fraction of embryos successfully leaving the egg membranes, and timing of the response were assessed at 15 °C under four intensities of illumination (100% = $35\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, 75%, 50%, 25%; photoperiod 12h light: 12h dark) and in complete darkness for 21 days. My results support previous suggestions that there is no genetically-fixed bet-hedging strategy in *D. obtusa*. I observed high proportion of eggs which terminated diapause in all treatments. However, there was a positive relationship between the intensity of illumination and amount of hatchlings which successfully finished their hatching. A more intense light also influenced earlier emergence from the diapause. I discuss factors which might be important for termination of *Daphnia* diapause in these ephemeral habitats.

Keywords: bet-hedging, *Daphnia obtusa*, diapause, hatching, light intensity, resting eggs

ABSTRAKT

Diapauza je často adaptací, jak přežít období nepříznivých podmínek. Ovšem některá diapauzující stádia neukončují dormanci hned, jakmile nastanou vhodné podmínky. Tato prodloužená diapauza může být způsobena prostředím, pokud se diapauzující stádia nedostanou k podnětům, které by ukončily dormantní stav. Jiným důvodem může být také bet-hedging strategie, kdy se vylíhne pouze část dormantních stádií a zbytek zůstává na další vhodné období. Ve své práci jsem zjišťovala, zda se tato strategie projevuje při líhnutí dormantních vajíček u druhu *Daphnia obtusa* – perloočky obývající malé dočasné vody střední Evropy. Studovala jsem vliv intenzity osvětlení na úspěšnost líhnutí a efekt izolace efipií (obsahující dvě vajíčka) ze sedimentu. Množství vajíček ukončujících diapauzu a množství embryí, která úspěšně dokončila líhnutí, a načasování těchto dějů, bylo zjišťováno za inkubační teploty 15 °C, čtyř intenzit osvětlení (100% = 35 μmol.m².s⁻¹, 75%, 50%, 25%; fotoperioda 12h světla: 12h tmy) a úplné tmy po dobu 21 dní. Mé výsledky podporují předpoklad, že se u této perloočky nevyskytuje geneticky daná strategie bet-hedging. Pozorovala jsem velký podíl vajíček, která ukončila diapauzu při všech testovaných podmínkách. Nicméně jsem zjistila pozitivní závislost množství úspěšně vylíhnutých jedinců na intenzitě osvětlení. Zároveň při vyšší intenzitě osvětlení byl časový průběh tohoto děje rychlejší. V práci rozebírám faktory, které mohou být důležité pro ukončení diapauzy u perlooček rodu *Daphnia* v těchto efemerních habitatech.

Klíčová slova: bet-hedging, *Daphnia obtusa*, diapauza, intenzita osvětlení, líhnutí, trvalá vajíčka

1. ÚVOD

Dočasné vodní habitaty

Pozornost ekologů a ochranářů přírody se často zaměřuje hlavně na rozsáhlé nebo atraktivní ekosystémy, jako jsou například mokřady, jezerní a říční ekosystémy, korálové útesy či deštné pralesy. Ačkoli studium a ochrana těchto ekosystémů je bezesporu důležitá, zároveň často vede k přehlížení menších ekosystémových jednotek, jakými jsou i dočasné vodní habitaty (De Meester et al. 2005). Mezi dočasné vodní plochy řadíme všechny stojaté vody, které pravidelně nebo nepravidelně vysychají. Jsou celosvětově běžné ve všech ekosystémech od pouští až po deštné lesy (Céréghino et al. 2008) a liší se mezi sebou svými fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi. Zdrojem vody pro tyto habitaty jsou například srážky, kondenzace, povodně, tání sněhu nebo vzestup hladiny spodní vody (Blaustein & Schwartz 2001). Většinou jsou malé rozlohy, mají jasně vymezené hranice, jednoduchý potravní řetězec a jsou početně zastoupeny v krajině hned v několika replikacích, což představuje velmi vhodný model pro studium ekologických a evolučních teorií (Blaustein & Schwartz 2001, Therriault & Kolasa 2001). V poslední době se zájem o tyto habitaty zvyšuje (Céréghino et al. 2008). Jedním z důvodů je, že i přes svou malou velikost mohou hostit unikátní soubor druhů, které se nevyskytují ve velkých a stálých vodních habitatech (např. z důvodu predace), ale pouze v těchto jednoduchých systémech (Blaustein & Schwartz 2001). Organismy obývající dočasné vodní habitaty jsou vystaveny variabilním a často extrémním podmínkám (De Meester et al. 2005) a musely se přizpůsobit lokálním mikroklimatům (Blaustein et al. 1999). Neméně důležitá úloha malých vodních ploch v krajině je funkce refugií (De Meester et al. 2005) a migračních koridorů (Céréghino et al. 2008). Přesto byly dočasné vody dlouhou dobu stranou hlavního zájmu ekologů a jejich počet byl díky lidské činnosti v posledním století velmi redukován. Z těchto uvedených a mnoha dalších důvodů vyplývá potřeba dočasné vodní habitaty chránit.

Dormance, diapauza a bet-hedging

Nepředvídatelnost existence vodního habitatu je klíčová pro vytváření diverzifikovaných strategií, jak druh může dlouhodobě přežít na lokalitě. Zároveň to ovlivňuje jeho časové uspořádání životního cyklu (Blaustein & Schwartz 2001). Některé z dočasných vodních ploch vysychají po několik let, některé jsou zaplaveny vícekrát do roka, jiné jsou zaplaveny po dlouhou dobu, ale s výrazným kolísáním vodní hladiny během roku nebo se zamrzáním během zimních měsíců. Pro permanentní faunu, která nemůže v nepříznivém období migrovat do jiného prostředí, je jednou z možností vytváření resistantních dormantních stádií.

Schopnost přežít v dormantním stádiu je široce rozšířená vlastnost mezi bezobratlými. Je to nespecifická obrana vůči širokému spektru nepříznivých podmínek, které organismus přežívá snížením svého metabolismu (Alekseev & Starobogatov 1996). Některé druhy zůstávají v dormanci pouze po dobu, kdy jsou pro aktivní stádium okolní podmínky nepříznivé. Tento klidový stav, kam patří hibernace, estivace či kryptobióza, je vyvoláván i ukončován vlivem vnějších podnětů (Brendonck 1996, Cáceres 1997). Oproti tomu je diapauza sice také stav fyziologického klidu, ale navozený vnitřními podněty (Brendonck 1996, Alekseev & Starobogatov 1996, Cáceres 1997). Ukončení diapauzy vyžaduje speciální podnět, který může, ale nemusí korespondovat s obnovením příznivých vnějších podmínek prostředí (Cáceres 1997), což vede k domněnce, že diapauza je pevně naprogramovaná v embryonálním vývoji (Brendonck 1996). U skupiny korýšů je podstata diapauzy poměrně dobře známá, ale faktory, které mají vliv na její ukončení, nejsou uspokojivě objasněny (Brendonck et al. 1996, Cáceres 1997).

Mezi permanentní faunu vyskytující se z velké části ve vodním prostředí, které pravidelně nebo nepravidelně vysychá, promrzá nebo vykazuje změny hladiny, patří lupenonožci (Branchiopoda). Je to jedna ze tříd korýšů, která díky své adaptaci na tyto habitaty přežila od Kambria (Brendonck 1996). Tito korýši dlouhodobě přežívají právě pomocí diapauzujících propagulí. Jejich diapauzující stádía, tradičně nazývána trvalá vajíčka¹, mají resistantní obaly a mohou zůstat životaschopná několik desítek let (Hairston 1996).

¹ Nejedná se o vajíčka v pravém slova smyslu, ale o embrya s pozastaveným vývojem ve stádiu gastruly. Literatura na toto téma však často používá pro zjednodušení termín „vajíčko“ a ve stejném smyslu jej používám i já v této práci.

Dormantní propagule jsou produkovány často ve velkém množství a vytváří tak banku trvalých vajíček v sedimentu podobnou semenným bankám rostlin (Brendonck 1996). Banka vajíček slouží jako zdroj pro založení nové aktivní populace při obnově podmínek příznivých pro růst a reprodukci. Tvoří ekologickou a evoluční zásobárnu, a dokud má druh svou banku vajíček, je dobře chráněn před vymřením (Hairston 1996). Banka propagulí může být považována za jakýsi archiv historie lokality. Odráží změny habitatu v důsledku přírodních i antropogenních vlivů a může být použita k rekonstrukci evolučních procesů (Brendonck & De Meester 2003).

Dormantní propagule jsou vhodným prvkem pro disperzi a umožňují svému druhu kolonizovat nová prostředí (Fryer 1996). Disperzní propagule se mohou dostat do jiného habitatu díky propojení jinak oddělených vodních ploch v období záplav (Beladjal et al. 2007a, Hulsmans et. al. 2007). Pokud jsou trvalá vajíčka lehká, mohou být přenášena pomocí větru (např. Brendonck & Riddoch 1999, Cacéres & Soluk 2002, Vanschoenwinkel et al. 2008b a 2009), takže po uvolnění ze sedimentu se mohou dobře šířit. Přenos propagulí je často způsoben také lidskou aktivitou, ať rekreační nebo výzkumnou. Trvalá vajíčka se mohou totiž přenášet na obuvi nebo pneumatikách vozidel (Waterkeyn et al 2010). Propagule mají často uzpůsobení, která zvyšují pravděpodobnost jejich transportu, jako jsou různé trny, které umožňují zachytávání na vnějším povrchu různých druhů živočichů. Tím je například prase divoké a pravděpodobně i další skupiny zvířat, které přicházejí do kontaktu s malými vodními habitaty, jako je srnec, ovce, vydra, bobr aj. (Thiéry 1997, Rulík 1999, Vanschoenwinkel et al. 2008a). Dokumentován byl také přenos na vnějším povrchu ptáků (Fryer 1996, Thiéry 1997). Trvalá vajíčka zůstávají životaschopná i po průchodu trávicím traktem vodních druhů ptáků (Figuerola & Green 2002, Figuerola et al. 2003) a trávicím traktem ryb (Beladjal et al. 2007a) a je to jeden z možných a efektivních způsobů distribuce. Některé druhy naopak přichycují svá vajíčka k substrátu nebo vegetaci a snižují tak možnost jejich disperze. Někdy je totiž výhodnější zůstat na habitatu, kde vajíčka vznikla a kde jsou zrovna vhodné podmínky, než riskovat disperzi do jiných míst (Fryer 1996, Brendonck & De Meester 2003).

Načasování ukončení diapauzy je kritickou částí životního cyklu pro mnoho organismů z nepředvídatelného prostředí (Hanski 1988). Hlavní hrozbou pro permanentní faunu z dočasných vodních habitatů je jeho brzké vyschnutí. Už vylíhlá zvířata nemohou

dokončit svůj životní cyklus a nevytvoří tak novou generaci trvalých stádií (Brendonck 1996). Toto abortivní líhnutí může zredukovat banku vajíček nebo dokonce vést k vymření populace na lokalitě (Spencer et al. 2001). Zřejmě právě z tohoto důvodu se trvalá stadia mnoha taxonů nelíhnou všechna při prvním znovu zaplavení habitatu, ale zůstávají v diapauze i přes několik vhodných období (Brendonck & De Meester 2003). Tato takzvaná prodloužená diapauza je pravděpodobně následkem několika faktorů a je ochranou před abortivním líhnutím při krátkém cyklu zaplavení (Philippi et al. 2001). Může být buď navozená podmínkami okolního prostředí, například pokud sediment zabraňuje přístupu podnětů líhnutí k vajíčkům (De Stasio 1989, Hairson et al. 1995) nebo může být projevem plastické odpovědi na blížící se vyschnutí habitatu. Jedinci takových taxonů jsou schopni urychlit, zkrátit nebo pozastavit svůj životní cyklus v případě potřeby (Blaustein & Schwartz 2001). Podobnou strategii plastické odpovědi můžeme najít u jednoletých rostlin a suchozemských bezobratlých. Některé rostliny, vyskytující se v nepředvídatelném vodním habitatu, využívají tzv. strategii *bet-hedging*, kdy pouze určitá frakce semen ze semenné banky vyklíčí v dané vodní fázi, a tak vzroste pravděpodobnost přežití druhu na lokalitě po delší dobu (Cohen 1968, Philippi 1993a,b). Bet-hedging strategie maximalizuje dlouhodobou fitness na úkor krátkodobé fitness pro jednu generaci a snižuje tak rozdíly mezi generacemi (Philippi et al. 2001). Jinými slovy, podstatou této strategie je optimalizace podílu jedinců, kteří se najednou vylíhnou. Tento koncept byl použit i pro vysvětlení přežívání vodních bezobratlých v efemerních habitatech (De Stasio 1989, Philippi et al. 2001). Podíl trvalých vajíček, která se při příchodu vhodných podmínek vylíhnou, by měl odpovídat pravděpodobnosti úspěšného dokončení životního cyklu a doplnění banky vajíček. Podíl těch, kteří se nevylíhnou, by naopak měl být roven pravděpodobnosti (takřka) úplného selhání produkce trvalých vajíček (Cohen 1968, Van Dooren & Brendonck 1998, Philippi et al. 2001). Není tedy překvapující, že prodloužená diapauza jako projev bet-hedging strategie je často nacházena u organismů z efemerních prostředí (Simowich & Hathaway 1997, Van Dooren & Brendonck 1998, Philippi et al. 2001). Navíc tato strategie nemusí být pouze obranou proti vyschnutí habitatu, ale může dobře sloužit také proti jiným hrozbám, jako je např. predace (Blaustein 1997).

Faktory ovlivňující líhnutí diapauzujících stádií lupenonožců (Branchiopoda)

Do jaké míry je dormance u lupenonožců řízena endogenně a exogenně není stále objasněno. Specifické podmínky pro aktivaci diapauzujících stádií a líhnutí se liší jak mezi druhy, tak i mezi populacemi. Různorodost podnětů ovlivňujících líhnutí je obecně brána jako adaptace na konkrétní habitat (Brendonck 1996). Studium faktorů, které hrají klíčovou roli při ukončení diapauzy a začátku líhnutí z diapauzujících stádií, je zásadní pro pochopení mechanismů diapauzy (Brendonck 1996) a ekologických a evolučních dynamik populací (dos Santos & Persoone 1998).

Mezi klíčové faktory patří délka hydroperiody (trvání vodní fáze), která je dána dostupnými zdroji vody na lokalitě. Těmi jsou například srážky, záplavy, tání sněhu nebo kondenzace (Blaustein & Schwartz 2001). Délku vodní fáze ovlivňuje velikost nádrže, vítr, teplota a propustnost substrátu (Therriault & Kolasa 2001). Podle morfometrie nádrže a místního klimatu, můžeme očekávat rozdílné požadavky na podněty k líhnutí a celkově rozdílné úspěšnosti líhnutí (Brendonck 1996). Velikost a předvídatelnost habitatu má vliv na rozdílnou životní strategii jak mezi druhy, tak i mezi populacemi jednoho druhu (Mura et al. 2003).

Dalším podstatným faktorem ovlivňující líhnutí je teplota. Každý druh nebo jednotlivá populace má své specifické teplotní optimum pro líhnutí (Brendonck 1996), které je převážně ovlivněno podmínkami prostředí, ve kterém se jedinec vyskytuje (Vandekerhove et al. 2005). U některých druhů se mění požadavek na optimální teplotu i podle vývojového stádia (Brendonck 1996, Mossin 1986). Mnoho druhů se líhne lépe při nižší teplotě, než je průměrná teplota na lokalitě (Brendonck et al 1998), což by mohlo být adaptivní odpovědí na správné načasování líhnutí na začátku sezóny (Pfrender & Deng 1998). Snižování teplot většinou doprovází déšť a snižování výparu, což má za následek delší trvání tůně a maximální reprodukční úspěch vylíhnutých jedinců (Van Dooren & Brendonck 1998). Pokud se vajíčka líhnou při širokém rozmezí teplot, odpovídalo by to spíše rozložení líhnutí na více možných období (Brendonck et al. 1998).

Jedním z nejdůležitějších uváděných faktorů, který ukončuje diapauzu, je fotoperioda a světelná intenzita. Vliv periodicity světla byl zjištěn u mnoha druhů koryšů a jen velmi malé procento druhů na něj reagovalo neutrálně (Alekseev & Starobogatov 1996). To, že sluneční záření patří mezi nejintenzivnější stimuly a že ve tmě se vajíčka líhnou prokazatelně méně

úspěšně, potvrzuje u rodu *Daphnia* mnoho studií (Pancella & Stross 1963, Pfender & Deng 1998, Cáceres & Swalbach 2001, Lass et al. 2005). Neutrální reakce na intenzitu osvětlení byla zjištěna jen u zábronožky *Artemia salina*, kdy byla stejná úspěšnost líhnutí cyst při různé škále intenzity světla (Sorgeloos 1973). Citlivost na světlo je také ovlivněna délkou a teplotou skladování. Větší citlivost vajíček na světlo se ukázala u vajíček předem skladovaných delší dobu ve tmě (Pancella & Stross 1963, Davison 1969, Schwartz a & Hebert 1987). Absence světla v sedimentu může chránit vajíčka před vylíhnutím se do nevhodných podmínek, pokud jsou uložena hlouběji v sedimentu (Alekseev et al. 2007). Také na dně hlubokých nádrží, kam dopadá jen malé procento světla z hladiny a zároveň je zde téměř konstantní teplota, vajíčka příliš nereagují na změny fotoperiody a světelné intenzity (Fryer 1996), přesto vykazují poměrně synchronizované líhnutí s ročním obdobím (Alekseev et al. 2007). U druhů z oblastí vyšších zeměpisných šířek jsou trvalá vajíčka mnohem citlivější na změnu fotoperiody a jsou podle ní více synchronizovaná s prostředím než v nižších zeměpisných šířkách. Na tyto populace působí silnější selekční tlak pro synchronizaci jejich životních cyklů s prostředím, protože období, kdy je světelná fáze dne dostatečně dlouhá pro růst, je relativně krátké (Vandekerkhove et al. 2005).

Další podmínkou pro úspěšné líhnutí je dostatek kyslíku, který je důležitý pro metabolickou aktivitu embrya (Brendonck 1996). Vyšší saturace kyslíku bývá na začátku zaplavení a postupně klesá s vysycháním. Změny koncentrace kyslíku ovlivňuje objem nádrže, teplota, aktivita fytoplanktonu a biologické interakce, jako je koncentrace organismů a bakteriální rozklad (Bonner et al. 1997, Lahr et al. 1999). Při pokrytí nádrže ledem dochází k degradaci a dekompozici organického materiálu, kdy se spotřebovává kyslík u dna. Navíc díky absenci konvenčního a turbulentního proudění se vrstvy nepromíchávají. Po roztátí ledové pokrývky dochází k míchání a prokysličení vrstev vodního sloupce, což může mít vliv na líhnutí dormantních stádií u dna (Alekseev et al. 2007). Moritz (1987) potvrzuje, že vajíčka se nelíhnou v takových oblastech habitatu nebo hloubkách nádrže, kde není dostatek kyslíku. Podle práce Strosse (1969) kyslík, který se dostane na dno, aktivuje embrya, ale úplné vylíhnutí je možné pouze při zvýšení teploty vody, což je častější v litorálních oblastech. Tůně jsou často i v letním období naplněny vodou z dešťových srážek, ale vysoká teplota a nízká saturace kyslíku jsou nevhodné pro líhnutí (Merta 2003).

Také nízký obsah rozpuštěných látek, který je charakteristický při novém zaplavení lokality, má pozitivní vliv na líhnutí (Schrönbrunner & Eder 2006), kdežto vzrůst obsahu

rozpuštěných látek je často spojen s poklesem hladiny a značí časově blízkou možnost úplného vyschnutí (Bonner et al. 1997). Při vzrůstu salinity mnoho sladkovodních korýšů zastavuje své líhnutí (Blaustein 1997). Dokonce podle několika autorů (Brown & Carpelan 1971, Brendonck 1996, Beladjal et al. 2007a) patří nízký obsah rozpuštěných látek spolu s dostatečnou koncentrací kyslíku k nejdůležitějším spouštěčům líhnutí v malých tůňkách. S koncentrací rozpuštěných látek je spojený osmotický tlak vody. Má vliv na objem prostoru těsně obklopující embryo pod membránami. Pokud překročí určitou hranici, objem se začne zvětšovat a napínat tak vnitřní elastickou membránu, což vede až k prasknutí vnější neelastické membrány a uvolnění embrya do vody (Fryer 1996). Pozitivní vliv nízkého osmotického tlaku vody na líhnutí je popsán u mnoha druhů při rozředění média. Nejúspěšnější líhnutí bylo zaznamenáno při nízké tvrdosti vody jako má destilovaná nebo deionizovaná voda (Brendonck 1996).

Další možnou adaptací na rozpoznání začátku nového zaplavení může být vnímání pH vody (Saiah & Parrin 1990). I když většinou jeho hodnoty kolísají jen drobně (Hancock & Timms 2002). Podle několika studií se pohybuje rozsah optimálního pH mezi 5-6 (Mossin 1986, Rulík 1999, Brendonck 1996).

Vliv různých faktorů na líhnutí záleží na hloubce uložení vajíček v sedimentu a možnosti přístupu těchto stimulů k nim (Moritz 1987). Samičky nemohou aktivně ovlivňovat vertikální transport vajíček, ten je ovlivněn sedimentací, pohybem vody (hydroturbace) a činností bentických a edafických organismů (bioturbace). Nejběžnější je bioturbace rybami a makrozoobentosem, jako jsou různí červi, hmyz (zejména jeho larvy), měkkýši apod. V dočasných vodách to můžou být navíc ptáci, dobytek a lesní zvěř (Brendonck & De Meester 2003). Cáceres & Hairston (1998) definovali tzv. „aktivní banku dormantních vajíček“ jako hloubku sedimentu, kde vajíčko ještě může dostat adekvátní podnět k líhnutí. Hloubka se uvádí často kolem 3 cm, ale záleží na habitatu, jaký typ disturbance se objevuje a jak je častá, a zároveň i na intenzitě podnětu, jaký se dostane k povrchové vrstvě sedimentu. U prvních 10-ti cm sedimentu se předpokládá, že se ještě může promíchat zpět do vrchních vrstev k líhnoucím spouštěčům (Hairston et al. 2000). Velká část vajíček však zůstává pohřbena hlouběji v sedimentu. V hlubších a teplotně stratifikovaných nádržích je větší akumulace a nižší stupeň promíchávání sedimentu (Cáceres & Tessier 2003) než v litorálních oblastech nebo mělčích nádržích (Gyllström & Hansson 2003). Na úspěšnost líhnutí má vliv i horizontální distribuce vajíček v nádrži. V menší hloubce nádrže jsou vhodnější podmínky

k líhnutí (vyšší teplota a více kyslíku), ale je zde větší procento poškozených vajíček mikroorganismy a fyzikálními faktory (Moritz 1987, De Meester et al. 1998). V hlubších místech nádrže jsou vajíčka zdravější, a tak vykazují vyšší procento líhnutí při vhodných podmínkách než vajíčka z menších hloubek jezera, i když jsou oboje odebrána ze stejné hloubky sedimentu (Moritz 1987). Horizontální distribuce vajíček je obecně nepravidelná a ostrůvkovitá, s větší denzitou v hlubších částech nebo návětrných stranách nádrže (Brendonck & De Meester 2003). Na horizontální distribuci má vliv vzplývavost vajíček, chování matky při uvolňování vajíček, převládající směr větru, distribuce vegetace a morfometrie nádrže.

Predátoři mohou banky vajíček ovlivňovat jednak přímo (případnou konzumací vajíček), tak i nepřímo (vylučovanými sekrety ovlivnit líhnutí). Přímá konzumace vajíček byla zjištěna u amfipoda rodu *Gammarus* (Cacéres & Hairston 1998). Negativní vliv na líhnutí díky vylučovaným látkám predátora byl prokázán za přítomnosti larev mloků rodu *Salamandra* (Blaustein 1997) avšak vliv kairomonů vylučovaných do vody rybami nebyl jednoznačně prokázán (Lass et al. 2005). Autoři se domnívají, že negativní vliv na líhnutí mají látky jen těch predátorů, kteří se na lokalitě vyskytují pravidelně (Lass et al. 2005). Možná vysvětlení jsou tři, buď chemické látky vylučované predátorem ovlivňují vajíčka a ta proto zastaví procesy vedoucí k líhnutí (tj. jednalo by se o adaptivní odpověď kořisti na přítomnost predátora), nebo jsou tyto chemické látky pro vajíčka přímo toxické, nebo vylučované chemické látky změny vlastnosti vody natolik, že negativně působí na líhnutí.

Vhodné podmínky pro líhnutí diapauzujících vajíček jsou druhově specifické (Cacéres & Schwalbach 2001) a mohou se lišit mezi vajíčky jednoho druhu (De Meester & De Jager 1993a) nebo mezi různými populacemi (Schwartz & Hebert 1987). Podle Zarattini (2004) jsou vnitrodruhové rozdíly v líhnutí důsledkem lokální adaptace. Pokud je ukončení dormance ovlivňováno selekcí prostředí, nepředvídatelné habitáty s častým výskytem nepříznivých podmínek mohou selektovat populace v rozdílné dormantní strategii, a tak se vajíčka produkovaná různými genotypy líhnou dle rozdílných podmínek prostředí (Cacéres & Tessier 2003). Přitom genotypy, které se líhnou dříve, se dostávají do početnější výhody než klony, které se líhnou na lokalitě později (Pfrender & Deng 1998). De Meester & De Jager (1993b) zjistili, že úspěšnost líhnutí není založena jen na stáří vajíček, ale také na citlivosti jednotlivých genotypů ke stimulu pro líhnutí.

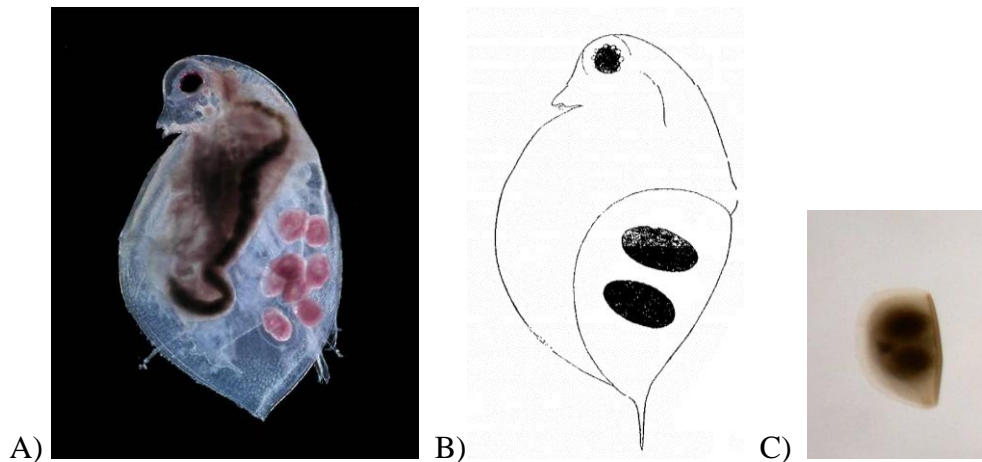
Maternální vliv se může projevit u vajíček také jejich různou senzitivitou na stimuly, a tak se některé líhnou dříve a některé později, např. při různé melanizaci efípií, kde pigmentace je dána hlavně maternálně (Cacères & Tessier 2003). Zároveň snůšky kladené ke konci života samičky vykazují vyšší úspěšnost líhnutí než snůšky vyprodukované v mladším věku. Stejný vztah zjistili Van Dooren & Brendonck (1998) u žábřonožky *Branchipodopsis wolffi*, kdy autoři předpokládají, že matky mohou využít svůj věk jako indikátor vhodného prostředí a ovlivnit tak genotyp a úspěšnost líhnutí svých vajíček. U mladších matek, kde podobný indikátor prostředí chybí, se vajíčka líhnou méně intenzivně. Jiným vysvětlením může být nižší životnost vajíček od starších samiček, a tak se taková vajíčka líhnou rychleji a při dřívější příležitosti než embrya od mladších matek (Van Dooren & Brendonck 1998).

Charakteristika druhu *Daphnia obtusa* a rozmnožování perlooček (Cladocera)

Při svém výzkumu jsem se zaměřila na druh *Daphnia obtusa*, která patří do skupiny cedivých perlooček (Crustacea: Cladocera: Anomopoda). Perloočky označované jako *D. obtusa* představují ve skutečnosti celý komplex druhů (Adamowicz et al. 2009). Jedinci ze studované lokality patří k *Daphnia obtusa* Kurz, 1874 (sensu stricto) vyskytující se ve střední Evropě. Jsou to středně velké perloočky (velikost dospělých samic se pohybuje v rozsahu 0,8 – 3,5 mm), obývající malé, většinou dočasné vody, jako jsou tůně a dešťové louže.

Perloočky se rozmnožují cyklickou partenogenezí, neboli střídáním partenogenetického a pohlavního rozmnožování. Většinu doby převládá rozmnožování partenogenetické a jednou či vícekrát do roka je vystřídáno pohlavním. Počet cyklů (tj. period pohlavního rozmnožování) vyplývá z okolních podmínek prostředí. Při příchodu určitých podmínek, většinou takových, které jsou nepříznivé pro další život dospělých jedinců, se z některých partenogenetických vajíček líhnou samičky, které produkují haploidní vajíčka místo partenogenetických. Z jiných partenogenetických vajíček se líhnou samečci a může dojít k pohlavnímu rozmnožování (např. Šrámek-Hušek et al. 1962, Dumont & Negrea 2002). Samičky po oplodnění vytváří diapauzující stádia, která po svlékání odkládají. Taková vajíčka jsou chráněna rezistentními obaly. V případě řádu Anomopoda, je vnější obal tvořen z karapaxu mateřského jedince a nazývá se efípium. V efípiu jsou uložena dvě diapauzující vajíčka, kde každé z nich je ještě obaleno průhlednou embryonální membránou. Přímým

vývojem se z vajíček líhnou neonaty, neboli první volná růstová stádia (Šrámek-Hušek et al. 1962).



Obr. 1. A) Partenogenetická samička druhu *Daphnia obtusa* Kurz, 1874. B) Samička s 2 trvalými vajíčky uloženými v efipiu (druh *D. pulex*). C) Efipium druhu *D. obtusa*

Dosavadní poznatky o líhnutí diapauzujících stádií perloočky *Daphnia obtusa*

Má práce navazuje na diplomovou práci J. Hotového (2005), jejíž výsledky byly publikovány ve studii Hotového & Petruska (2007). Autoři se zabývali mj. tím, zda se při líhnutí trvalých vajíček u druhu *Daphnia obtusa* z velmi malých vodních ploch (dešťových louží mírného pásma) vyskytuje strategie bet-hedging. Pro tuto strategii by měl být typický relativně nízký a variabilní podíl vylíhnutých jedinců. Ačkoli bychom to mohli u druhů z těchto efemerních vod očekávat, výsledky výše zmíněné studie to nepotvrdily. *Daphnia obtusa* vykazovala v laboratorních podmínkách vysokou úspěšnost líhnutí a nízkou variabilitu, i když autoři předpokládají, že v přírodních podmínkách je líhnutí méně úspěšné. Autoři diskutovali několik možných hypotéz vysvětlujících pozorované výsledky.

Příčinou těchto výsledků může být izolace efipií ze sedimentu, jejich zpracování a stejně optimální podmínky v pokusu při líhnutí vajíček (teplota 15 °C a fotoperioda 14h světla a 10 h tmy) oproti líhnutí v přírodních podmínkách. Experimentální podmínky mohly potlačit projevy strategie bet-hedging.

Dalším možným vysvětlením je to, že pokud v přírodě je vlivem prostředí jen relativně malá frakce vajíček vystavena spouštěčům líhnutí, například vlivem snížené intenzity světla

dané zakalením vody nebo překrytím efipií sedimentem, není již nutná selekce vůči strategii bet-hedging. Zároveň pokud jsou populace vystaveny časté hrozbě destrukce a vymizení lokality, mohou být vajíčka nastavena tak, aby se pokusila vylíhnout, pokud se dostanou ke spouštěčům líhnutí a jejich strategie je zaměřena spíše na disperzi a kolonizaci nových lokalit. Pokud tedy vystavíme vajíčka optimálním spouštěčům, pokusí se všechna vylíhnout.

Jiným možným vysvětlením je, že v případě této zkoumané populace (nebo celého druhu) se strategie proti vyschnutí lokality vůbec nevyvinula z důvodu, že tyto vody mají nepředvídatelný charakter pouze z pohledu člověka, ale z pohledu druhu *Daphnia obtusa* je hydroperioda habitatu dostatečná pro jejich životní cyklus a není tedy potřeba vytvářet strategii dlouhodobého přežívání.

Cíle práce

Cílem mé diplomové práce bylo navázat na tyto výsledky a pokusit se objasnit alespoň některé z možných příčin a otázek z nich vyplývajících. Při obdobných laboratorních postupech, jsem se pokoušela zjistit vliv použitých inkubačních podmínek na líhnutí vajíček druhu *Daphnia obtusa* ve výše zmíněné studii. Cílem bylo zjistit, zda se strategie bet-hedging projeví při méně optimálních podmínkách inkubace. V rámci této úlohy jsem zkoumala vliv různé intenzity osvětlení na úspěšnost a časový průběh líhnutí efipií vyjmutých ze sedimentu. Pro zjištění vlivu extrakce efipií ze sedimentu, jsem nakonec porovnála i líhnutí vzorku celého sedimentu obsahujícího efipia. U tohoto pokusu jsem zároveň sledovala, jestli má na líhnutí vliv pravidelné promíchávání sedimentu.

Hypotézy testované v rámci diplomové práce byly následující:

- 1) Různá intenzita osvětlení má vliv na množství trvalých vajíček, která ukončí diapauzu
- 2) Různá intenzita osvětlení ovlivňuje časový průběh líhnutí
- 3) Extrakce efipií ze sedimentu pozitivně ovlivňuje úspěšnost líhnutí
- 4) Promíchávání sedimentu má pozitivní vliv na líhnutí

2. METODIKA

2.1 Lokalita a materiál

Sediment s efípií byl odebrán z lokality „Tůň v rákosině“ v CHKO Kokořínsko v Čechách (obr. 2.). Jedná se o menší efemerní tůň (cca 2m x 6m) v nivě potoka Liběchovka, 1 km od obce Medonosy (N 50° 30' 06'', E 14° 29' 27''), která byla nově vytvořena v roce 1996 a na které probíhalo sledování biodiverzity zooplanktonu v rámci projektu BIOPOOL². Jediným druhem třídy lupenonožců (Branchiopoda), který se vyskytoval na uvedené lokalitě za sledované období (2005-2009), byla perloočka *Daphnia obtusa* Kurz (1874).



Obr. 2. Odběrová lokalita Tůň v rákosině

Mokrý sediment byl odebrán v zimních měsících (únor/březen v roce 2009 a 2010), kdy tůň byla ještě zamrzlá a populace nebyla aktivní. Pro vlastní odběr byl vytvořen otvor v ledu a pomocí plastového kelímku bylo odebráno několik vrchních centimetrů mokrého sedimentu obsahujícího efípiu (obr. 3. - 5.). Vzorky byly uloženy do plastového sáčku a v přirozeně vlhkém stavu skladovány ve tmě při teplotě 4 °C. Délka skladování se pohybovala od jednoho týdne do 3 měsíců.

² <http://bio.kuleuven.be/de/dea/biopool/index.html>



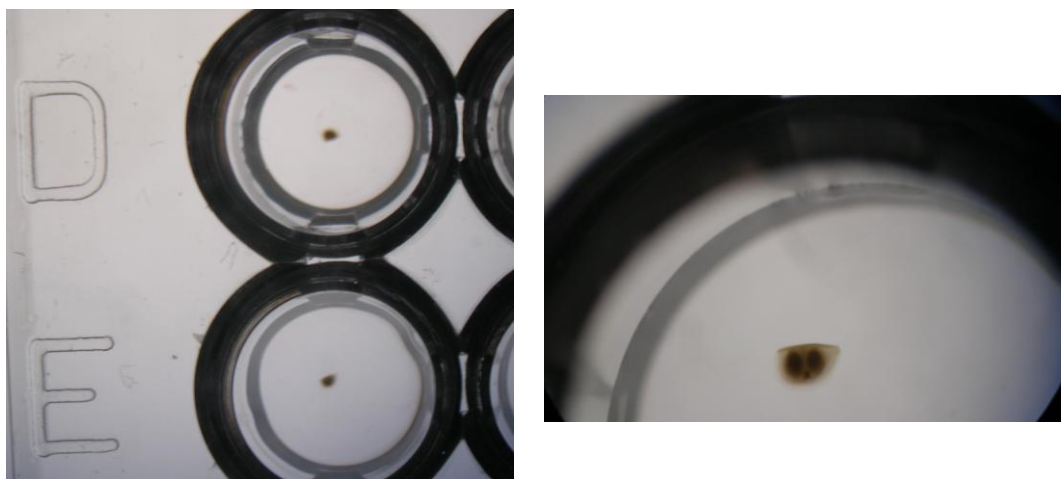
Obr. 3. - 5. Odběr sedimentu

2.2 Zpracování vzorků a líhnutí

Při zpracování byly vzorky sedimentu nejprve proplaveny přes síto o velikosti ok 1 mm, tím byly odstraněny velké částice detritu. Zbytek vzorku byl proplaven přes síto o velikosti ok 300 μm , čímž byla odstraněna nejjemnější frakce sedimentu. Materiál zachycený na tomto sítu byl poté rozplaven ve vodovodní vodě, prohlédnut pod stereomikroskopem a byla z něj vybrána všechna efipia, která byla vizuálně v dobrém stavu.

Pro zjištění, zda vizuálně dobrý stav efipií odpovídá obsahu 2 neporušených vajíček uvnitř, bylo otevřeno 10 efipií pomocí preparačních jehel a zkontrolován skutečný stav.

Vybraná efipia byla následně inkubována. Pro inkubaci jsem používala titrovací destičky s 96 jamkami o objemu cca 400 μ l. Do každé jamky bylo vždy umístěno jedno efipium (obr. 6. a 7.). Jako inkubační médium jsem použila roztok používaný pro kultivaci perlooček: směs odstáté vodovodní vody a deionizované vody v poměru 2:1 s přídavkem 1,5 ml 10% roztoku mořské soli a 10 ml SMB média (salt medium for *Blepharisma*, Strüder-Kypke et al. 2000) na 1 litr média. Médium nebylo v průběhu líhnutí vyměňováno, pouze v případě, že některá z jamek vysychala, byla doplněna malým množstvím deionizované vody. Titrační destičky byly překryty fóliemi a neutrálními šedými filtry s různou propustností světla podle požadované intenzity (obr. 8.).



Obr. 6. a 7. Efipium v jamce titrační destičky

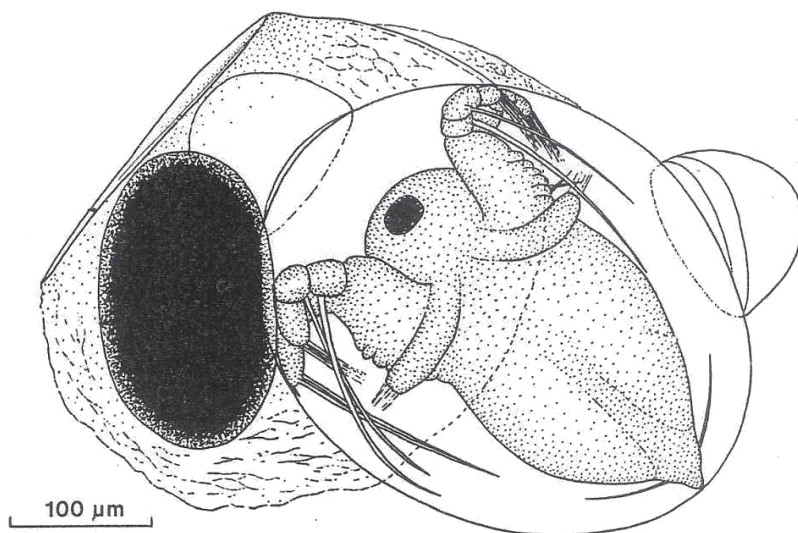


Obr. 8. Titrační destička a neutrální šedé filtry

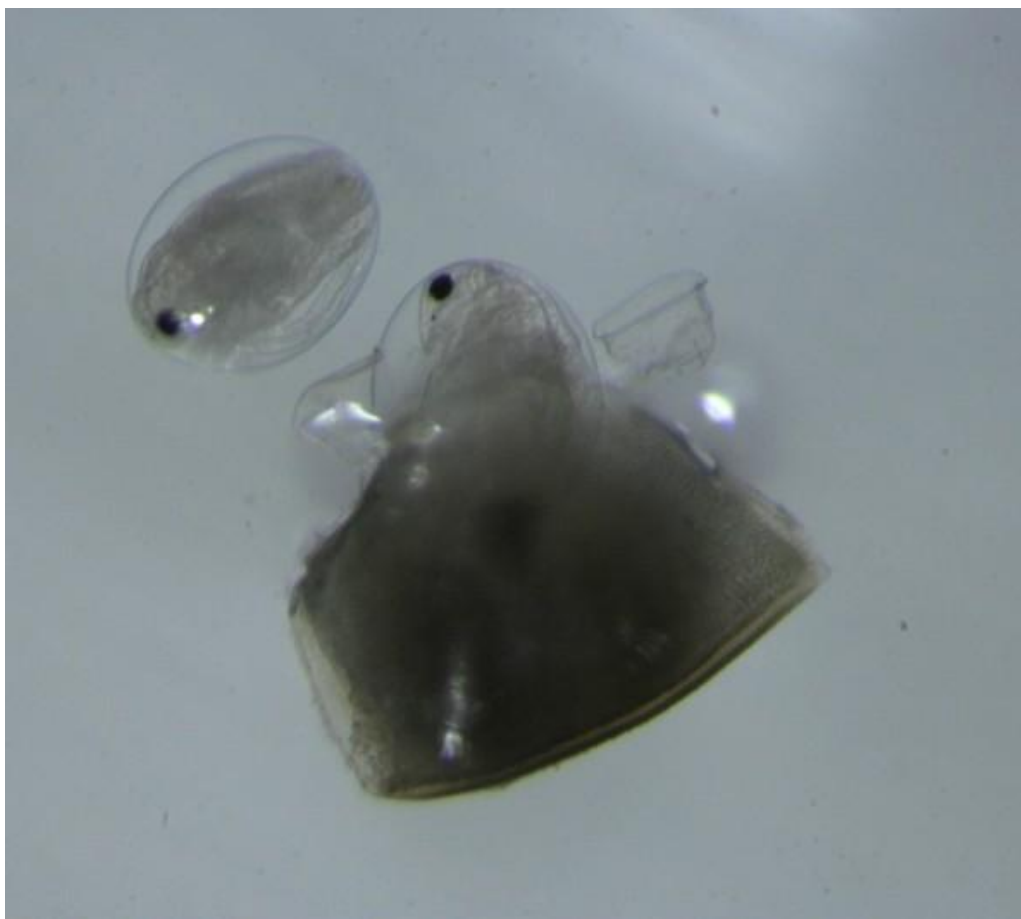
Intenzita světla procházející skrz fólie byla stanovena pomocí senzoru pro měření fotosynteticky aktivního záření Li-1400 (Li-Cor, USA). V roce 2009 jsem vytvořila čtyři varianty osvětlení v pokusu (100%, 75%, 50% a 25%). Překrytí průhlednou fólií dovolující průnik veškerého světla v inkubátoru je označeno jako 100% osvětlení a odpovídá $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. 75% osvětlení v inkubátoru bylo vytvořeno 7 vrstvami této průhledné fólie, 50% osvětlení zajistila jedna vrstva neutrálního šedého filtru a 25% osvětlení 3 vrstvy tohoto filtru. V roce 2010 jsem doplnila líhnutí za tmy ve dvou variantách, kdy jedna paralelka vajíček byla denně kontrolována (označená jako '0%-K') a průběžně byl zaznamenáván počet nově vylíhnutých jedinců, v druhé paralelce (označené jako '0%-T') probíhalo líhnutí bez průběžné kontroly a vajíčka byla tedy osvětlena pouze na začátku experimentu a na jeho konci. Úplnému zabránění průniku světla jsem dosáhla díky zabalení celé titrační destičky do hliníkové fólie. Inkubace probíhala v inkubátoru značky Sanyo za teploty $15 \text{ }^\circ\text{C}$ při světelném režimu 12 hodin světlo – 12 hodin tma po dobu 21 dnů.

Počet nově vylíhlých jedinců byl kontrolován denně. Vždy pouze jedna titrovací destička s efípií byla přenesena do temné místnosti, aby se minimalizovala doba působení vyšší teploty, než byla teplota v inkubátoru. Doba kontroly jedné destičky se pohybovala okolo 10 minut. Kontrola stavu každé jamky s efípiem probíhala za světelného zdroje stereomikroskopu překrytého červenou fólií (použité světelné zdroje jsou detailněji rozebrány níže). Zaznamenávala jsem datum ve třech rozdílných stavech líhnoucích se vajíček. Jedním

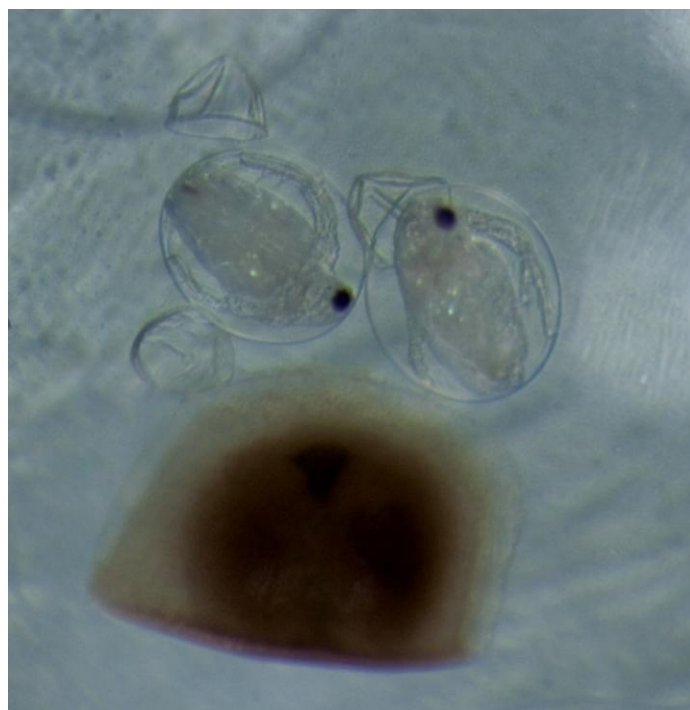
byl přímý vývin z trvalého vajíčka v aktivního jedince, druhým byl vývoj pouze do stádia těsně před vylíhnutím (tj. neonata, která je ještě uzavřena v embryonální průhledné membráně, obr. 9., 10. a 11.) a třetím byl případ, kdy se neonata dostala ven z embryonálního obalu a začala aktivně plavat.



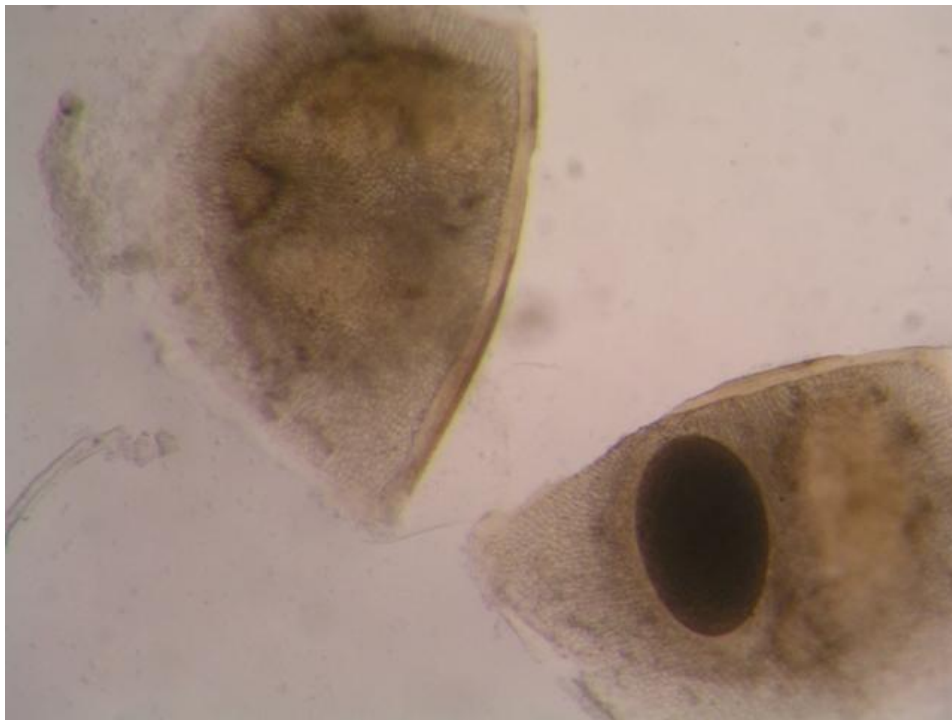
Obr. 9. Neonata druhu Streblocerus serricaudatus uzavřená ve embryonálním obalu, připravena k vylíhnutí (kresba převzata z Fryer 1996)



*Obr. 10. a 11.
Fotodokumentace
neonaty druhu
Daphnia obtusa
uzavřené
v embryonální
průhledné membráně
před vylíhnutím.*



Po ukončení třítýdenní inkubace byla všechna efipia otevřena pomocí preparačních jehel a byl zkontrolován jejich počáteční stav a zpětně dopočítán skutečný počet vajíček vystavených pokusu (obr. 12.). Nalezená vajíčka uvnitř efipií, která byla v dobrém stavu a stále nevylihnutá, byla na 14 dní vysušena a uložena ve tmě při teplotě 4 °C. Po této době byla znovu zaplavena médiem a inkubována za teploty 15 °C při konstantním osvětlení pro zjištění jejich životaschopnosti.

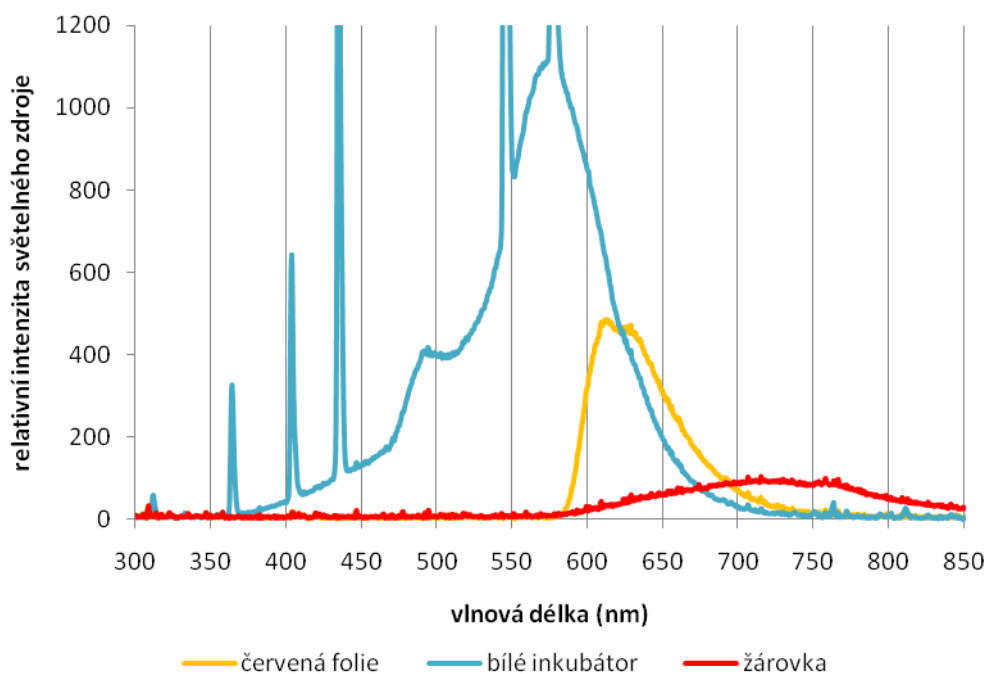


Obr. 12. Efípium po otevření s jedním trvalým vajíčkem

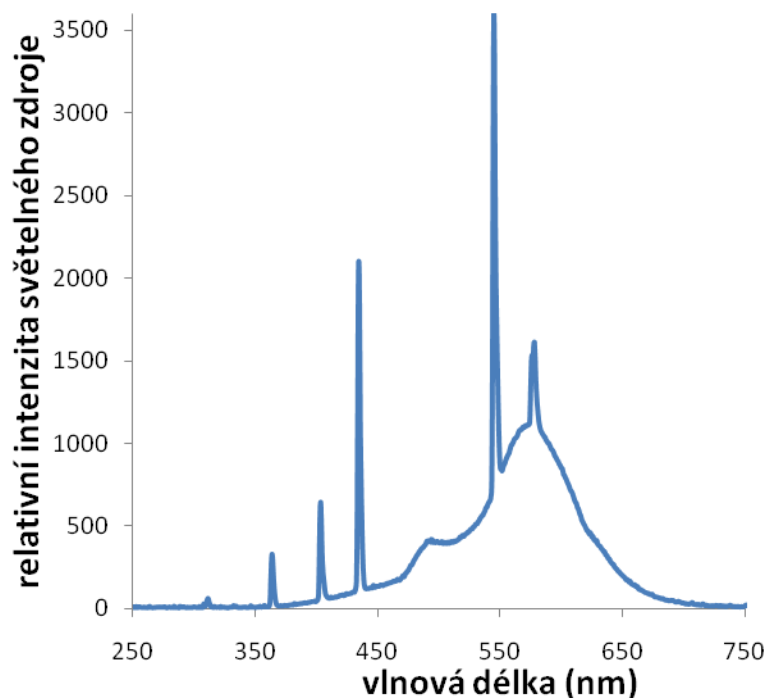
2.3 Používané světelné zdroje

Z důvodu sledování vlivu osvětlení na líhnutí efipií jsem po celou dobu zpracování vzorků pracovala pouze s použitím slabého osvětlení v dlouhovlnné oblasti světelného spektra. Tímto zdrojem byla buď červená 40W žárovka používaná při zpracování fotografií ve fotokomoře nebo světelný zdroj stereomikroskopu tvořený bílými LED diodami překrytý červenou folií. Světelné spektrum těchto zdrojů bylo změřeno pomocí spektrofotometru Avantes (AVS-USB2000) a je znázorněno na obr. 13. Oba zdroje červeného světla použitého

při zpracování vzorků a při denní kontrole nově vylíhnutých jedinců měly světelné spektrum od 580 nm vlnové délky. Červená folie zakrývající světelný zdroj stereomikroskopu dosahovala maximální vlnové délky 760 nm, použitá červená žárovka 860 nm. Světelný zdroj stereomikroskopu vydával intenzivnější záření než 40 W žárovka, ale oproti světelnému zdroji bílého světla v inkubátoru použitého při líhnutí vajíček vydával až 7x méně intenzivní záření. Světelným zdrojem při líhnutí vajíček v inkubátoru Sanyo byly 2 zářivky vydávající dohromady bílé světlo o světelném toku $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Spektrum tohoto zdroje bylo spojité, nicméně vykazovalo několik výrazných maxim v oblasti mezi 360 a 580 nm, maximální intenzita byla při vlnové délce 550 nm (obr. 14).



Obr. 13. Spektrum vlnových délek použitých světelných zdrojů



Obr. 14. Spektrum vlnových délek světelného zdroje v inkubátoru

2.4 Inkubace celého sedimentu

Pro testování vlivu vyjmutí efipií ze sedimentu na jejich líhnutí jsem inkubovala vzorek celého sedimentu obsahující efipia, odebraný ze stejné lokality. Zároveň jsem chtěla otestovat vliv disturbance sedimentu na líhnutí efipií. Pro pokusy byly použity dvě průhledné misky o rozměrech 21 x 15 cm. Do nich byl rozprostřen vzorek sedimentu v přirozeně mokřém stavu do maximální výšky 2 cm. Obě dvě misky se sedimentem byly zality stejným inkubačním médiem SMB, jaké bylo použito do jamek v titrovacích destičkách, o objemu vody 1400 ml. Poté byly misky překryty průhlednou fólií proti nadměrnému vysychání a inkubovány za stejné teploty a fotoperiody jako efipia vyjmutá ze sedimentu (15 °C, 12h:12h) a při plné intenzitě světla vydávaného 2 zářivkami v inkubátoru. První tři dny pokusu byl sediment v obou vzorcích promícháván 2 krát denně. Sediment v jedné misce byl dále promícháván obden, v druhé misce zůstal sediment po zbylou dobu trvání pokusu víceméně netknutý (Obr. 15.).



Obr. 15. Inkubace celého sedimentu.

Každý den po dobu 21 dní byl vodní sloupec nad sedimentem kontrolován vizuálně (za pomoci kapesní lupy), pro zjištění, zda se vylíhli noví jedinci, kteří by byli odebráni z pokusu. Po skončení pokusu byl objem inkubačního média slit a znovu překontrolován pro nalezení vylíhnutých jedinců. Poté byl sediment rozplaven přes jemné síto (stejný postupem jaký je popsán výše) a zachycená část sedimentu byla rozplavena v malém množství vodovodní vody, prohlédnuta pod stereomikroskopem, kde byla vybrána všechna efipia. Ta byla následně otevřena pomocí preparačních jehel a zpětně byl zjištěn stav vajíček použitých v pokusu.

Pro vyhodnocení výsledků jsem používala statistický program R (dostupný z www.r-project.org). Závislost množství aktivovaných a vylíhnutých jedinců na intenzitě osvětlení jsem testovala pomocí lineární a logistické regrese. Pro časové průběhy líhnutí jsem vzhledem k pravděpodobnému narušení normality dat použila neparametrický Kruskal-Wallisův test.

3. VÝSLEDKY

Ve svých pokusech jsem zkoumala vliv různé intenzity osvětlení na úspěšnost a časový průběh líhnutí trvalých vajíček. Při vyhodnocení dat jsem se zaměřila na dva hlavní stavy líhnoucích se vajíček. Zajímala mě hlavně fáze úspěšnosti líhnutí, což jsem definovala jako stav, kdy za daných laboratorních podmínek vajíčka ukončila diapauzu a zahájila vývoj. Taková vajíčka ve své práci nazývám aktivovaná vajíčka, tj. vajíčka, která díky podmínkám v pokusu ukončila diapauzu a začala se vyvíjet minimálně do stavu vizuálně rozeznatelné neonaty. Z aktivovaných vajíček se pouze určitá frakce jedinců úspěšně vylíhla (tj. jedinec opustil efipiální i embryonální obaly a mohl aktivně plavat). Ti, co líhnutí nedokončili, zůstali do konce pokusu ve stádiu neonaty uzavřené v embryonální membráně, ze které se nebyli schopni dostat ven (viz výše obr. 9., 10. a 11.).

3.1 Porovnání úspěšnosti líhnutí při různých intenzitách osvětlení

Celkem bylo vytvořeno sedm paralelních pokusů s různou intenzitou osvětlení vajíček při inkubaci a bylo testováno dohromady 594 efipií. Z tohoto počtu bylo v průměru okolo 33 % prázdných efipií. Ze zbylého množství efipií tvořil průměrný počet vajíček na 1 efipium mezi 1,4-1,7 (Tab. 1.). Celkem bylo inkubováno 630 vajíček.

Tab. 1. Souhrnná tabulka množství efipií a vajíček v pokusu

experiment v roce	osvětlení	počet efipií	počet prázdných efipií	počet efipií obsahující 1 nebo 2 vajíčka	počet vajíček	průměrný počet vajíček na 1 neprázdné efipium
2009	100%	96	22 (23%)	74 (77%)	127	1,7
	75%	95	35 (37%)	60 (63%)	93	1,6
	50%	94	39 (41%)	55 (59%)	87	1,6
	25%	95	38 (40%)	57 (60%)	81	1,4
2010	0%-K	96	32 (33%)	64 (67%)	96	1,5
	0%-T	58	12 (21%)	46 (79%)	83	1,8
	100%	60	20 (33%)	40 (67%)	63	1,6

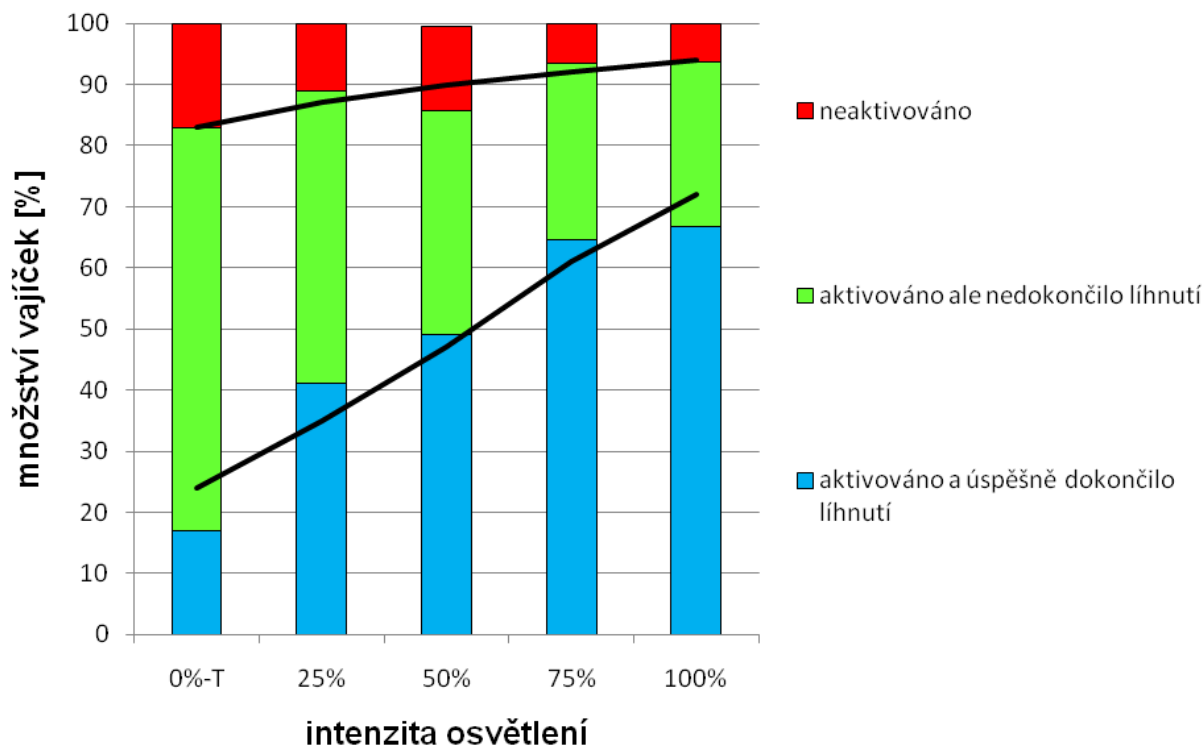
Tab. 2.: Souhrnná tabulka úspěšnosti líhnutí vajíček při různé intenzitě osvětlení.

experiment v roce	osvětlení	počet vajíček	aktivováno vajíček	dokončilo líhnutí	nedokončilo líhnutí	neaktivováno vajíček
2009	100%	127	119 (94%)	85 (67%)	34 (27%)	8 (6%)
	75%	93	87 (94%)	60 (65%)	27 (29%)	6 (6%)
	50%	87	75 (86%)	43 (49%)	32 (37%)	12 (14%)
	25%	81	72 (89%)	33 (41%)	39 (48%)	9 (11%)
2010	0%-K	96	88 (92%)	60 (63%)	28 (29%)	8 (8%)
	0%-T	83	69 (83%)	14 (17%)	55 (66%)	14 (17%)
	100%	63	48 (76%)	38 (60%)	10 (16%)	15 (24%)

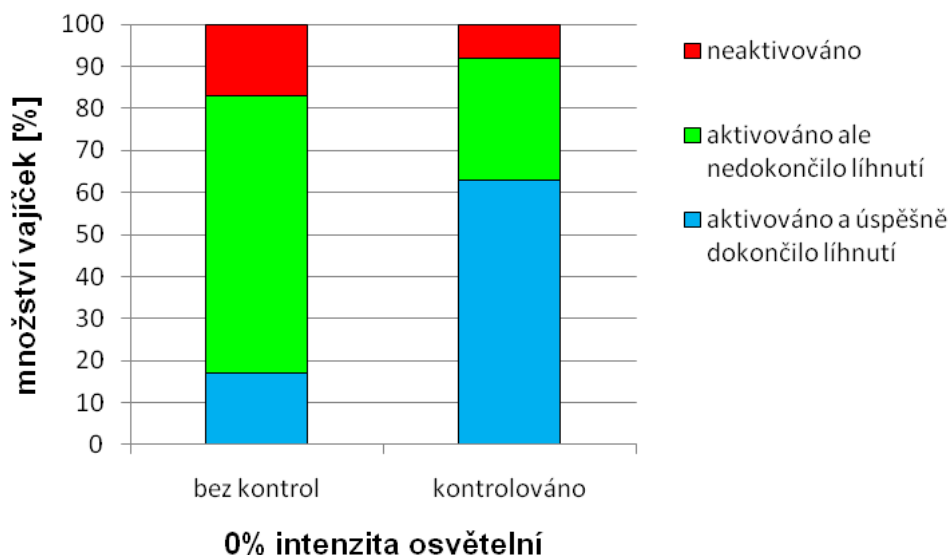
Při všech pěti použitých intenzitách osvětlení (100%, 75%, 50%, 25% v roce 2009 a 0%-K a v roce 2010) bylo množství aktivovaných vajíček, takových, která ukončila diapauzu a zahájila vývoj, velmi podobné, v rozmezí od 86 – 94 %. Zároveň při experimentu 0%-T, kdy vajíčka byla ponechána během celého průběhu pokusu ve tmě a kontrola vylíhnutých jedinců byla provedena až po skončení pokusu, tvoří množství aktivovaných vajíček 83 %. Protože v druhém roce byl sediment z lokality nově odebrán, bylo potřeba otestovat, zda je líhivost vajíček stejná jako v prvním roce pokusů. Opakovala jsem tedy pokus s 100% osvětlením vajíček. Líhivost byla sice o něco nižší než v prvním roce, avšak celkový počet aktivovaných vajíček byl stále velký (76 %, Tab. 2.).

Tyto vysoké podíly aktivovaných vajíček naznačují, že všechny varianty intenzity osvětlení měly v mém experimentu velmi podobný vliv na ukončení diapauzy. Při statistickém vyhodnocení dat pomocí logistické regrese jsem našla pouze malý trend závislosti počtu aktivovaných vajíček na osvětlení ($p = 0,007$). Zjistila jsem ovšem rozdílný vliv intenzity osvětlení na úspěšnost dokončení líhnutí. Během pokusů v roce 2009 dokončilo líhnutí do aktivního stádia více jedinců s větší intenzitou osvětlení. Při 100% osvětlení to bylo 67 %, při 75% osvětlení 65 % jedinců, při 50% osvětlení dokončilo vývoj 49 % a při 25% osvětlení pouze 40 % jedinců z aktivovaných vajíček. Vliv světla na úspěšné dokončení vývoje se potvrdil i na pokusu v roce 2010 s 0%-T osvětlením – tmy, kdy líhnutí vajíček nebylo průběžně kontrolováno a vajíčka tedy nebyla osvětlena žádným zdrojem světla po celou dobu pokusu. Při tomto pokusu úspěšně dokončilo vývoj pouze 19 % jedinců a 64 % aktivovaných vajíček se nedokázalo úspěšně vylíhnout až do aktivní

formy. Tuto závislost na osvětlení se podařilo prokázat zároveň statistickým vyhodnocením, které tento lineární trend potvrdilo ($p = 0,001$, obr. 16.). Tento trend se ovšem neprokázal při variantě pokusu s 0%-K osvětlením – tmy s průběžnou kontrolou, kde svůj vývoj plně dokončilo 62 % jedinců (obr. 17.), což je téměř stejný počet jako při pokusu s 100% intenzitou osvětlení v roce 2010 (61 % jedinců).



Obr. 16. Úspěšnost líhnutí vajíček při různé intenzitě osvětlení. Světle zelená znázorňuje podíl aktivovaných vajíček, která ukončila diapauzu a úspěšně dokončila líhnutí až do aktivního jedince. Modrá představuje podíl aktivovaných vajíček, která ale nedokončila své líhnutí. Červená je podíl neaktivovaných vajíček.

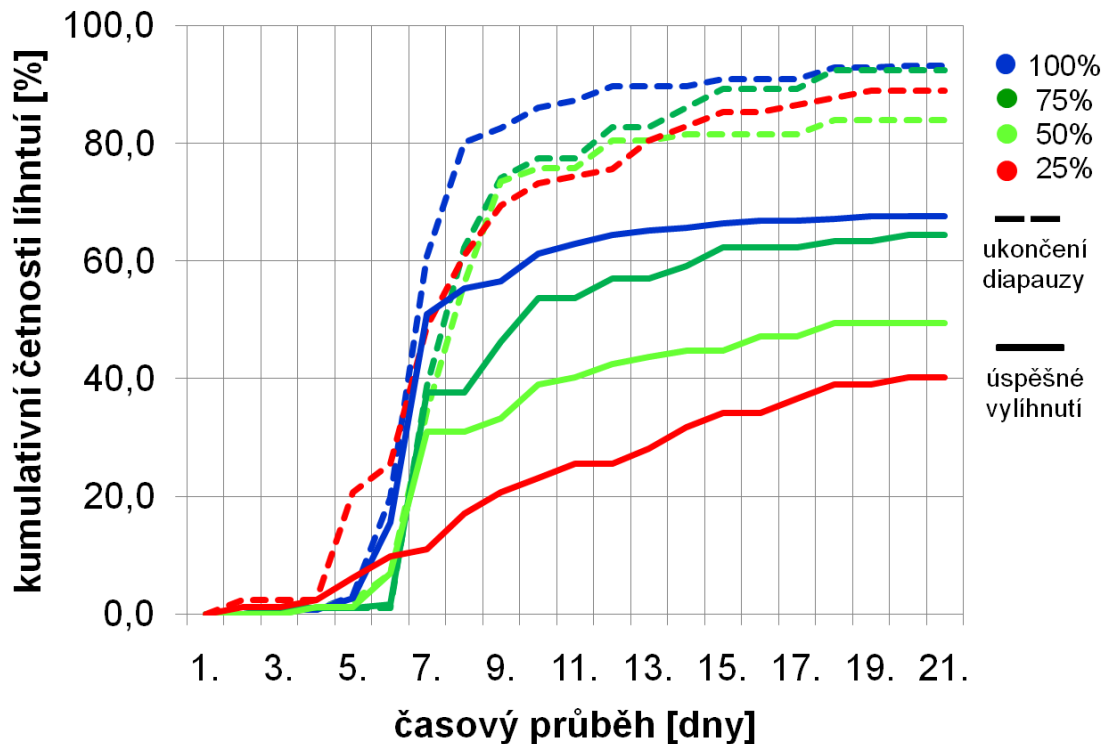


Obr. 17. Porovnání úspěšnosti líhnutí vajíček za tmy (0% osvětlení).

3.2 Porovnání časového průběhu líhnutí vajíček při různých intenzitách osvětlení

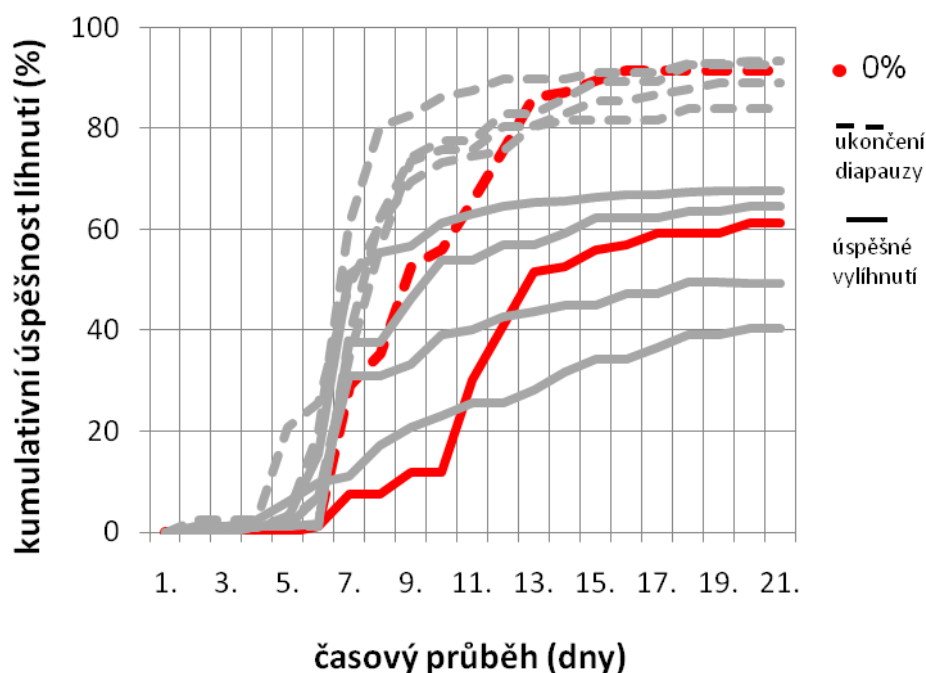
Časový průběh líhnutí vajíček při 4 různých intenzitách osvětlení v roce 2009 je znázorněn na obr. 18. pomocí grafů kumulativních četností. Podíl embryí, která ukončila diapauzu a vyvinula se minimálně do stavu pohledem rozpoznatelné neonaty (znázorněno tečkovanou čarou), má velmi podobný průběh při všech použitých intenzitách osvětlení. Průběh aktivace při 25%, 50% a 75% osvětlení se mezi sebou signifikantně neliší (Kruskal test, $p = 0,06$). Mírně se liší jen průběh líhnutí při 100% osvětlení. Mezi prvním a čtvrtým dnem inkubace jsem nepozorovala žádné líhnutí, naopak mezi pátým a osmým dnem pokusu začalo líhnutí u 60 – 80 % vajíček. Od devátého dne až do skončení pokusu 21. dne se aktivoval již jen malý podíl vajíček (mezi 15 – 30 %).

Vliv intenzity osvětlení ovlivnil časový průběh dokončení líhnutí aktivovaných vajíček do aktivně plavajícího jedince (znázorněno plnou čarou). Jejich průběh je signifikantně rozdílný (Kruskal test, $p < 0,0001$). Se snižující se intenzitou osvětlení můžeme pozorovat rozložení líhnutí do více dní. Nejrychlejší dokončení líhnutí měla vajíčka při 100% osvětlení (více než 40 % jedinců dokončilo vylíhnutí 7. den inkubace), naopak nejpomalejší dokončení líhnutí jsem pozorovala při 25% intenzitě osvětlení (kdy 7. den inkubace dokončilo líhnutí pouze 10 % jedinců).



Obr. 18. Časový průběh ukončení diapauzy (tečkovaná čára) a úspěšného dokončení líhnutí (plná čára) znázorněno pomocí kumulativních četností při 4 intenzitách osvětlení: 100%, 75%, 50%, 25%.

Časový průběh líhnutí vajíček za tmy v roce 2010 znázorňuje graf na obr. 19. Tato efípie byla denně kontrolována a tedy na krátký čas pravidelně osvětlena červeným světlem, byla tedy při kontrole vystavena stejným podmínkám jako ostatní paralelky inkubované za různé intenzity světla. Jak je zmíněno výše, i při experimentu líhnutí za tmy jsem pozorovala velký počet jedinců, kteří dokončili diapauzu, podobně jako při 100% a 75% variantě pokusu. Ovšem časový průběh aktivace vajíček za tmy se lišil od ostatních aktivací uskutečněných v roce 2009 ($p < 0,0001$). Můžeme vidět pozdější nástup aktivace i dokončení líhnutí a rozložení do více dní oproti ostatním variantám pokusu. Vrchol nejčastější aktivace vajíček (přes 80 %) proběh mezi 6. – 13. dnem inkubace. Ovšem líhnutí dokončilo do poloviny pokusu (10. dne) méně než 20 % embryí, od 11. do 13. dne okolo 25 % a od 14. dne do konce 21. dne zbylých 10 % jedinců.



Obr. 19. Časový průběh líhnutí za tmy (červená) v roce 2010 a ostatních intenzit osvětlení (šedá) v roce 2009.

Časový odstup mezi aktivací embrya do stavu neonaty uzavřené v embryonálním obalu a dokončením líhnutí (protržením této membrány a uvolněním aktivního jedince do vodního sloupce) byl mezi 1 – 12 dny. Některá aktivovaná embrya nedokončila líhnutí ani do konce pokusu. Maximální doba, kterou jsem pozorovala takováto embrya, byla 16 dní, ale je možné, že jsou embrya schopná vydržet v takovémto stavu i déle. O jejich životaschopnosti svědčí fakt, že po ukončení pokusu s paralelkou inkubace za tmy bez průběžné kontroly jsem po poměrně krátké době osvětlení aktivovaných embryí (cca 45 min.) pozorovala dokončení líhnutí u mnoha těchto jedinců.

3.3 Inkubace celého sedimentu

Abych zjistila vliv vyjmutí efipií ze sedimentu na jejich líhnutí, testovala jsem i líhnutí efipií spolu se sedimentem. Ačkoli podmínky při líhnutí v inkubátoru byly stejné jako při líhnutí efipií v titračních destičkách za 100% osvětlení, během třech týdnů experimentu jsem nepozorovala žádného vylíhnutého a aktivně plavajícího jedince. Po ukončení pokusu jsem objem inkubačního média prohlédla pod stereomikroskopem a přesvědčila se, že jsem ve vodním sloupci skutečně nepřehlídla žádnou vylíhnutou perloočku. Efipia ze sedimentu jsem vybrala a po otevření zpětně zjistila skutečný stav vajíček. Vzorek 1. - sediment průběžně míchaný obsahoval 160 efipií, vzorek 2. - sediment nemíchaný pouze 100 efipií. U vzorku 1. tvořila větší část efipia plná (96 efipií), po dvou vajíčkách, vizuálně zdravá. Dále jsem našla 8 efipií pouze s jedním vajíčkem uvnitř a 56 efipií prázdných. V sedimentu číslo 2. bylo 64 efipií po 2 vajíčkách uvnitř, 12 efipií po 1 vajíčku a 24 prázdných efipií. Tedy podíl efipií se 2 vajíčky, byl v obou paralelkách podobný, tvořil 60 % resp. 64 % z nalezených efipií (Tab. 3.).

Tab. 3. Efipia v pokusech s líhnutím v sedimentu

pokus	počet nalezených efipií	počet prázdných efipií	počet efipií se 2 vajíčky	počet efipií s 1 vajíčkem
vzorek 1. sediment pravidelně míchaný	160	56	96	8
vzorek 2. sediment nemíchaný	100	24	64	12

4. DISKUZE

Různorodost podnětů ovlivňujících líhnutí je obecně bráno jako adaptace na konkrétní habitat (Brendonck 1996). Podle fenologie vodních ploch (délka zaplavení, předvídatelnost aj.), které jsou dány morfometrií nádrže a klimatickými podmínkami, se podněty spouštějící líhnutí liší mezi rozdílnými habitaty, jakými jsou např. malé skalní tůňky ve srovnání s rozsáhlými vodními plochami (Brendonck 1996, Vandekerhoeve et al. 2005, Vanschoenwinkel et al. 2009). Svou roli hraje i komplexita dalších vlivů okolí, které mohou líhnutí zpomalit nebo naopak urychlit. V laboratorních podmínkách je náročné simulovat všechny vlivy prostředí, z kterého vajíčka pocházejí (Cáceres & Schwalbach 2001), a tak je v jednodušších a stabilních pokusných podmínkách líhnutí úspěšnější a více synchronizované (Bozelli et al. 2008). Vnímání podnětů se liší také mezi různými genotypy a fyziologickým stavem vajíček (např. De Meester & De Jager 1993a, Cáceres & Tessier 2003).

V mé diplomové práci jsem studovala vliv experimentálních podmínek na úspěšnost a časový průběh líhnutí diapauzujících stádií perloočky *Daphnia obtusa*, která obývá malé vodní habitaty. Zároveň jsem zjišťovala možnost projevu strategie bet-hedging. Podíl aktivovaných jedinců ukončujících diapauzu byl vysoký i za působení kratší fotoperiody a nižších intenzit osvětlení při inkubaci oproti podmínkám v práci J. Hotového (2005) a strategie bet-hedging na fyziologické úrovni tedy nebyla ani v mých experimentech pozorována. Jednou z možností je, že se u perloočky druhu *D. obtusa* tato strategie vůbec nevyvinula, protože ji ve svém prostředí nepotřebují (Hotový & Petrusek 2007).

Tůňe a louže, které tento druh obývá, se nevyskytují v otevřené krajině, ale spíše na zastíněných místech a možnost rychlého vyschnutí lokality je tedy méně pravděpodobná. Tůň, ze které byly odebrány vzorky sedimentu s diapauzujícími vajíčky pro mé experimenty, nevysychá příliš často (během čtyřletého sledování nevyschla vůbec, Juračka os.sd.) a pravděpodobnost dokončení životního cyklu je tedy vysoká. I když je možné, že tůň byla kolonizována z menšího habitatu typu dešťové louže, tyto efemerní vody z pohledu člověka nemusí být nutně efemerní povahy z pohledu perloočky, pokud v nich v mnoha případech úspěšně dokončí svůj cyklus (Hotový & Petrusek 2007). Protože líhnutí organismu odráží jeho adaptaci na konkrétní habitat, je možné, že i vysoká úspěšnost líhnutí je běžná na této lokalitě.

Jiným vysvětlením může být, že selekce pro bet-hedging není nutná díky působení podmínek prostředí. Tím, že jsou trvalá vajíčka v přirozeném prostředí vystavena heterogenním podmínkám, okolní vlivy zapříčiní, že se nikdy nedostanou vhodné stimuly líhnutí ke všem vajíčkům najednou (např. Bonner et al. 1997, Cáceres & Tessier 2003, Gyllström & Hanston 2003). Může to být dáno například překrytím vrstvou sedimentu (Cáceres & Tessier 2003) nebo výskytem vajíček mimo hladinu zaplavení (De Stasio 1989, Hairston et al. 1995) a určitý podíl vajíček se nevylíhne. V tomto případě by vajíčka mohla být „nastavena“ tak, aby se vyvíjela všechna, která se dostanou k vhodnému spouštěči (Hotový & Petrusek 2007).

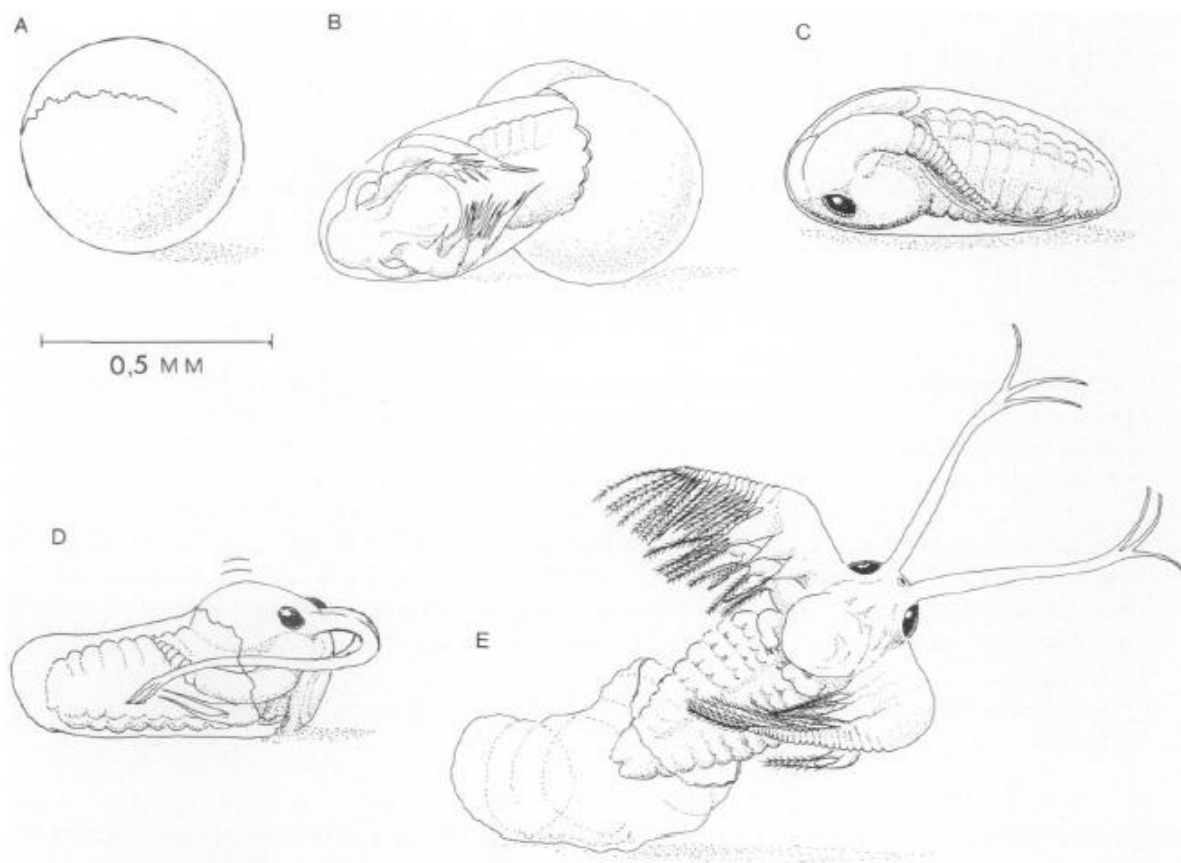
V mém experimentu neměla intenzita osvětlení vliv na množství vajíček, která ukončila diapauzu. Počet aktivovaných vajíček i jejich časový průběh byl podobný při všech čtyřech intenzitách osvětlení a dokonce i při líhnutí za tmy. Tento výsledek mě překvapil, protože v dosavadních studiích o líhnutí diapauzujících stádií perlooček a velkých lupenonožců autoři často uvádějí osvětlení jako jeden z nejdůležitějších stimulů k ukončení diapauzy (např. Pancella & Stross 1963, Schwartz & Hebert 1987, Alekseev & Starobogatov 1996, Pfender & Deng 1998, Cáceres & Swalbach 2001, Lass et al. 2005). Zároveň se pro skladování trvalých vajíček před experimentem líhnutí nejčastěji doporučuje kombinace tmy a nízké teploty, která by měla uchovat vajíčka nevyvíjená. Citlivost na světlo může být také mechanismem, který zajišťuje, aby se nevyvíjela vajíčka překrytá vrstvou sedimentu (Brendonck et al. 1998). Například téměř nulovou úspěšnost vajíček při líhnutí za tmy u perloočky *Daphnia pulex* uvádějí autoři Pancella a Stross (1963). Zároveň Brendonck et al. (1998) ve své práci nepozorovali žádné líhnutí za tmy u žábřonožky *Branchipodopsis wolfi*. Naopak líhnutí perloočky *Daphnia gr. obtusa* (zde se jedná o jiný druh než v mém případě, Petrusek os. sd.) i za tmy zmiňuje práce Schwartze & Heberta (1987). Zároveň však uvádí, že úspěšnost a časový průběh se lišil podle teploty a testovaného klonu perloočky.

Délka a intenzita osvětlení v těchto habitatech nemusí korelovat s novým a dostatečně dlouhým zaplavením, a proto je možné, že intenzita světla není tím hlavním stimulem pro aktivaci a „probuzení“ vajíček z diapauzy. Spouštěčem, který indikuje nové zaplavení nebo zvýšení stávající hladiny, by mohly být spíše chemické a fyzikální vlastnosti média. Stimuly jako vyšší koncentrace kyslíku, nízká koncentrace rozpuštěných látek a s ní související nižší osmotický tlak, spolu s vhodnou teplotou, která je druhově specifická, uvádí mnoho autorů jako nejdůležitější faktory pro líhnutí (Brown & Carpelan 1987, Brendonck et al. 1996,

Schrönbrunner & Eder 2006). Gastrula totiž komunikuje s vnějším světem pouze přes rozpuštěné látky v médiu (Beladjal et al. 2007b). Při vzrůstu koncentrace rozpuštěných látek, což je často spojeno s poklesem hladiny (Bonner et al. 1997) nebo přemnožením na lokalitě (Beladjal et al. 2007b), vajíčka často zastavují své líhnutí (Blaustein 1997). Vajíčka mohou také detekovat přítomnost predátorů díky látkám, které predátor vylučuje do vody (Blaustein 1997, Lass et al. 2005). Naopak, po rozředění média se líhne větší podíl vajíček, což je výhodné pro nové jedince, kteří tak mají větší šanci dokončit svůj cyklus. Důležitým faktorem ve vysychajících i nevysychajících habitatech je také dostatečná koncentrace kyslíku pro metabolické procesy (Moore 1963, Stross 1969, Fryer 1996, Merta 2003). Dá se říci, že zásadní stimul k ukončení diapauzy je takový, který na lokalitě není přítomen stále, ale který se vyskytuje jen při vhodných podmínkách. Například v rychle vysychajících habitatech je to zaplavení spolu s rozředěním média (Brendonck 1996), u jarních tůní po roztátí sněhu a ledu, má vliv pravděpodobně zvýšení teploty (Merta 2003), v severních zeměpisných šířkách má vliv hlavně fotoperioda, která nejlépe indikuje roční dobu (Vandekerkhove et al. 2005).

Během pokusů jsem pozorovala jev, kteří jiní autoři u perlooček buď při líhnutí nerozeznávají, nebo jej nepozorovali či nediskutovali. Z aktivovaných vajíček se vyvinuly vizuálně rozpoznatelné neonaty, které ale zůstaly v mnoha případech uzavřené v embryonálních obalech. Určitá část se z nich nevyklubala ven do konce pokusu a nedokončily tedy líhnutí do stádia aktivně plavajícího jedince. Navíc jsem pozorovala závislost tohoto jevu na intenzitě osvětlení. Podíl těchto jedinců se zvyšoval spolu s nižší intenzitou světla při inkubaci. Maximální dobu, během které zůstávaly neonaty jen v embryonálních obalech než dokončili líhnutí, byla 12 dní. Jedinci, kteří v tomto stádiu zůstali až do konce pokusu, tak vytrvali i 16 dní a je tedy možné, že jsou schopni takto přežít i déle.

Někteří autoři pozorovali podobnou fázi „předlíhnutí“ u trvalých vajíček žábřonožek (Mossin 1986, Zarattini & Mura 2007). Uvádějí, že vajíčka (resp. diapauzující cysty) mohou mít dvě fáze líhnutí, první, kdy larvální stádium uzavřené ve vnitřní elastické membráně vlivem rozpínání rozbije vnější neelastickou membránu, a druhou fázi, kdy larvální stádium rozbije i průhlednou blastodermální membránu a vylíhne se do vodního sloupce (obr. 20.).



Obr. 20. Líhnutí žábřonožky *Siphonophanes grubei* (převzato z Mossin 1987).

A, B - první fáze, kdy nauplius rozbíjí vnější obal, ale stále zůstává uzavřený v průhledné blastodermální membráně. *C* – dokončení embryonální fáze. *D, E* - nauplius rozbíjí vnitřní membránu a dokončuje líhnutí.

Navíc embrya mohou potřebovat k aktivaci a rozbití vnějšího obalu jiné stimuly, než poté, kdy nauplia ještě „čekají“ na příchod jiných podmínek pro úspěšné dokončení líhnutí a další vývoj (Stross 1966, Davison 1969). Ačkoli tato fáze nejspíše není vždy nutná, může ovlivňovat úspěšnost líhnutí (Arnott and Yan 2002). Mnoho autorů shodně uvádí, že na rozrušení membrány embryem je potřeba nízký osmotický tlak média (např. Brown & Carpelan 1987, Brendonck 1996, Zaratinni & Mura 2007). Nabízí se otázka, jaké jsou další vhodné podmínky pro úspěšné dokončení líhnutí. Může jimi být intenzita a délka osvětlení. V laboratorních pokusech bylo prokázáno, že embrya jsou citlivější na světlo po odstranění vnějšího ochranného obalu nebo po jeho vybělení (Pancella & Stross 1963, Davison 1969,

Van der Linden et al. 1987). Tmavě pigmentované efipium chrání vajíčka před vysokými dávkami záření, hlavně v oblasti krátkých vlnových délek, ale zbarvení efipia není vždy stejné. Je ovlivněno matkou, která efipium vytváří, čímž nepřímo ovlivňuje citlivost diapauzujících embryí na světlo (Shan 1970 podle Van der Linden et al. 1987). Také svým fyziologickým stavem může matka ovlivnit citlivost samotných embryí na vnější podněty (Pfender & Deng 1998, Cáceres & Tessier 2003).

Vajíčka se tedy pravděpodobně nejprve aktivovala jiným stimulem než intenzitou osvětlení, nejspíše změnou osmotického tlaku média při vyplavování ze sedimentu nebo následné inkubaci a zvýšenou koncentrací kyslíku oproti tomu, když byla vajíčka uložena v sedimentu. Po aktivaci, kdy neonata vlivem napínání vnitřní elastické membrány rozbila vnější efipiální obal, byla následně již ovlivněna množstvím světla a pokud bylo dostatečné, dokončila své líhnutí. Závislost na intenzitě osvětlení se tedy projevila na množství jedinců, kteří opustili embryonální obal. Odchytku od tohoto trendu jsem pozorovala pouze při paralele líhnutí za tmy s denní kontrolou vylíhnutých jedinců. V tomto případě plně dokončila líhnutí velká část jedinců (68 %) přes 0% osvětlení při inkubaci. V druhé paralele líhnutí za tmy, která však nebyla průběžně kontrolována a vajíčka byla tedy osvětlena pouze na začátku pokusu a poté až po jeho skončení, se trend závislosti plného vylíhnutí na osvětlení potvrdil. V tomto případě se plně vylíhnul nejmenší počet jedinců ze všech testovaných paralelek (pouze 17 %), ačkoli diapauzu ukončilo 83 % vajíček.

Je možné, že pravidelné osvětlení efipií při denní kontrole (i když na krátkou dobu a pouze dlouhými vlnovými délkami) mělo vliv na líhnutí. Horiguchi et al. (2009) zjistili, že i pouze jednodinový stimul bílého světla je dostatečný k úspěšnému vylíhnutí velkého množství trvalých stádií, která byla předtím ve tmě. Abych neovlivnila vajíčka a možnost testování intenzity světla na jejich líhnutí, před inkubací i při denní kontrole nově vylíhnutých jedinců jsem pracovala pouze se slabým osvětlením v červené oblasti spektra, konkrétně od 580 nm do 860 nm, u něž jsme předpokládali nejmenší případný vliv na biologické procesy. Van der Linden et al. (1987) uvádějí, že červené spektrum osvětlení při zpracování trvalých vajíček žábronožek nemělo vliv na líhnutí. Také Davison (1969) zmiňuje ve své práci, že červené světlo neovlivnilo líhnutí vajíček rodu *Daphnia*. Každá dílčí část nalezených a extrahovaných efipií ze sedimentu (okolo 15 efipií) a jednotlivé paralelky při kontrole, byly vystaveny tomuto osvětlení a pokojové teplotě poměrně krátkou dobu (maximálně okolo 30 minut). I kdyby pravidelná kontrola efipií v nějaké míře ovlivnila líhnutí, byla všechna efipia

vystavena stejným podmínkám. Je ale možné, že dlouhodobý pobyt vajíček ve tmě, zvýšil citlivost již aktivovaných vajíček na světlo, což ve své práci diskutuje i Davison (1969). Při skončení pokusu líhnutí za tmy bez průběžné kontroly jsem sama pozorovala proces dokončení líhnutí, kdy neonata opouští embryonální obal. K dokončení líhnutí bylo pro některé aktivované jedince z této paralelky dostatečným stimulem krátkodobé působení bílého světla (zhruba 45 min).

Nabízí se otázka, jakou výhodu tento stav jedinci přináší. Pokud okolní podmínky naznačují, že vylíhnutím by perloočka pravděpodobně zahynula, je lepší počkat. Také to může být výhodné pro rychlejší vylíhnutí, když se vyskytne kombinace všech podmínek vhodných pro další růst a reprodukci. Otázkou zůstává, zda je toto chování dostatečně adaptivní a není pro jedince spíše riskantní, když již není chráněn vnějším obalem před možnými škodlivými vlivy a zároveň tak může snižovat svoji úspěšnost v konkurenci s ostatními klony.

Vliv intenzity osvětlení se projevil i na časovém průběhu opouštění embryonálních obalů, kdy se snižující se intenzitou osvětlení bylo úspěšné dokončení líhnutí rozloženo do více dnů. Možným vysvětlením je, že pokud je intenzita dostatečná, není další důvod proč nedokončit líhnutí, když zůstat v „předlíhnutém“ stavu může být riskantní.

Mnoho autorů uvádí, že extrakce trvalých vajíček ze sedimentu významně ovlivňuje úspěšnost líhnutí. V laboratorních podmínkách tak dochází k lepšímu přístupu vajíček k faktorům ovlivňující ukončení diapauzy, které by k nim v přirozených podmínkách nedostala tak jednoduše (např. Cáceres & Schwalbach 2001). V mém experimentu s líhnutím celého sedimentu se nepodařilo vylíhnout ani jediné takové diapauzující vajíčko, i když podmínky inkubace (osvětlení, fotoperioda, teplota a inkubační médium) byly stejné jako pro efípie vyjmutá před experimentem ze sedimentu. Ani jedna z inkubačních podmínek v pokusu nebyla tedy dostatečným faktorem k ukončení diapauzy vajíček uložených v sedimentu. Zdá se, že je tedy potřeba ještě nějakého jiného spouštěče líhnutí. Líhnutí se nezdařilo ani za pravidelného promíchávání sedimentu, které by mohlo zvýšit pravděpodobnost přístupu stimulů k vajíčkům (např. Cáceres & Hairston 1998, Cáceres & Tessier 2003), což prokazují některé práce pozitivním vlivem disturbance sedimentu na líhnutí (Hairston & Kearns 2002, Viitasalo et al. 2007, Gyllström et al. 2008).

Z výsledků mé práce vyplývá několik dalších otázek a směrů, kam se ubírat ve studiu líhnutí diapauzujících stádií perlooček z dočasných vodních habitatů. Především jde o testování hypotézy, zda spolu nutně souvisí ukončení diapauzy a líhnutí efiipií. Je možné, že jsou to dva oddělené stavy, které vyžadují i rozdílné spouštěče. Dále by bylo zajímavé objasnit, jak dlouho může neonata uzavřená pouze v embryonálním obalu přežít a za jakých podmínek. Zda se nachází ve stavu metabolického klidu nebo zda projevuje nějakou aktivitu. A také jaké výhody z tohoto stavu pro jedince plynou. Dalším výzkum v této oblasti by mohl přispět k lepšímu porozumění mechanismů diapauzy u perlooček z dočasných vodních ploch a jejich ekologické a evoluční dynamiky populací.

5. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adamowicz, S., J., Petrussek, A., Colbourne, J., K., Hebert, P., D., N. & Jonathan, D., S., W. (2009): The scale of divergence: A phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **50**: 423–436.
- Alekseev, V., R., De Stasio, B., T. & Gilbert, J., J. (2007): Diapause in Aquatic Invertebrates. Theory and Human Use. *Monographiae Biologicae* vol. 84, Springer 2007
- Alekseev, V., R. & Starobogatov Y., I. (1996): Types of diapause in Crustacea: Definitions, distribution, evolution. *Hydrobiologia* **320**: 15-26.
- Arnott, S., E. & Yan, N., D. (2002): The influence of drought and re-acidification on zooplankton emergence from resting stages. *Ecological Applications* **20**(1): 138-153.
- Beladjal, L., Dierckens, K. & Mertens, J. (2007a): Dispersal of fairy shrimp *Chirocephalus diaphanus* (Branchiopoda: Anostraca) by the Trout (*Salmo trutta*). *Journal of Crustacean biology* **27**(1): 71–73.
- Beladjal, L., Dierckens, K. & Mertens, J. (2007b): Pheromones inhibit the hatching of diapausing Anostraca (Crustacea: Branchiopoda). *Animal Biology* **57**(1): 1-9.
- Blaustein, L. (1997): Non-consumptive effects of larval Salamandra on crustacean prey: can eggs detect predators? *Oecologia* **110**: 212-217.
- Blaustein, L., Garb, J., E., Shebitz, D. & Nevo, E. (1999): Microclimate, developmental plasticity and community structure in artificial temporary pools. *Hydrobiologia* **392**: 187–196.
- Blaustein, L. & Schwartz, S., S. (2001): Why study ecology in temporary pools? *Israel Journal of Zoology* **47**: 303-312.
- Bonner, L., A., Diehl, W., J. & Altig, R. (1997): Physical, chemical and biological dynamics of five temporary dystrophic forest pools in Central Mississippi. *Hydrobiologia* **353**: 77-89.
- Bozelli, R., L., Tonsi, M., Sandrini, F. & Manca, M. (2008): A Big Bang or small bangs? Effects of biotic environment on hatching. *Journal of Limnology* **67**(2): 100-106.
- Brendonck, L. (1996): Diapause, quiescence, hatching requirements: What we can learn from large freshwater branchiopods (Crustacea:Branchiopoda:Anostraca, Notostraca, Conchostraca). *Hydrobiologia* **320**: 85-97.
- Brendonck, L. & De Meester, L. (2003): Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia* **491**: 65-84.
- Brendonck, L. & Riddoch, B., J. (1999): Wind-borne short-range egg dispersal in anostracans (Crustacea:Branchiopoda). *Zoological Journal of the Linnean Society* **67**: 87–95.
- Brendonck, L. & Riddoch, B., J. (2000): Egg bank dynamics in anostracan desert rock pool populations (Crustacea: Branchiopoda). *Archiv Für Hydrobiologie* **148**: 71-84.
- Brendonck, L., Centeno, M., D. & Persoone, G. (1996): The influence of processing and temperature conditions on hatching of resting eggs of *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea:Branchiopoda: Anostraca). *Hydrobiologia* **320**: 99-105.
- Brendonck, L., Riddoch, B., van de Weghe, V. & Van Dooren, T. (1998): The maintenance of egg banks in very short-lived pools – a case study with anostracans (Branchiopoda). *Archiv für Hydrobiologie* **52**: 141–161.
- Brown, L., R. & Cappelán, L., H. (1971): Egg Hatching and Life History of a Fairy Shrimp Branchinecta Mackini Dexter (Crustacea: Anostraca) in a Mohave Desert Playa (Rabbit Dry Lake). *Ecology* **52**: 41-54.
- Cáceres, C., E. (1997): Dormancy in invertebrates. *Invertebrate Biology*. **116**: 371–383.

- Cáceres, C., E. & Hairston, N., G. (1998): Benthic-pelagic coupling in planktonic crustaceans: the role of the benthos. *Archiv für Hydrobiologie* **52**: 163–174.
- Cáceres, C., E. & Schwalbach, M., S. (2001): How well do laboratory experiments explain field patterns of zooplankton emergence? *Freshwater Biology* **46**: 1179-1189.
- Cáceres, C., E. & Soluk, D., A. (2002): Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonization by aquatic invertebrates. *Oecologia* **131**: 402–408.
- Cáceres, C., E. & Tessier, A., J. (2003): How long to rest: The ecology of optimal dormancy and environmental constraint. *Ecology* **84**: 1189-1198.
- Cérégnio, R., Biggs, J., Oertli, B. & Declerck, S. (2008): The ecology of European ponds: defining the characteristics of a neglected freshwater habitat. *Hydrobiologia* **597**: 1-6.
- Cohen, D. (1968): A general model of optimal reproduction in a randomly varying environment. *Ecology* **49**: 219-228.
- Davison, J. (1969): Activation of ephippial eggs of *Daphnia pulex*. *Journal of General Physiology* **53**: 565-575.
- De Meester, L. & De Jager, H. (1993a): Hatching of *Daphnia* sexual eggs.1. Intraspecific differences in the hatching responses of *Daphnia magna* eggs. *Freshwater Biology* **30**: 219-226.
- De Meester, L. & De Jager, H. (1993b): Hatching of *Daphnia* sexual eggs. 2. The effect of age and 2nd stimulus. *Freshwater Biology* **30**: 227-233.
- De Meester, L., Cousyn, C. & Vanoverbeke, J. (1998): Chemical interactions, maternal effects and the hatching of *Daphnia* diapausing eggs. *Archiv Fur Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology* **52**: 263-272.
- De Meester, L., Declerck, S., Stoks, R., Louette, G., Van de Meutter, F., De Bie, T., Michels, E. & Brendock, L. (2005): Ponds and pools as model systems in conservation biology, ecology and evolutionary biology. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* **15**: 715–725.
- De Stacio, B., T. (1989): Seed bank of a freshwater crustacean - copepodology for the plant ecologist. *Ecology* **70**:1377-1389.
- De Stacio, B., T. (1990): The role of dormancy and emergence patterns in the dynamics of a freshwater zooplankton community. *Limnology and Oceanography* **35**(5): 1079-1090.
- dos Santos, M., M. & Persoone, G. (1998): Hatching of *Daphnia magna* resting eggs: the effect of storage duration and storage temperature. *Archiv Fur Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology* **52**: 253-262.
- Dumont, H., J. & Negrea, S., V. (2002): Introduction to the class Branchiopoda. Backhuys Publishers, Leiden, 2002
- Figuerola, J. & Green, A., J. (2002): Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology* **47**: 483–494.
- Figuerola, J., Green, A., J. & Santamaría, L. (2003): Passive internal transport of aquatic organisms by waterfowl in Doñana, south-west Spain. *Global Ecology & Biogeography* **12**: 427–436.
- Fryer, G. (1996): Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia* **320**: 1-14.
- Gyllström, M. & Hansson, L.-A. (2004): Dormancy in freshwater zooplankton: induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences* **66**: 274–295.
- Gyllström, M., Lakowitz, T., Brönmark, Ch. & Hansson, L.-A. (2008): Bioturbation as driver of zooplankton recruitment, biodiversity and community composition in aquatic ecosystems. *Ecosystems* **11**: 1120–1132.
- Hairston, N., G. (1996): Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography* **41**: 1087-1092.
- Hairston, N., G. & Kearns, C., M. (2002): Temporal dispersal: Ecological and evolutionary aspects of zooplankton egg banks and the role of sediment mixing. *Integrative and Comparative Biology* **42**(3): 481-491.

- Hairston, N., G., Vanbrunt, R., A., Kearns, C., M. & Engstrom, D., R. (1995): Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology* **76**: 1706-1711.
- Hairston, N., G., Hansen, A., M. & Schaffner, W., R. (2000): The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage. *Freshwater Biology* **45**: 133-145.
- Hancock, M., A. & Timms, B., V. (2002): Ecology of four turbid clay pans during a filling-drying cycle in the Paroo, semi-arid Australia. *Hydrobiologia* **479**: 95–107.
- Horiguchi, T., Ito, Ch. & Numata, H. (2009): Regulation of embryogenesis by light and its ecological significance in the Asian tadpole shrimp *Triops granarius*. *Zoological Science* **26**: 483–490.
- Hotový, J. (2005): Útěková reakce a diapauza: Dva faktory ovlivňující úspěšnost perloočky *Daphnia obtusa* v efemerních vodách. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze
- Hotový, J. & Petrusek, A. (2007): Resting stage density and hatching of two cladoceran species from small ephemeral waters. *Fundamental and Applied Limnology Archiv für Hydrobiologie* **169**: 177–187.
- Hulsmans, A., Moreau, K., De Meester, L., Riddoch, B., J. & Brendonck, L. (2007) : Direct and indirect measures of dispersal in the fairy shrimp Branchiopodopsis wolfi indicate a small-scale isolation-by-distance pattern. *Limnology and Oceanography* **52**(2): 676–684.
- Kashiyama, K., Ito, Ch., Numata, H. & Goto, S., G. (2010): Spectral sensitivity of light-induced hatching and expression of genes mediating photoreception in eggs of the Asian tadpole shrimp *Triops granarius*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **156**: 416–421.
- Lahr, J., Diallo, A., O., Ndour, K., B. , Badji, A. & Diouf, P., S. (1999): Phenology of invertebrates living in a sahelian temporary pond. *Hydrobiologia* **405**: 189-205.
- Lass, S., Vos, M., Wolinska, J. & Spaak, P. (2005): Hatching with the enemy: *Daphnia* diapausing eggs hatch in the presence of fish kairomones. *Chemoecology* **15**: 7-12.
- Menu, F., Roebuck, J-P. & Viala, M. (2000): Bet-Hedging diapause strategies in stochastic environments. *The American Naturalist* **155**(6): 724-734.
- Merta, L. (2003): Prehatching success of *Eubranchipus (Siphonophanes) grubii* (Crustacea, Anostraca) under the influence of some environmental factors. *Biologia* **58**: 919-924.
- Moore, W., G. (1963): Some interspecies relationships in Anostraca populations of certain Louisiana ponds. *Ecology* **44**: 131-139.
- Moritz, Ch. (1987): A note on the hatching and viability of *Ceriodaphnia ehippia* collected from lake sediment. *Hydrobiologia* **145**: 309- 314.
- Mossin, J. (1986): Physiological factors inducing embryonic development and spring hatch of European fairy shrimp *Siphonophanes grubei* (Dybowski) (Crustacea:Anostraca). *Journal of Crustacean Biology* **6**: 693-704.
- Mura, G., Fancello, G. & Di Giuseppe, S. (2003): Adaptive strategies in populations of *Chirocephalus diaphanus* (Crustacea, Anostraca) from temporary waters in the Reatine Apennines (Central Italy). *Journal of Limnology* **62**(1): 35-40.
- Pancella, J., R. & Stross, R., G. (1963): Light induced hatching of *Daphnia* resting eggs. *Chesapeake Science* **4**: 404–425.
- Pfrender, M., E. & Deng H., W. (1998): Environmental and genetic control of diapause termination in *Daphnia*, *Archiv für Hydrobiologie* **52**: 237–251.
- Philippi, T. (1993a): Bet-hedging germination of desert annuals - beyond the 1st year. *American Naturalist* **142**: 474-487.
- Philippi, T. (1993b): Bet-hedging germination of desert annuals - variation among populations and maternal effects in *Lepidium lasiocarpum*. *American Naturalist* **142**: 488-507.
- Philippi, T., E., Simovich, M., A., Bauder, E., T. & Moorad, J., A. (2001): Habitat ephemerality and hatching fractions of a diapausing anostracan (Crustacea: Branchiopoda). *Israel Journal Of Zoology* **47**: 387-395.

- Rulík, M. (1999): Možnosti ochrany kriticky ohrožených druhů korýšů ve vazbě na ochranu a revitalizaci říčních systémů a přírodě blízké způsoby protipovodňové ochrany v CHKO Litovelské Pomoraví. Studie pro MŽ ČR
- Saiah, H. & Perrin, N. (1990): Autumnal vs spring hatching in the fairy shrimp *Siphonophanes grubii* (Dybowski) (Crustacea, Anostraca): diversified bet-hedging strategy? *Funct. Ecol* **4**: 769-775.
- Schönbrunner, I., M. & Eder, E. (2006): pH-related hatching success of *Triops cancriformis* (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Hydrobiologia* **563**: 515-520.
- Schwartz, S., S. & Hebert, P., D., N. (1987): Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshwater Biology* **17**: 373-379.
- Simovich, M., A. & Hathaway, S., A. (1997): Diversified bet-hedging as a reproductive strategy of some ephemeral pool anostracans (Branchiopoda). *Journal Of Crustacean Biology* **17**: 38-44.
- Sorgeloos, P. (1973): First report on the triggering effect of light on the hatching mechanism of *Artemia salina* dry cysts. *Marine Biology* **22**: 75-76.
- Spencer, M., Colegrave, N. & Schwartz, S., S. (2001): Hatching fraction and timing of resting stage production in seasonal environments: effects of density dependence and uncertain season length. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 357-367.
- Stross, R., G. (1966): Light and temperature requirement for diapause development and release in *Daphnia*. *Ecology* **47**: 368-374.
- Stross, R., G. (1969): Photoperiod control of diapause in *Daphnia*. III. Two stimulus control of long-day, short-day induction. *Biological Bulletin*. **137**: 359-374.
- Šrámek-Hušek, R., Straškraba, M. & Brtek, J. (1962): Lupenonožci – Branchiopoda. Fauna ČSSR (16). Nakladatelství ČSAV, Praha
- Therriault, T., W. & Kolasa, J. (2001): Desiccation frequency reduces species diversity and predictability of community structure in coastal rock pools. *Israel Journal Of Zoology*. **47**:477-489.
- Thiéry, A. (1997): Horizontal distribution and abundance of cysts of several large branchiopods in temporary pool and ditch sediments. *Hydrobiologia*. **359**: 177-189.
- Van der Linden, A., Blust, R., Cuypers, K., Thoeve, Ch. & Bernaerts, F. (1987): An Action spectrum of light-induced hatching of *Artemia* cysts. *Physiology, Biochemistry, Molecular biology* **2**: 562-568.
- Van Dooren, T. & Brendonck, L. (1998): The hatching pattern of *Branchipodopsis wolffi* (Crustacea: Anostraca): phenotypic plasticity, additive genetic and maternal effects. *Archiv Fur Hydrobiologie Special Issues Advances in Limnology*. **52**: 219-227.
- Vandekerckhove, J., Declerck, S., Brendonck, L., Conde-Porcuna, J., M., Jeppesen, E. & De Meester, L. (2005): Hatching of cladoceran resting eggs: temperature and photoperiod. *Freshwater Biology*. **50**: 96-104.
- Vanschoenwinkel, B., Waterkeyn, A., Vandecaetsbeek, T., Pineau, O., Grillas, P. & Brendonck, L. (2008a): Dispersal of freshwater invertebrates by large terrestrial mammals: a case study with wild boar (*Sus scrofa*) in Mediterranean wetlands. *Freshwater Biology* **53**: 2264-2273.
- Vanschoenwinkel, B., Gielen, S., Seaman, M. & Brendonck, L. (2008b): Any way the wind blows - frequent wind dispersal drives species sorting in ephemeral aquatic communities. *Oikos* **117**: 125-134.
- Vanschoenwinkel, B. Gielen, S., Seaman, M. & Brendonck, L. (2009): Wind mediated dispersal of freshwater invertebrates in a rock pool metacommunity: differences in dispersal capacities and modes. *Hydrobiologia* **635**: 363-372.
- Viitasalo, S., Katajisto, T. & Viitasalo, M. (2007): Bioturbation changes the patterns of benthic emergence in zooplankton. *Limnology and Oceanography* **52**(6): 2325-2339.

- Waterkeyn, A., Vanschoenwinkel, B., Elsen, S., Anton-Pardo, M., Grillas, P. & Brendonck, L. (2010): Unintentional dispersal of aquatic invertebrates via footwear and motor vehicles in a Mediterranean wetland area. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* **20**: 580–587.
- Zarattini, P. (2004): Intraspecific differences in hatching phenology of fairy shrimp *Chirocephalus diaphanus* Prévost, 1803 (Crustacea, Anostraca) in relation to habitat characteristics. *Journal of Limnology* **63** (1) (Suppl.): 85-89.
- Zarattini, P. & Mura, G. (2007): Co-occurrence of free-swimming and quiescent nauplii in a spring hatching of two *Chirocephalus diaphanus* Prévost, 1803 (Anostraca) populations from mountain pasture pools. *Crustaceana* **80** (6): 707-715.

nepřímá citace:

- Shan, R., K. (1970): Influence of light on hatching of resting eggs of Chydorids (Cladocera). *Int. Rev. Gesam. Hydrobiol.* **55**(2): 295-302.