

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Pavla Krylová, DiS.

Interakce mezi hostitelskou perloočkou *Daphnia pulex* a parazitickými mikrosporidii v jednoduchém prostředí lesní tůň

Interactions between microsporidial parasites and the host cladoceran *Daphnia pulex* in a simple environment of a forest pond

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Adam Petrusek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Jan Juračka, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného osvědčení.

V Praze, 15. 8. 2017

Podpis:

Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat svému školiteli Adamovi Petruskovi za jeho vedení mé diplomové práce, podnětné připomínky a nové znalosti, bez kterých by tato práce nedospěla (snad) k úspěšnému konci.

Dále děkuji Petrovi J. Juračkovi za odvozy do terénu, úvod do problematiky, za veselé konverzace a za krásné fotografie.

Obrovský dík patří prof. Jiřímu Vávrovi a dr. Mirku Hylišovi za jejich ochotu a rady při řešení mých mikrosporidiálních otázek, v neposlední řadě jim děkuji za jejich entusiasmus.

Děkuji lidem z katedry a laborky, a že vás je! Za vaše vedení, kurzy, rady, pomoc, podporu, zábavu: Jasně Vukić, Veronice Sacherové, Martinovi Černému, Jane Vokurkové st., Nurii V., Janě H., Terce R., Ondrovi K., Denisovi C., Pětě V., Monice K., Matějovi P. a mnohým dalším.

Děkuji Silvě Šírově, která se mě za jedno odpoledne snažila zasvětit do interpretací výsledků statistiky.

Děkuji skladateli Milanovi Svobodovi a saxofonistovi Kubu Doležalovi za to, jakými jsou (nejen) hudebními osobnostmi a za jejich nasměrování, kam by se mohla má profesionální dráha ubírat.

Největší poděkování si zaslouží má milující rodina, nejzlatější muž Standa a drahocenní kamarádi, kteří mě bezmezně podporují, pomáhají mi, starají se o mě nejen v časech absolvování mých studií, ale také jim jsem vděčná za společně strávené chvíle plné smíchu, jídla, hudby a dalších radovánek.

ABSTRAKT

Mezi nejběžnější endoparazity, kteří napadají drobné korýše perloočky *Daphnia pulex*, patří mikrosporidie. Tito intracelulární paraziti zdánlivě vypadají jako jednoduché jednobuněčné organismy, ale jejich stavba buňky a životní cyklus dokazují opak. Mikrosporidie jsou druhově specifické, přestože napadají většinu organismů zvířecí říše, ještě nejsou dostatečně probádané.

Tato práce nepřímo navazuje na studie perlooček druhového komplexu *Daphnia longispina* a mikrosporidií *Berwaldia schaefernai* z přehradních nádrží.

Cílem bylo prozkoumat blíže mikrosporidiální infekci na hostitelských perloočkách *Daphnia pulex* v jednoduchém prostředí lesní tůně, což zahrnovalo sledování časové dynamiky populace perlooček a identifikace nákazy způsobené mikrosporidii *Berwaldia singularis* a mikrosporidií, pracovně označené jako „HVV“. Laboratorní práce zahrnovala determinaci zooplanktonu a parazitů a určení prevalence, laboratorní pokusy s přenosy mikrosporidiální nákazy mezi zdravou a nakaženou kulturou perlooček, nebo pomocí izolovaných spor.

Životní cyklus mikrosporidii a hypotézu o sekundárním vektorovi pomohlo přiblížit otestování vodních bezobratlých, zejména larev pakomárů a komárů, na přítomnost DNA patogenu pomocí specifické amplifikace DNA mikrosporidií.

Klíčová slova: *Daphnia pulex*, mikrosporidie, *Berwaldia schaefernai*, *Berwaldia singularis*, DNA amplifikace, hostitel, parazit

ABSTRACT

Among the most common endoparasites who infected small crustacean *Daphnia pulex* include microsporidia. These intracellular parasites appear to look like a simple single-celled organisms, but their cell structure and lifecycle prove the opposite. Microsporidia are species-specific. Although they infected most organisms of the animal kingdom, they are not yet sufficiently understood.

This theses is indirectly followed up to the studies of waterflea *Daphnia longispina* and microsporidia *Berwaldia schaefernai* from the dam reservoirs

The aim was to analyze closer microsporidian infection on host *Daphnia pulex* in a forest pool with simple environment, which included monitoring time dynamics of *Daphnia* population and identification infection caused by microsporidia *Berwaldia singularis* and yet unknown microsporidia labor-marked "HVH".

Laboratory work included determination of zooplankton and parasites, calculation of prevalence, laboratory experiments with transmission of microsporidian infection between healthy and infected flea culture or by isolated spores.

Genetic analysis of aquatic invertebrates from the forest pool, especially larvae of mite and mosquitos, helped make closer microsporidian life cycle and hypothesis about secondary hosts, for the presence of pathogen DNA using specific DNA amplification of microsporidia.

Key words: *Daphnia pulex*, microsporidia, *Berwaldia schaefernai*, *Berwaldia singularis*, DNA amplification, host, parasite

OBSAH

OBSAH	10
ÚVOD.....	12
CÍLE PRÁCE.....	15
1. PERLOOČKY R. <i>DAPHNIA</i>	16
2. MIKROSPORIDIÁLNÍ PARAZITI PERLOOČEK RODU <i>DAPHNIA</i>	17
2.1. MIKROSPORIDIE	18
2.2. ZPŮSOBY PŘENOSU INFEKCE.....	20
2.3. PŘÍKLADY MODELOVÝCH SYSTÉMŮ MIKROSPORIDIÍ PARAZITUJÍCÍCH NA ZÁSTUPCÍCH R. <i>DAPHNIA</i>	21
2.4. MIKROSPORIDIE PARAZITUJÍCÍ NA PERLOOČCE <i>D. PULEX</i> NA ZKOUMANÉ LOKALITĚ	23
METODIKA.....	25
1. STUDOVANÁ LOKALITA	25
2. TERÉNNÍ ODBĚRY VZORKŮ	25
3. LABORATORNÍ ČÁST.....	27
3.1. DETERMINACE ZOOPLANKTONU A MIKROSPORIDIÍ	28
3. 2. POČÍTÁNÍ DENZITY.....	30
3. 3. STATISTICKÁ ANALÝZA DAT Z TERÉNNÍCH VZORKŮ	30
3. 4. LABORATORNÍ POKUSY S PŘENOSEM INFEKCE	31
3. 5. AMPLIFIKACE MIKROSPORIDIÁLNÍ DNA POMOCÍ PCR.....	32
3. 5. 1. Izolace DNA.....	33
3. 5. 2. PCR.....	34
3. 5. 3. Purifikace PCR produktu	36
3. 5. 4. Analýza sekvenačních dat	36

VÝSLEDKY	38
DISKUZE	47
ZÁVĚR	53
LITERATURA.....	54
PŘÍLOHY	59

ÚVOD

Perloočky, mezi které patří filtrující herbivorní druhy i predátoři, tvoří významnou složku sladkovodních ekosystémů. Převážná část jejich zástupců je součástí sladkovodního zooplanktonu, ale existují druhy, které žijí v extrémnějších habitatech od brakických vod až po slaniska, stejně tak ne všechny perloočky jsou zooplanktonní – některé jsou pleustonní, bentické, jeskynní atp. Perloočky hrají klíčovou roli v trofických řetězcích a díky mnoha vlastnostem jsou vítané i v laboratořích jako modelový organismus (Dodson et al. 1995, Lampert 2006, Hudec 2010). Nejstudovanější skupinou perlooček je rod *Daphnia*.

Perloočky r. *Daphnia* se se svými mikroparazity staly významnými modelovými systémy pro výzkum hostitelско-parazitických vztahů a genetických interakcí v evoluční ekologii, nebo infekčních chorob v epidemiologii (Colbourne et al. 1997, Carius et al. 2001, Ebert 2005, Decaestecker et al. 2007, Seda et al. 2011). Mezi mikroparazity perlooček patří zástupci různých taxonomických skupin, např. bakterie, kvasinky, různé skupiny protist, oomycety, mikrosporidie a mnoho dalších (Ebert 2005). Paraziti hojně ovlivňují dynamiku populace perlooček (Decaestecker et al. 2005, Wolinska 2006, Duncan et al. 2007), také hrají významnou roli i v genetické struktuře (nejen) perlooček, proto vědce zajímá antagonistická koevoluce hostitel-parazit. Prevalence mikroparazitů v některých populacích r. *Daphnia* dosahuje 50-100 %, což nasvědčuje tomu, že evoluce hostitele může být silně ovlivněna nutností ubránit se parazitům (Little et al. 2001, Ebert 2008).

V antagonistické koevoluci je pro vztah hostitel-parazit pozoruhodná rychlost, s jakou si napadený hostitel neustále snaží vyvíjet rezistenci proti nejběžnějším genotypům parazita, a naopak, jak se parazit snaží přizpůsobovat na nové adaptace hostitele, čímž dochází ke změnám genotypu (Ebert 2008). Rychlé změny genotypu hostitelé docílují díky sexuálnímu rozmnožování, které je zdánlivě nevýhodné oproti asexuálnímu rozmnožování (Lively 2010). Interakce mezi mírou infekce a hostitelskými genotypy může vést parazity k negativně frekvenčně závislé selekci a ke změně ve frekvenci genotypů v rámci populace. Běžné hostitelské genotypy budou více napadány parazity než vzácné genotypy. Vzácné genotypy tak získají větší fitness a v průběhu evoluce nahradí dříve běžné genotypy. Tím se změní i genotypy parazitů a začnou být upřednostňované ty, které jsou schopné napadat původně vzácnější genotypy hostitelů (Caruis et al. 2001, Little et al. 1999, Wolinska et al. 2006 a 2009a, Jokela et al. 2009, Gonzáles-Tortuero et al. 2016). Myšlenku, že časově zpožděná, negativně frekvenčně závislá selekce zprostředkovaná parazity upřednostňuje vzácné hostitelské genotypy vzniklé rekombinací, shrnuje známá hypotéza Červené královny (Lively 2010).

Dynamiku genotypových změn ale není v přírodních podmínkách snadné pozorovat, protože to vyžaduje několik generací hostitelů a jejich parazitů (Caruis et al. 2001,

Koskella et al. 2009, Jokela et al. 2009, Wolinska et al. 2009a). Pro odhalení asociace mezi hostitelskými a parazitárními genotypy jsou proto obzvláště vhodné perloočky, protože jejich genotyp je během asexuální reprodukce stabilní a k rekombinaci dochází jednou za čas, na rozdíl od sexuálně se rozmnožujících jedinců (Little et al. 1999). Vzhledem k silnému efektu genetického pozadí na specifičnost infekce a vysokou míru virulence některých mikroparazitů, mohou být paraziti dominantní silou při ovlivňování genotypového polymorfismu v rámci hostitelské populace, čímž mohou vést k evolučním změnám v populaci perlooček (Colbourne et al. 2004, Brede et al. 2006, Duncan et al. 2007, Wolinska et al. 2009 a 2011, Metzger et al. 2016). Odhady toku genů mezi populacemi jsou klíčem k pochopení mikroevoluční procesů v rámci druhu, včetně mechanismů koevoluce v systému hostitel-parazit (Wolinska et al. 2011).

Moje práce navazuje na spolupráci týmu prof. Justyny Wolinské (nyní na Freie Universität Berlin) a katedry ekologie na Přírodovědecké fakultě UK (Stodola 2013, Hubová 2015) na výzkumu mikroparazitů druhového komplexu perlooček *Daphnia longispina* a prostorových gradientů parazitace v přehradních nádržích (Wolinska et al. 2011, Weigl et al. 2012, Yin et al. 2012). Tyto studie se zabývaly genetickou strukturou perlooček a vztahy mezi perloočkami a jejich mikroparazity, mezi nimiž byly zahrnuty i mikrosporidie.

Patří mezi ně i diplomová práce o mikrosporidiích na téma „Mikroparaziti a plodnost perlooček rodu *Daphnia* na gradientech v korytovitých přehradních nádržích“, kterou na katedře ekologie v roce 2015 obhájila Jana Hubová. Vzorky odebrané z přehrad Vír a Vranov sloužily k analýze a určení prostorové distribuce a časové dynamiky mikroparazitů napadajících perloočky, ovlivnění distribuce perlooček i míru jejich parazitace. Cílovými skupinami mikroparazitů byly oomycety, prvoci *Caullerya mesnili*, kvasinky *Metschnikowia bicuspidata* a mikrosporidie *Berwaldia schaefernai*. Diplomová práce Jany Hubové se dále podrobně zabývala fixací a určením mikrosporidiální nákazy v perloočkách.

Zjištěné údaje o nízké populační variabilitě mikrosporidie označované jako *Berwaldia schaefernai* (Wolinska et al. 2011, Gonzalez-Tortuero et al. 2016) podporují hypotézu o jejím vícehostitelském cyklu. Jako vhodný kandidát pro šíření mikrosporidie se jeví létající hmyz s vodními larvami (Wolinska et al. 2011). Takový přenos by mohl účinně homogenizovat populaci parazitů, naopak vysoká genetická diverzita se obvykle nachází mezi populacemi parazitů infikující nepohyblivé nebo asociální hostitele (Huyse et al. 2005). Pokud paraziti migrují více než jejich hostitelské perloočky, mohou být v koevoluční výhodě – vítězí nad svými hostiteli, protože se přizpůsobují změnám v rezistenci hostitele rychleji, než je hostitel schopný čelit parazitárním infekcím (Dybdahl et al. 1996, Metzger et al. 2016).

Přestože je prostředí přehrad a jiných velkých vodních nádrží vhodné pro výzkum prostorových gradientů a studium mikroparazitů perlooček, pro detailnější studium vztahů

hostitel-parazit a hledání případného sekundárního hostitele je to příliš velké a komplikované prostředí, co do počtu mikrohabitátů a jejich dostupnosti (např. dno, pelagiál), mnoho druhů živočichů, zahrnující hmyz a perloočky. Sledování, vzorkování i odběry jsou na přehradách komplikované a náročné.

K základnímu zkoumání vztahů mezi hostitelskými perloočkami a jejich mikroparazity, v tomto případě konkrétně mikrosporidii, a případnými sekundárními hostiteli, je vhodnější jednoduché prostředí s málo druhy. Pod tím si lze představit tůň, která je snadno dostupná, s jednoduchým společenstvem a spíše s jednoduššími vztahy mezi živočichy. Klíčovou podmínkou je, aby se na lokalitě vyskytoval stejný, nebo alespoň příbuzný druh určený ke zkoumání (tj. mikrosporidie r. *Berwaldia*) jako se vyskytuje v nádržích. A zároveň, že se na zkoumané lokalitě pokud možno vyskytuje jen jeden hostitelský druh r. *Daphnia* (v přehradách druhový komplex *D. longispina* a v tůni *D. pulex*). Proto byla vybrána lesní tůň nedaleko obce Běleč na Křivoklátsku, kterou nám doporučil prof. Vávra.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

12S – mitochondriální 12S ribozomální RNA, je součástí malé podjednotky mitochondriálního ribozomu

16S – prokaryotní ribozomální RNA, která se vyskytuje v malé podjednotce, univerzální marker ve fylogenetických studiích, prokaryotní ekvivalent 18S

18S – eukaryotní ribozomální RNA

DNA – deoxyribonukleová kyselina

PCR – z anglického „polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce

SSU – z anglického „small subunit“, malá ribozomální podjednotka

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

DNA – deoxyribonukleová kyselina

CÍLE PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo prozkoumat vzájemné interakce mezi hostitelskými perloočkami *Daphnia pulex* a dvěma mikrosporidiálními parazity - *Berwaldia singularis* a prozatím neznámou mikrosporidií, která byla pracovně označena jako „HVH“. Zkoumanou lokalitou se stala lesní tůň u Bělče, která je díky jednoduchému společenstvu, perloočkám nakaženými mikrosporidii a dalším mnoha vlastnostem vhodná ke studiu.

Prvním cílem bylo zjištění sezónní dynamiky hostitelských perlooček a prevalence mikrosporidiální nákazy. Pravidelné terénní odběry zooplanktonu jsem prováděla v období 2014 - 2016, po kterých následovala laboratorní část se základní determinací zooplanktonu, určení denzity zooplanktonu a vizuální určení perlooček s mikrosporidiální infekcí. Zároveň jsem sledovala prevalence infekce a porovnávala vliv mikrosporidiální infekce na časovou dynamiku populace perlooček na lokalitě mezi lety 2014 a 2015.

Druhým krokem bylo otestovat v pilotních experimentech, jakým způsobem se přenáší (resp. nepřenáší) mikrosporidie „HVH“ a *Berwaldia singularis* na hostitelské perloočky nebo mezi nimi. Provedla jsem pokusy s horizontálním a vertikálním přenosem s použitím zdravých i nakažených perlooček a pokusy s virulencí spor, které jsem získala izolací z nakažených perlooček.

Další náplní mé diplomové práce byla molekulární detekce DNA mikrosporidií pomocí amplifikace fragmentu genu 16S malé podjednotky rRNA pomocí primerů, které jsou považovány za specifické pro mikrosporidie. Pokud by se mi podařilo amplifikovat mikrosporidiální DNA, v případě nejistoty při vizuálním určení bych po amplifikaci mohla vyloučit jinou, vizuálně podobnou infekce (např. bakteriální). Následně jsem PCR produkty osekvenovala pro bližší určení studovaných druhů a jejich zasazení do kontextu ostatních mikrosporidií napadajících perloočky.

Nedávno úspěšně na perloočkách a dalších vodních členovcích proběhly studie odhalující diverzitu mikroparazitů (i mikrosporidií) (Wolinska et al. 2009, Yin et al. 2012, Grabner 2016). V neposlední řadě jsem pomocí PCR a sekvenace hledala možnou přítomnost studovaných mikrosporidií u dalších vodních bezobratlých, především u larev létajícího hmyzu, čímž jsem se chtěla více přiblížit k odpovědi na otázku, zda mikrosporidie mají na lokalitě, kromě hostitelských perlooček, sekundárního vektora.

1. PERLOOČKY R. DAPHNIA

Na studované lokalitě, v lesní tůni u Bělče, je nejběžnějším zástupcem zooplanktonu, a vybraným objektem zkoumání, perloočka druhu *Daphnia pulex*.

Perloočky rodu *Daphnia* zahrnují okolo 200 druhů malých vodních korýšů patřící do řádu Anomopoda (Branchiopoda: Cladocera), jež patří k typickým zástupcům zooplanktonu ve sladkých vodách, zejména jezerech, umělých nádržích a tůních (Colbourne et al. 1997). Perloočky hrají důležitou roli v udržování kvality vody a v trofických sítích sladkovodních ekosystémů. Většina perlooček se živí primárními producenty – jsou to filtrátoři řas, bakterií a dalších partikulí vyskytujících ve vodě, některé perloočky jsou predátoři. Posléze se perloočky stávají potravou pro některé ryby a větší bezobratlé organismy (Ebert 2005, Forró et al. 2008, Petrusek 2010, Bohler et al. 2012).

Perloočky se staly populárními modelovými organismy v různých odvětvích biologie, ekologie, toxikologie a mnoha dalších vědeckých oborech díky jejich snadnému chovu a manipulaci v laboratorních podmínkách: perloočky tvoří velké populace s krátkou generační dobou a produkují relativně velké množství potomků (Stollewerk 2010). Tělo perlooček je většinou průhledné, takže lze snadno pozorovat jejich vnitřní strukturu s orgány. Obvykle se rozmnožují cyklickou partenogenezí a dokáží vytvářet dormantní stádia, která jsou schopna přetrvat nepříznivé podmínky (Decaestecker et al. 2005; Lampert 2006, Hudec 2010, Stollewerk 2010).

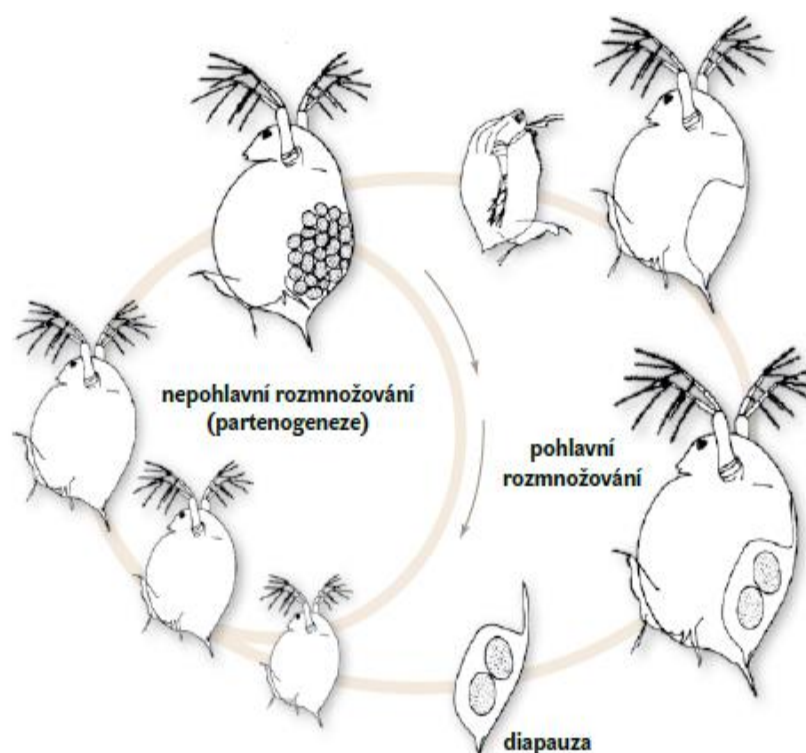
Daphnia pulex, česky hrotnatka obecná, je běžná, v dospělosti přibližně 1,5–3 mm velká, zaoblená, průhledná perloočka. Hlavová část vybíhá v rostrum, tělo je kryté chitinizovaným karapaxem, který posteriorně vybíhá v charakteristickou spinu, jež může dosahovat až čtvrtiny délky těla. V dorzální části těla má *D. pulex* umístěnou plodovou komůrku, ve které se vyvíjí vajíčka a embrya (Ebert 2005, Hudec 2010).

Pro perloočky je typickým způsobem rozmnožování cyklická partenogeneze, tedy střídání nepohlavní partenogeneze se sexuálním rozmnožováním (obr. 1). Samičky obvykle partenogeneticky plodí asexuální dcery. Vývoj potomků je přímý, bez larválního stádia, po vylíhnutí z vajíček zůstávají embrya v plodové komůrce ještě po dobu třech dní. Perloočky prochází pěti juvenilními instary, teprve šesté stádium je dospělé, schopné rozmnožování. Dospělé samice mohou v závislosti na podmínkách produkovat vajíčka každé 3-4 dny až do jejich smrti. Po určité změně životních podmínek (např. pokles teploty, změna fotoperiody, nedostatek potravy) dojde u dospělých samic k produkci synů, jež se rozmnožují pohlavně. Pohlavně vzniklá embrya mohou pozastavit svůj vývoj v případě nepříznivých podmínek a vzdorovat jim tak, že jsou uzavřena do několika vrstev mateřského karapaxu, který jim vytvoří

dostatečně odolné chitinizované a melanizované pouzdro, tvarem připomínající sedélko –
 – efípium (Ebert 2005 a 2008, Kleiven et al. 1992). Jakmile opět nastanou vhodné životní
 podmínky, pokračuje diapauzní stádium ve vývoji a líhne se z něj samička. Existují
 i výjimky – u některých klonů jsou asexuální samičky schopné tvořit dormantní vajíčka i bez
 meiózy a tudíž nepotřebují samce, tento proces se nazývá obligátní partenogeneze (Ebert
 2008).

Cyklická partenogeneze kombinuje především výhody partenogeneze a sexuálního
 rozmnožování. Díky asexuálnímu rozmnožování perloočky rychle reagují na momentálně
 výhodné environmentální podmínky prostřednictvím rychle se množících klonálních jedinců.
 Sexuální rozmnožování poskytuje zdroj genetické variability díky rekombinaci, a tím zvyšuje
 pravděpodobnost, že některé genotypy budou lépe adaptovány na nové změny prostředí,
 mimo jiné např. odolnější proti parazitům (Innes et al. 2000).

Obr. 1. Životní cyklus perlooček s cyklickou partenogenezí a sexuálním rozmnožováním. Autorka kresby: Katleen Van Der Gucht, zdroj: Petrusek 2010.



2. MIKROSPORIDIÁLNÍ PARAZITI PERLOOČEK RODU *DAPHNIA*

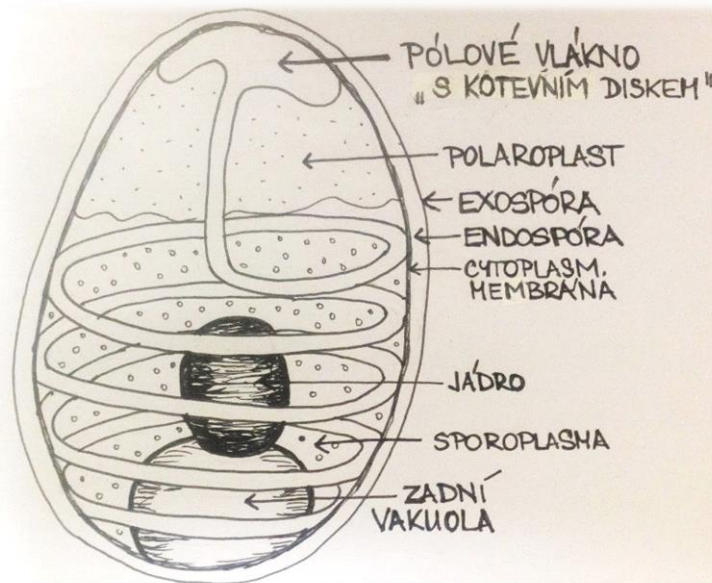
2.1. MIKROSPORIDIE

Mikrosporidie jsou jednobuněční obligátní paraziti. Původ mikrosporidií není zcela objasněn, ale nedávno publikované údaje naznačují, že mikrosporidie jsou příbuzné s houbami, a to buď jako sesterská skupina „nižších hub“ Cryptomycota (James et al. 2013), nebo přímo podskupinou patřící do Cryptomycota, či součástí nově navržené superskupiny Opisthosporidia, která sjednocuje skupiny Microsporida, Cryptomycota a Alpheleida, kam patří zástupci parazitů řas, a který je sesterskou skupinou pravých hub (Karpov et al. 2014).

Mikrosporidie jsou hojní paraziti zahrnující přes 1300 popsanych druhů v přibližně 160 rodech; infikují především ryby, hmyz, koryše, ptáky a savce, nevyjímaje člověka (Refardt et al. 2002, Vossbrinck et al. 2004, 2005, Corradi et al. 2009, Stentiford et al. 2013). Od většiny ostatních protist se mikrosporidie liší absencí mitochondrií, dále mají organelu zastávající funkci Golgiho aparátu a 70S ribozomální podjednotku (Lom 1999, Corradi et al. 2009).

Mikrosporidie jsou druhově i tkáňově specifické a jejich životní cyklus může být jednoduchý nebo složitý vícehostitelský. Mikrosporidie mají ve svém životním cyklu pohlavní a nepohlavní stádium (Ironsides 2007). Většina mikrosporidií má jednoduchý životní cyklus s přímým přenosem infekce. Za disperzi mikrosporidií, a tudíž jejich přenos z hostitele na hostitele, jsou zodpovědné spory. Jedná se o jediné životní stádium mikrosporidií, které je schopné žít mimo buňky hostitele a přežít vyschnutí.

Životní cyklus mikrosporidií začíná v momentě, kdy germinální spory injikují obsah své buňky do hostitelské cytoplazmy. Pro infekci hostitele mají mikrosporidie uzpůsobený injekční aparát ve formě dlouhé stočené injekční trubice – obvykle označované jako „pólové vlákno“ (obr. 2). Spora se aktivuje chemickým podrážděním a „vystřelí“ pólové vlákno do buňky hostitele, poté přejde obsah spory – sporoplazma – do hostitele (Xu et al. 2005, Franzen 2005, Vávra et al. 2013). Jádra sporoplazmy se dělí merogonií a vzniká nepravé plazmodium nazývané meront, které postupně vyplňuje cytoplazmu hostitelské buňky. Posléze dojde k syntéze proteinů, které aktivují tvorbu buněčné stěny za vzniku sporontů. Sporonti jsou přechodným stádiem mezi meronty a sporami, jejich dělení a produkce dceřiných spor je druhově specifické, nakonec dojde v procesu zvaném sporogonie k maturaci spor s funkčním injekčním aparátem (Franzen 2005, Vávra et al. 2013).



Obr. 2. Obecné schéma spory mikrosporidie. Překresleno podle Han et al. 2017

Mikrosporidie infikují výhradně hostitelskou cytoplazmu, kde probíhá většina životního cyklu s maturací a reprodukcí spor (Vávra et al. 2013). Většina mikrosporidií napadá u perlooček buňky střevního epitelu, vaječníky, tukovou tkáň či hypodermis. Ke střevním infekcím dochází obvykle horizontálním přenosem, naopak k infekci vaječníků dochází vertikálním přenosem (viz kapitola 2.2). Příznaky infekce, stejně tak tvar a velikost spor bývají druhově specifické. Spory mohou být kulaté, oválné, hruškovité, uprostřed zúžené, jejich velikost může být v rozmezí 1–5 μm . Některé mikrosporidie lze v pokročilé fázi nákazy pozorovat v různých odstínech barev (od bělavé, narůžovělé, žluté, zelené až tmavé) jako shluky spor vyplňující specifické tkáně či celé tělo perloočky (Ebert 2005, Weigl et al. 2012, Vávra et al. 2013). Spory uvolněné z těl perlooček klesají na dno, kde mohou přečkat zimu nebo se stanou zdrojem pro další infekci (osobní sdělení prof. Vávry 2016).

U některých mikrosporidií se vyskytuje heterosporie, která je rovněž diskutována u mikrosporidií s vícehostitelským cyklem. Heterosporie, jak už název napovídá, se vyznačuje morfologickými rozdíly mezi spory v jednotlivých částech životního cyklu, které mají pravděpodobně i různou funkci. Rozdílné typy spor se vyskytují v hostiteli, jiné ve volném prostředí a další například přečkávají nepříznivé období bez hostitele v sedimentu (Vizoso et al. 2004, Becnel 1994).

Není ovšem podmínkou, že druh s heterosporií musí mít nutně vícehostitelský životní cyklus, což dokládá například mikrosporidie *Hamiltosporidium tvaerminensis*, dříve v literatuře označovaná jako *Octosporea bayeri* (Vizoso et al. 2004, Ebert 2005, Haag et al. 2011). U *H. tvaerminensis* byly pozorovány tři různé typy spor, z nichž první dva jsou

hruškovitého tvaru, lišící se od sebe pouze tloušťkou stěny spory, a objevující se na počátku infekce. Třetí druh spor má odlišný, nepravidelný tvar. Funkcí prvních dvou typů spor je různý způsob šíření, kdežto funkce třetího typu je prozatím neznámá (Roth et al. 2008; Haag et al. 2011).

2.2. ZPŮSOBY PŘENOSU INFEKCE

Infekce způsobené uvedenými mikroparazity se přenáší dvěma způsoby: horizontálně, nebo vertikálně. Horizontální přenos znamená nakažení nových hostitelů infekčními spory uvolněnými do vody z nakažených jedinců. Spory mohou být uvolněné z živých nakažených perlooček nebo ze spor, které se uvolnily z mrtvých, rozkládajících se těl nakažených jedinců. Zdravé perloočky se mohou nakazit spory během filtrace vody (Ebert 2005, Vizoso et al. 2005). Horizontální přenos infekce na perloočkách *Daphnia magna* byl spolehlivě doložen jen u několika druhů mikrosporidií *Flabelliforma magnivora* (Larsson et al. 1998), *Hamiltosporidium tvaerminnensis* (Haag et al. 2011) a *Pleistophora intestinalis* (Mangin et al. 1995).

Druhý způsob přenosu mikroparazitů u perlooček je vertikální cestou z nakažené matky na vajíčka. V přenosu a disperzi infekce mohou hrát roli i efípie, díky kterým by se mikrosporidie mohla i snadněji šířit do nových lokalit (Vizoso et al. 2004, Ebert 2005). Přenos infekce z matky na potomstvo byl popsán u hostitelských *Daphnia magna* na mikrosporidiích *Flabelliforma magnivora* (Larsson et al. 1998), *Hamiltosporidium tvaerminnensis* (Haag et al. 2011) a *Tuzetia* sp. (Mangin et al. 1995).

Některé mikrosporidie vodních členovců a vodních larev potřebují pro dokončení svého životního cyklu infikovat jiného hostitele. Jejich spory totiž nejsou schopné infikovat jedince stejného druhu (Vávra et al. 2005, Refardt et al. 2008). K podezření na vícehostitelský cyklus došlo u mikrosporidií: *Tuzetia* sp. (Mangin et al. 1995), *Flabelliforma magnivora* (Ebert 2005), *Binucleata daphniae* (Refardt et al. 2008), jejichž mezihostitelem je *Daphnia magna*; *Gurleya vavrai* na *D. magna* i *D. pulex*, *Larssonia obtusa* na *D. pulex* (Refardt et al. 2002) anebo u mikrosporidie onačované jako „*Berwaldia schaefernai*“¹, která se nachází na druhovém komplexu *Daphnia longispina* v přehradních nádržích (Wolinska et al. 2009). Nejčastěji

¹ V průběhu mé diplomové práce jsem se dozvěděla o chybě v GenBank. Pod názvem *Berwaldia schaefernai* byla do r. 2017 chybně označena sekvence jiného druhu mikrosporidie. Proto budu tuto chybně označenou mikrosporidii psát v uvozovkách - „*Berwaldia schaefernai*“. Více viz Diskuze.

diskutovaným alternativním hostitelem jsou buchanky nebo létající hmyz s vodními larvami, díky kterým mikrosporidie získávají větší potenciál pro rozptýlení (Mangin et al. 1995, Vossbrinck et al. 2004, Wolinska et al. 2009).

Diverzifikovaná skupina vodních mikrosporidií Amblyosporidae napadající buchanky a dospělé komáry byla porovnáвана na základě sekvenace SSU rRNA s mikrosporidii *r. Berwaldia*, *Hazardia*, *Gurleya*, *Larssonia* a *Trichotuzetia*. Fylogenetická analýza pomohla upřesnit příbuznost mezi skupinou Amblyosporidae a ostatními druhy vodních mikrosporidií, napadajícími rovněž komáry, dále ve studii podrobně popisují přenos infekce a vícehostitelský cyklus (Vossbrinck et al. 2004). Že se nejedná o ojedinělý případ vícehostitelského cyklu na vodních členovcích, potvrzují i další studie, např. buchanky *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* a komáři *Culex renatoi* (Micieli et al. 2000), nebo práce Andreadise (1985, 2005) který se dlouhodobě zabýval přenosem mikrosporidiální infekce mezi buchankami *Acanthocyclops vernalis* a komáry *Aedes cantator* v laboratorních podmínkách.

V laboratorních podmínkách se přenos mikrosporidiální infekce podařilo nasimulovat na hostitelské perloočky *Daphnia magna*, a to konkrétně mikrosporidii *Binucleata daphniae* (Refardt et al. 2008) a *Hamiltosporidium tvaerminnensis* (Haag et al. 2011), *Ordospora colligata* (Ebert 2005), *Tuzetia* sp. (Mangin et al. 1995). U ostatních mikrosporidií, nebo na hostitelské perloočky *D. pulex* se přenos nasimulovat nepovedlo, což může u mikrosporidií poukazovat na složitější životní cyklus s přítomností dalšího mezihostitele (Andreadis 1985, Ebert 2005, Refardt et al. 2002, 2008, Wolinska et al. 2011).

2.3. PŘÍKLADY MODELOVÝCH SYSTÉMŮ MIKROSPORIDIÍ PARAZITUJÍCÍCH NA ZÁSTUPCÍCH R. *DAPHNIA*

Následující kapitola pojednává o vybraných mikrosporidiích parazitujících na perloočkách *r. Daphnia*, které jsou zajímavé kvůli podezření na vícehostitelský cyklus, anebo jsou příbuzné mikrosporidiím z tůně či přehrad.

Typickým zástupcem mikrosporidie s jednohostitelským životním cyklem, který parazituje na perloočkách *Daphnia magna*, je *Binucleata daphniae*. Zajímavé je na ni to, že ačkoliv má *B. daphniae* pouze jeden typ spor (homosporie), přesto patří do kladu, kde se její příbuzné druhy vyznačují heterosporií a vícehostitelským životním cyklem. Jako vysvětlení se nabízí, že teprve evolučně nedávno *B. daphniae* pozměnila svůj vícehostitelský životní cyklus na jednoduchý. Tato mikrosporidie napadá vysoce virulentními spory hypodermis a tkáň, které jsou důležité pro růst a vývoj, přesto je infikovaná perloočka schopna růstu a svlékání (Refardt et al. 2008).

Agglomerata cladocera se svými hruškovitými sporami parazituje na perloočkách *Daphnia magna*. Spory tvoří nejčastěji osmisporové klastry, které vytvářejí ložiska v hypodermu a tukových buňkách (Larsson et al. 1996, Sokolova et al. 2016). Na druhu *Daphnia pulex* nebyla *Agglomerata cladocera* doposud spatřena (Larsson et al. 1996). Na základě sekvenace SSU je pravděpodobné, že *A. cladocera* a *Binucleata daphniae* jsou blíže příbuzné nebo dokonce shodné a *B. daphniae* je jen novější název pro jeden a ten samý druh (Sokolova et al. 2016).

Flabelliforma magnivora napadá tukovou tkáň u perloočky *Daphnia magna* (Larsson 1998). Infekce byla pozorována i v podkožních buňkách a vaječnicích. Spory jsou poměrně velké (až 4,5 µm), hruškovitého tvaru a tvoří velké shluky v centrální části těla. Nakažené perloočky mají nižší životaschopnost a u některých dochází k redukci plodnosti. Schopnost virulence je překvapivě nízká. Pro *F. magnivora* je typický vertikální přenos z mateřského hostitele na potomky, horizontální přenos není běžný (Larsson 1998, Ebert 2005). Na základě sekvenace SSU byla *F. magnivora* přemístěna do r. *Hamiltosporidium* a přejmenována na *Hamiltosporidium magnivora* (Haag et al. 2011).

Blíže příbuzná mikrosporidie *Hamiltosporidium tvaerminnensis*, parazitující pouze na perloočkách *Daphnia magna*, rovněž infikuje tukové buňky a vaječníky, snižuje životaschopnost a plodnost perloočky (Haag et al. 2011). Jak již jsem zmínila v kap. 2.1. pro *H. tvaerminnensis* je charakteristická heterosporie, přestože má jednoduchý životní cyklus. V posledním stádiu infekce dojde k zaplnění celého těla perloočky bíle opaleskujícími spory. U *H. tvaerminnensis* je známý horizontální přenos (pouze spory z rozkládajících se nakažených perlooček), který se podařilo úspěšně doložit i v laboratoři (Haag et al. 2011), ale i vertikální (transovariální) přenos infekce (Ebert 2005).

Berwaldia schaefernai, původně popsána jako *Plistophora schaefernai* Jírovec, 1937, infikuje perloočky druhového komplexu *Daphnia longispina*, které se hojně vyskytují v rybnících, přehradách a jezerech. Infekce je snadno rozpoznatelná díky nazelenému zabarvení, nejdříve napadá vaječníky a tukové buňky, následně ostatní tkáň. Jelikož napadené perloočky nejsou schopné produkovat vajíčka, či vajíčka nejsou schopna zrání, lze pochybovat o možnosti transovariálního přenosu infekce (Vávra et al. 1994). I další pokusy s přenosy infekce v laboratoři byly neúspěšné (Vávra et al. 1994). Největší výskyt infekce nastává v letních měsících. Zralé spory mají nepatrně asymetrický oválný tvar, jsou velké cca 4,7x2,5 µm a relativně snadno rozpoznatelné od spor ostatních druhů mikrosporidií díky svému tvaru, velké zadní vakuole a velkému jádru (Vávra et al. 1994). *Berwaldia schaefernai* je sesterským druhem *Berwaldia singularis* - jedné z mikrosporidií, jež se vyskytuje na mnou zkoumané lokalitě v Bělči (Vávra et al. in press).

„*B. schaefernai*“ se stala předmětem zkoumání vlivu na populační dynamiku a genetickou strukturu hostitelského komplexu perlooček *Daphnia longispina* vyskytující se v přehradních nádržích (Wolinska et al. 2009a, Yin et al. 2012). U této mikrosporidie byl zjištěn rovnoměrný výskyt a distribuce ve většině zkoumaných nádržích (Wolinska et al. 2009a, Weigl et al. 2012). Společně s navrhovanými možnostmi přenosů a neschopností provést infekci sporami v laboratorních podmínkách nasvědčují tyto faktory k složitému životnímu cyklu se sekundárním hostitelem (Refardt et al. 2002).

2.4. MIKROSPORIDIE PARAZITUJÍCÍ NA PERLOOČCE *D. PULEX* NA ZKOUMANÉ LOKALITĚ

Na vybrané lokalitě v tůni nedaleko Bělče parazitují na hostitelských perloočkách minimálně tři druhy mikrosporidií.

A to *Berwaldia singularis* (Larsson 1981), nově popsaná *Globulispora mitoportans* (Vávra et al. 2016), a dosud nezařazená mikrosporidie, která je strukturálně velmi podobná mikrosporidii *Agglomerata* sp., avšak podle předběžného zkoumání týmu prof. Vávry nebude patřit do tohoto rodu. Proto budu nadále pro tuto mikrosporidii užívat jen pracovní název „HVH“ („HVH“ doslova znamená „hrušky v hlavě“ podle hruškovitého tvaru spor a lokalizace v hlavě, rostru a okolí jícnu perloočky). Formální popis této mikrosporidie má být dokončen týmem prof. Vávry v průběhu roku 2017.

Berwaldia singularis, poprvé objevena v *Daphnia pulex* a popsána v roce 1981, infikuje tukové buňky. V pokročilém stádiu infekce lze spory nalézt i ve vaječnicích a hypodermu, ale nikdy se nenachází ve střevním epitelu, svalech nebo nervové tkáni. V životním cyklu má dvě vývojově odlišná, merogonální stádia, z merontů druhého stádia se vyvíjí sporonti produkující dva sporoblasty, ze kterých se vytvoří pár spor, které se mohou vyskytovat odděleně. Spora je obalená speciální membránou, přibližně 5,5x6,5x3,0 µm velká, ale po fixaci a vysušení se zmenší zhruba na polovinu (Larsson 1981).

V Bělči se v hostitelských perloočkách *D. pulex* vyskytuje ještě další, nově popsaný druh mikrosporidie, a to *Globulispora mitoportans* (Vávra et al. 2016), kterou se ale blíže ve své diplomové práci zabývat nebudu, protože se její příbuzný ekvivalent v přehradních nádržích nenachází (a také jsem se o její přítomnosti v tůni dozvěděla až v roce 2016). Přesto ji chci jako mikrosporidiálního parazita perlooček krátce zmínit. *G. mitoportans* patří do heterogenní skupiny parazitujících na členocích. infikuje střevní epitel perlooček v horní až střední části střeva a žaludeční stěnu. Nakažené buňky obsahují mnoho parazitických spor, vejčitého až oválného tvaru. Spory se vyskytují jednotlivě, nejsou seskupené v klastry a jejich

tvár zůstává stejný i po vysušení. *Globulispora mitoportans* má mezi popsanými mikrosporidii jedinečnou strukturu. Kromě perloočky *D. pulex* parazituje mikrosporidie *G. mitoportans* v tůni z Bělče ještě na dalším druhu perloočky *Simocephalus vetulus*. Jako u perloočky *D. pulex* i zde *G. mitoportans* infikuje gastrointestinální tkáň (Vávra et al. 2016).

METODIKA

1. STUDOVANÁ LOKALITA

Vhodným prostředím pro mou práci se ukázala lesní tůň (obr. 3) mezi obcemi Běleč a Nižbor (50.054N, 14.019E), která mi byla doporučena prof. Vávrou. Byla vybrána kvůli jednoduchému společenstvu, které zde žije, a přítomnosti perlooček nakažených mikrosporidii r. *Berwaldia*. Tůň je velmi vhodná pro terénní odběry – je snadno dostupná a v bezprostřední blízkosti silnice, je dostatečně mělká pro jednoduché odběry z břehu anebo v rybářských brodicích kalhotách dále od břehu.

V sezóně 2014 byla tůň hluboká až 120 cm a její plocha dosahovala až 800 m². Následující rok v srpnu tůň postupně vyschla až na minimálních 10 cm v nejhlubších místech o ploše 50 m². V prosinci 2015 se tůň začala opět zaplňovat, přesto v období jara 2016 dosahovala maximální hloubka jen 80 cm a plocha tůně se zmenšila asi o 200 m². V květnu 2017 maximální hloubka dosahovala jen 50 cm a plocha tůně asi 150 m², přes léto očekávám její kompletní vyschnutí. Většinu roku je hladina pokrytá okřehkem *Lemna minor*, teplota vody v létě nepřesahuje 25°C.



Obr. 3. Zkoumaná lokalita – lesní tůň mezi Nižborem a Bělčem, pokrytá okřehkem, 30. dubna 2015. Autor: P. J. Juračka

2. TERÉNNÍ ODBĚRY VZORKŮ

Terénní odběry jsem prováděla v sezónách 2014 – 2016, s frekvencí jedenkrát týdně až měsíčně od března do září, tedy v období výskytu hostitelské perloočky *Daphnia pulex*. Frekvenci odběrů jsem podle sezóny 2014 v sezónách 2015 a 2016 upravila a zvýšila v období prevalence infekce od konce dubna do konce června (viz Příloha I-III). (Vybavení potřebné k odebírání vzorků je uvedeno v Příloze IV)

Z jednoho odběru jsem pořizovala několik vzorků podle typu zkoumaného objektu či ročního období. Pro pozorování chování populace zdravých a nakažených jedinců *Daphnia pulex* a pokusy s přenosem infekce jsem potřebovala živý zooplankton, který jsem náhodně odebírala litrovou nádobou, obvykle stačilo odebrat 1–2 litry vody. Pro dlouhodobější laboratorní analýzy, determinaci bezobratlých a počítání denzity jsem odebrala dva kvantitativní a dva kvalitativní vzorky, od každého z mělčiny (odebírané při břehu do hloubky cca 30 cm) a z hlubší části (ve vzdálenosti více než 5 m od břehu a při hloubce větší než 30 cm).

Při odběru kvantitativních vzorků jsem náhodně po 1 litru odměrnou nádobou odebírala 10 litrů vody z mělčiny i z hlubší části, které jsem posléze přefiltrovala přes planktonní síť o velikosti ok 100 μm . Kvantitativní vzorky jsem zafixovala formaldehydem do výsledné koncentrace ve vzorku cca 4% a pro pozdější analýzu uchovávala v lednici. Dále jsem pro pozorování infekce a genetickou analýzu odebírala planktonní síť o velikosti ok 100 μm na teleskopické tyči vzorek z mělčiny a pro odběr z hlubší části jsem používala asi dva metry dlouhý trubicový odběrák se spodní záklopkou (obr. 4). Kvalitativní vzorky jsem zafixovala v 96% etanolu a opět uchovávala v lednici. Příležitostně jsem planktonní síť odebrala další vodní bezobratlé živočichy a efipia perlooček; bahno s napadaným listím, ze kterého jsem získala bentické bezobratlé, jsem nabírala litrovou nádobou.

Součástí terénních odběrů bylo i měření chemických a fyzikálních vlastností vody: teplota vody a vzduchu, konduktivita a množství chlorofylu. Bohužel, ne vždy se mi dařilo zajistit měřicí přístroje, a proto je soubor dat neúplný.

Obr. 4. Trubicový odběrák se záklopkou a s detailem na záklopku s magnetem.



3. LABORATORNÍ ČÁST

3.1. DETERMINACE ZOOPLANKTONU A MIKROSPORIDIÍ

V laboratoři jsem pod světelným mikroskopem při zvětšení 400x určila do čeledí živočichy (některé z nich jsem určila druhu, viz kap. VÝSLEDKY), které se vyskytují na lokalitě: perloočky (čeled Daphniidae) a čočkovci (Chydoridae), buchanky (Cyclopoida), lasturnatky (Ostracoda), vodule (Hydrachnidae), pijavka (Hirudinidae), v bentosu se nacházejí žížalice (Lumbriculidae), naidky (Naididae) a bahnivka (Bithyniidae). Z hmyzu se vyskytují larvy dvoukřídlého hmyzu: koretry (Chaoboridae), pakomáři (Chironomidae), pakomárcovití (Ceratopogonidae) a komáři (Culicidae); larvy potápníka (Dytiscidae), na hladině (pokud není zarostlý okřehkem) se prohánějí bruslařky (Gerridae).

Bez pomoci mikroskopu lze mikrosporidiální infekci snadno zaměnit s jinými, které zbarvují tělo perloočky, např. infekce způsobené bakteriemi, kvasinkami, oomycetami a dalšími mikroparazity (Ebert 2005, Hubová 2015). Kromě vizuálních příznaků měli nakažené perloočky i zrychlenou sedimentaci ve vodním sloupci a zhoršené schopnosti plavání, z čehož vyplývá, že pro perloočky tak typický přískokový způsob plavání byl nevýrazný a těžkopádný (osobní pozorování podpořené pozorováním prof. Vávrou).

Nakažené perloočky se nejlépe pozorovaly pod bočním světlem na tmavém podkladu stereomikroskopem při 16x zvětšení. Pro přesné určení mikrosporidiální infekce bylo třeba pozorovat perloočky při větším zvětšení (100-1000x) pod světelným mikroskopem, jenomže v procházejícím světle není ideální pozorovat mikrosporidiální infekci kvůli zastínění a špatnému úhlu světla (obr. 4). Detaily spor a infekce lze dobře pozorovat (kromě elektronového mikroskopu) inverzním mikroskopem při použití temného pole pod pozorovaným objektem (obr. 5).



Obr. 4. Hostitelská perloočka *Daphnia pulex* nakažená spory mikrosporidie „HVH“, pozorována v procházejícím světle.

Autor: J. Vávra, 2014.



Obr. 5. Hostitelská perloočka *Daphnia pulex* nakažená sporami mikrosporidie „HVH“, pozorována na tmavém pozadí inverzním mikroskopem. Autor: P. J. Juračka, 2015.

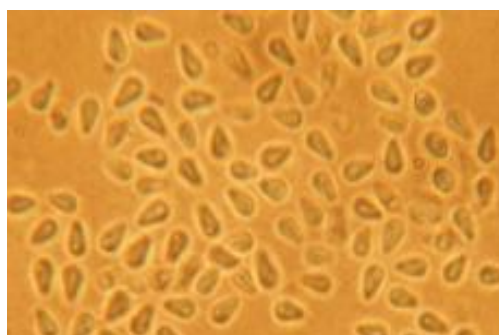


Obr. 6. Hostitelská perloočka *D. pulex* nakažená mikrosporidií *Berwaldia singularis*. Autor: J. Vávra, 2014.

V případě nejistoty, zda se jedná o mikrosporidiální nákazu a o jaký druh, jsem nakažené perloočky rozmačkávala mezi podložním a krycím sklíčkem, čímž došlo k vylití spor do vody a mikrosporidie se podle tvaru spor snáze identifikovaly.

Nákaza mikrosporidií *Berwaldia singularis* se projevuje zbarvením těla perlooček od bělavé až po narůžověle opaleskující barvu ložiskami spor, které postupně způsobují neprůhlednost perlooček. Spory se nacházejí v hrudní oblasti okolo jícnu, horní části střeva a filtračního aparátu (obr. 6), v hlavové části jsem spory pozorovala jen v posledním stádiu infekce, kdy už je sporami zamořená celá hostitelská perloočka. Spory jsou oválného, mírně nepravidelného tvaru (Vávra et al. v tisku).

Nákaza mikrosporidií „HVH“ (rovněž obr. 5) se projevuje jako bělavé kompaktní shluky v hlavové části, v hrudní části okolo jícnu, střeva a filtračního aparátu, infikuje tukové buňky a hypodermis. Nejlépe se infekce pozoruje při použití temného pole pod pozorovaným objektem. Spory mikrosporidie „HVH“ jsou přibližně 4 µm velké, na jedné straně oválku zúžené do tvaru připomínající hruštičku. Spory zaujímají kulovité klastry bělavé barvy o počtu 8–16 spor (obr. 7), po vylití do vody se klastry rozpadají na jednotlivé spory.



Obr. 7. Hruštičkovité spory mikrosporidie „HVH“. Autor: J. Vávra, 2014 .

3. 2. POČÍTÁNÍ DENZITY

Vzorky pro počítání denzity populace jsem odebírala kvantitativně z 10 l vody, kterou jsem přefiltrovala přes síťku s velikostí ok 100 µm, čímž jsem získala zahuštěné vzorky o objemu 100 ml a zafixovala je formaldehydem. Pro spočtení denzity populace jsem musela projít a spočítat 28 vzorků ze dvou odběrových míst – ze břehu a z větší hloubky, které pocházely převážně z období duben až červenec 2014 a 2015 (viz příloha V a VI). Pro určení denzity perlooček a výskytu infekce jsem zkontrolovala vzorky, které jsem odebrala v podzimních a zimních termínech. Pro spočítání prevalence a následnou genetickou část jsem používala vzorky s určenou infekcí odebraných v sezónách 2014 – 2016.

Po spočtení denzity jednoho vzorku s několika tisícovkami zooplanktonu jsem zvolila počítání poměrovým způsobem. Po důkladném promíchání a proprání vzorku pod vodou, abych se zbavila formaldehydu, jsem na počítací sklíčko odebrala 2ml podvzorek se zooplanktonem. Určila jsem zooplankton, spočítala jej a rozřadila do deseti kategorií: dospělé samice r. *Daphnia*, dospělé efipiální samice, samci, juvenilové, *Chydorus*, buchanky, larvy koretry, larvy pakomárovců, larvy komárů a ostatní bezobratlí živočichové. Pro určení denzity zooplanktonu jsem spočítala tolik podvzorků, aby počet jedinců v kategorii „dospělé samice“ nebo „juvenilové“ přesáhl 300.

Pro spočtení populační dynamiky ovlivněné infekcí a pro určení prevalence jsem používala kvalitativní vzorky, které byly za dostatku vody odebrané ze břehu i z hlubší části tůně. Vzorky byly pro pozdější genetickou analýzu zafixované ethanolem. Na základě získaných dat z roku 2014 jsem naplánovala intenzivější odběry v následující sezóně. Tímto jsem získala hrubý odhad výskytu infekce pro příští sezónu 2015, kdy jsem mohla odběry v období výskytu infekce zintenzivnět, jednalo se o pět odběrů. Pro určení prevalence jsem v kompletním vzorku detekovala nakažené perloočky, dle příznaků odhadla mikrosporidiální infekci pod stereomikroskopem a rozřadila perloočky do kategorií zdravé versus nakažené: dospělé samice, efipiální samice, juvenilové a samci, na závěr jsem spočítala zdravé a nakažené perloočky a na základě podílu nakažených perlooček vůči zdravým jsem vypočítala prevalenci.

3. 3. STATISTICKÁ ANALÝZA DAT Z TERÉNNÍCH VZORKŮ

Z celkem 22 odběrových termínů během sezón 2014 – 2016 (viz příloha VI a VII), jsem získala dostatečné množství dat ke zpracování. Po určení celkové denzity perlooček a bezobratlých a spočítání prevalence z 8 odběrových termínů, jsem se rozhodla statisticky

otestovat hypotézu, zda míra prevalence signifikantně závisí na denzitě hostitelských perlooček. V literatuře se uvádí, že k výskytu mikroporidiální infekce u perlooček dochází v období s nejvyšší denzitou hostitelské populace (Brambilla 1983). V MS Excel jsem zvolila korelační analýzu, pomocí které lze určit lineární závislosti mezi veličinami na základě stanovení Pearsonova korelačního koeficientu. Výsledky byly zobrazeny graficky na bodovém diagramu.

Dále jsem statisticky testovala hypotézu, jestli se signifikantně nelišily podíly jednotlivých životních stádií mezi zdravými a nemocnými perloočkami. Ne/závislost jsem porovnávala pomocí kontingenční tabulky (chí-kvadrát testem) v MS Excel a výsledky znázornila graficky. Hladina významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$.

3. 4. LABORATORNÍ POKUSY S PŘENOSEM INFEKCE

V laboratorních podmínkách jsem v letech 2015 a 2016 provedla tři pilotní pokusy s nakažením klonálních kultur hostitele spory mikrosporidií. Pro přenos infekce jsem potřebovala mikrosporidiální spory, které jsem vyzolovala z nakažených perlooček, anebo přímo nakažené dospělé perloočky. Spory jsem získala z čerstvě odebraných vzorků z terénu v období výskytu infekce začátkem května. Živé perloočky jsem pod stereomikroskopem zanalyzovala a vytřídila jsem ty, u kterých jsem vizuálně určila infekci. Pro potvrzení jsem ještě náhodným výběrem několik z nich rozmáčkla podložním sklíčkem, abych mohla zkontrolovat, zda ložiska infekce skutečně obsahují mikrosporidiální spory, tyto spory jsem dále využila jako zdroj infekce při krmení perlooček. V roce 2015 jsem provedla dvě série pokusů s přenosem infekce způsobené mikrosporidií „HVV“. V roce 2016 s přenosem infekce „HVV“ (jen 12 jedinců, vždy po třech v každé sadě), doplněné a *Berwaldia singularis*, u které jsem testovala jen horizontální přenos, neboť jsem mezi získanými jedinci nenašla jedinou dospělou samici s embryi či efípiem.

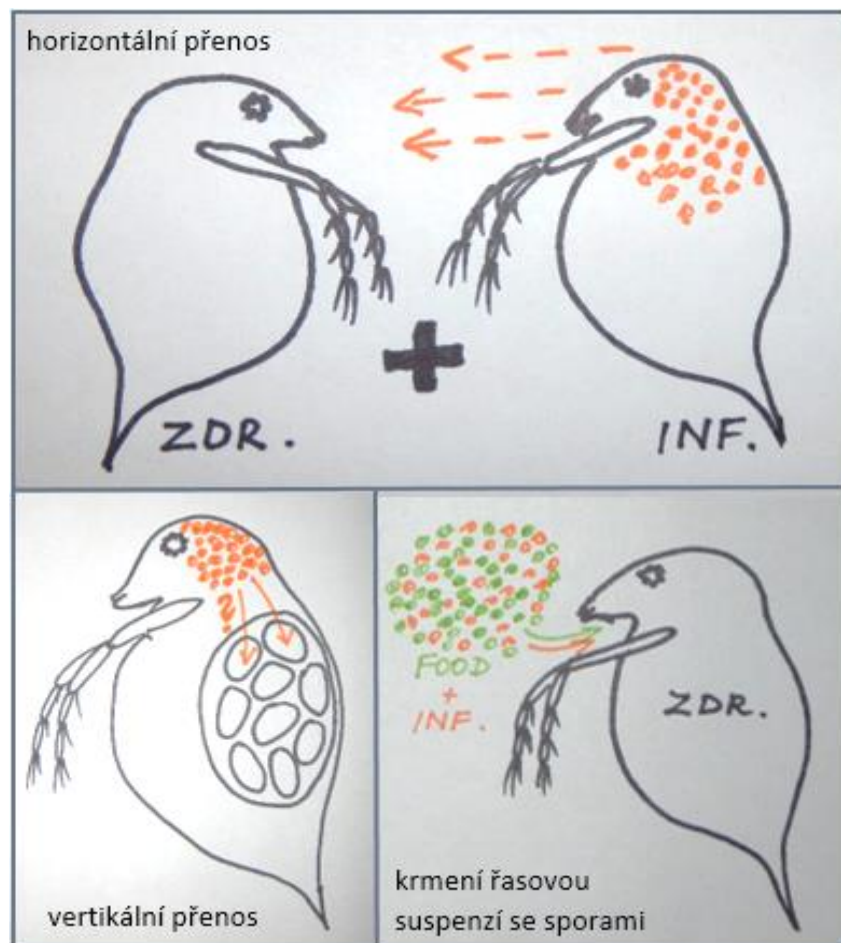
Pro pokusy jsem použila čtyři sady kádinek po 10 kusech, do kterých jsem umístila zdravé *D. pulex* z chovu a nakažené z tůně v těchto variantách (obr.8):

- 1. sada – 10 kádinek, po 2 zdravých (z laboratorního chovu) a 2 nakažených perlooček v každé kádince (pro testování možného horizontálního přenosu z nakažených jedinců)

- 2. sada – 10 kádinek, po 2 zdravých perloočkách v každé kádince krmené směsí řas a mikrosporidiálních spor (pro testování horizontálního přenosu a infekčnosti spor)
- 3. sada – 10 kádinek, po 2 nakažených perloočkách s embryi (pro testování vertikálního přenosu z nakažených samic na potomky)
- 4. sada – 10 kádinek, po 2 zdravých perloočkách (kontrolní skupina)

Doba trvání pokusů byla přibližně jeden měsíc, během něhož jsem perloočky 1–2x týdně krmila *ad libitum* řasovou suspenzí *Monoraphidium* sp., podle potřeby doplňovala vodu a pozorovala jejich chování a případnou přítomnost infekce pod stereomikroskopem. Po ukončení pokusu jsem pod bočním světlem stereomikroskopu zkontrolovala přítomnost infekce. Pro jistotu jsem později perloočky rozmáčkla podložním sklíčkem, aby se vylil kompletní obsah jejich tělních buněk.

Obr. 8 Ilustrační obrázek pokusů s mikrosporidiálními přenosy



3. 5. AMPLIFIKACE MIKROSPORIDIÁLNÍ DNA POMOCÍ PCR

Pro detekci mikrosporidiální DNA v perloočkách a bezobratlého zooplanktonu a bentosu z tůně jsem použila k amplifikaci genů 16S malé podjednotky rRNA párové mikrosporidiální primery pomocí PCR. Pod mikroskopem jsem ze vzorků z odběrových termínů s nejvyšší prevalencí, které byly nafxovány etanolem, vybrala zdravé a nakažené perloočky. Pod bočním světlem stereomikroskopu na tmavém podkladu jsem vizuálně určila mikrosporidiální infekci.

Vybrala jsem perloočky, které byly infikované převážně mikrosporidii "HVH", neboť na lokalitě v sezónách 2014 a 2015 dominovala, a infikované mikrosporidii *Berwaldia singularis* ze sezóny 2016. Ze dvou termínů jsem odebrala zdravé perloočky pro negativní kontroly. Absolutní jistotu v určení nákazy jsem získala až po rozmáčknutí perloočky a vylití spor. Podle příznaků nákazy jsem mohla jen předpokládat určitý druh mikrosporidie.

Mezi zástupci bezobratlých jsem pro amplifikaci mikrosporidiální DNA vybrala koretry, larvy i pupy komárů a pakomárů, larvy pakomárců, naidek a žížalice, larvy jepice a larvy potápníka.

3. 5. 1. Izolace DNA

DNA perlooček jsem připravovala rozpuštěním v roztoku proteinázy K standardní metodikou (Schwenk et al. 1998). Vybrané perloočky jsem nejprve osušila filtračním papírem a vymáchala v kapce deionizované vody, abych se zbavila co největšího množství etanolu. Odtud jsem jednu perloočku přenesla do své mikrozkušavky s 200 µl roztokem enzymu proteinázy K. Mikrozkušavky jsem inkubovala ve vodní lázni o teplotě 56 °C po dobu minimálně 4 hodin. Nakonec jsem zbylou proteinázu denaturovala krátkým zahřátím (min. 10 min) na teplotu 98 °C.

DNA bezobratlých jsem izolovala pomocí Genomic DNA MiniKit (Tissue) od firmy GeneAid. Postupovala jsem dle předepsaného protokolu:

1. Disociace tkáně – celé tělo nebo přibližně půlcentimetrovou část bezobratlého jsem vložila do 1,5ml mikrozkušavky a drtítkem rozměnila. Přidala jsem 200 µl GT pufru a roztok zhomogenizovala. Nakonec jsem přidala 20 µl proteinázy K, zamíchala na třepáčce (vortexu) a nechala inkubovat na 60 °C po dobu 30 minut. Během inkubace jsem mikrozkušavky protřepávala každých 5 minut.

2. Lyze – Ke vzorkům jsem přidala 200 µl GBT pufru, zamíchala a inkubovala na 60 °C po dobu 20 minut. Během inkubace jsem opět mikrozkušavky protřepávala každých 5 minut.

3. DNA binding – Přidala jsem 200 µl 99 % ethanolu a okamžitě protřepávala po dobu 10 sekund. Sedimentační kolonku jsem vložila do 2ml sběrné zkumavky a za účelem přefiltrování do sběrací zkumavky jsem vzorky po dobu 2 minut centrifugovala při maximální rychlosti (14 000 × g). Sedimentační kolonku jsem přemístila do nové 2ml sběrné zkumavky.

4. Přečištění – Přidala jsem 400 µl Wash 1 pufru a centrifugovala po dobu 30 sekund na max. 14 000 × g. Ze sedimentační kolonky jsem protečený roztok vylila a kolonku vrátila zpět do sběrné zkumavky. Poté jsem přidala 600 µl Wash 2 pufru (s přidaným etanolem) na sedimentační kolonku. Po dobu 30 sekund jsem vzorky centrifugovala při maximální rychlosti. Opakovala jsem vylití protečeného roztoku, kolonku vrátila zpět do sběrné zkumavky a opět centrifugovala při maximální rychlosti po dobu 3 minut.

5. Vymývání – Sběrnou zkumavku s protečeným roztokem jsem vyhodila a sedimentační kolonku jsem vložila do 1,5ml mikrozukavky. Přidala jsem 100 µl přehřátého vymývacího (elučního) pufru do středu sedimentační kolonky a inkubovala po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Na závěr jsem pufr s uvolněnou DNA stočila do sběrné mikrozukavky v centrifuze při maximální rychlosti po dobu 1 minuty.

3. 5. 2. PCR

PCR je enormně citlivá metoda, kdy během procesu může být amplifikováno i malé množství kontaminující DNA (Mulis 1990). Vzhledem k možným falešně pozitivním výsledkům, které mohly nastat kdykoliv během přípravy DNA izolátu a přípravě reakční směsi pro PCR, bylo nutné provádět kontroly – negativní vzorek bez DNA izolátu. Jako další kontroly bez přítomnosti DNA mikrosporidie sloužily nenakažená perloočka, DNA izolát blešivce komplexu *Gammarus fossarum* nebo DNA izolát z hlemýždě zahradního ze sbírek mých kolegů v laboratoři.

Nejprve jsem se snažila o optimalizaci protokolu PCR a jako první jsem amplifikovala mitochondriální gen hostitelských perlooček, abych zjistila, zdalyby vzorky vhodně zafixovány (DNA je nedegradována) a funguje izolaceDNA i následný proces PCR. Použila jsem primerový pár vyvinutý pro rod *Daphnia*, který amplifikuje 12S rRNA, a to 12S-F 5' ATG CAC TTT CCA GTA CAT CTA C 3' a 12S-R 5' AAA TCG TGC CAG CCG TCG C 3'. Jako pozitivní

kontrola posloužil izolát DNA z blešivce HUN14A ze sbírky Denise Copilașe. Pro přípravu PCR produktu o celkovém objemu 12 μ l jsem potřebovala 1,5 μ l DNA izolátu. Pro proces PCR jsem použila přístroj Cycler Bio-Rad a zvolila na něm program 12S (viz Příloha VII).

Pro další kontrolu DNA izolátu vodních bezobratlých, jsem použila mitochondriální cytochrom oxidázové CO-1 primerové páry (dle Folmer et al. 1994): LCO1490: 5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' a HC02198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'. Jednalo se o fragmenty dlouhé 710 bp. Celkový objem vzorku měl 25 μ l, s objemem 2 μ l DNA izolátu, nejprve jsem použila CO-I primery o koncentraci 0,35 μ M a pufr $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$, ale proces PCR nevyšel. Na doporučení Ondřeje Korábka, kolegy z laboratoře, jsem snížila koncentraci primerů o polovinu a vyměnila pufr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ za KCl, poté už byl proces PCR úspěšný (viz Příloha VII).

Všechny DNA izoláty perlooček i bezobratlých jsem podrobila amplifikaci DNA mikrosporidií pomocí obecných primerů, které amplifikují geny 16S malé podjednotky rRNA, u nichž jsme předpokládali, že jsou specifické pro mikrosporidie, ale neamplifikují DNA hostitele (dle Weigl et al. 2012). Jednalo se o 16SMicGen_361F 5' CTG GTG CCA GCA GCC GCG GTA AT 3' a 16SMicGen_869R 5' TTK TCC CGC GTT GAG TCA AAT TAA 3' o délce 438–494 bp, pro tento pár primerů budu následně používat označení „16SMic“. PCR produkt jsem připravila o celkovém objemu 25 μ l s 2 μ l DNA izolátu (viz Příloha VII). Celkem jsem amplifikovala 64 nakažených perlooček, 16 zdravých perlooček a 120 bezobratlých. Výsledky amplifikace DNA mikrosporidií, obzvláště u PCR produktů s bezobratlými, nebyly uspokojivé (viz kap. 3.4.).

Proto jsem na základě výsledků amplifikace 16SMicprimery (dle Weigl et al. 2012) jsem zopakovala amplifikaci mikrosporidiální DNA pomocí mikrosporidiálních primerů V1 5' CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA C 3' a uni-3R 5' ATT ACC GCG GMT GCT GGC AC 3' o délce 450 bp, které amplifikují geny 16S malé podjednotky rRNA (dle Grabner 2017). Pro celkový objem 25 μ l jsem použila 1,5 μ l izolátu DNA (viz Příloha VII).

Výsledná délka DNA fragmentů byla analyzována gelovou elektroforézou (1,5% gel s pufrém TBE 1x, obarvený ethidium bromidem, jako DNA marker byl použit 100 bp DNA ladder Thermo Scientific, napětí 500V, doba 23-30 min a zobrazení pomocí UV světla o vlnové délce 312 nm).

3. 5. 3. Purifikace PCR produktu

Pro purifikaci DNA byly vybrány PCR vzorky amplifikované mikrosporidiálními primery 16SMic a V1/Uni-3R, které se na gelové elektroforéze zobrazily čistými, konkrétními proužky. Postup purifikace PCR produktu pro sekvenaci byl následovný:

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo k 25 μ l PCR produktu přidáno 75 μ l deionizované vody a roztok promíchán napipetováním tam a zpátky asi 10 x. Poté byl přidán roztok octanu sodného o objemu 10 μ l, po promíchání bylo přidáno 200 μ l vychlazeného 99% etanolu. Roztok byl zhomogenizován zatřepáním a sražená DNA následně zcentrifugována po dobu 10 minut při maximální rychlosti (14 000 \times g). Při manipulaci se vzorky bylo nutné jednat opatrně, aby se nepromíchala sedimentovaná DNA. Takto se mohlo opatrně odebrat od vrchní blanky přibližně 300 μ l roztoku, čímž se odstranilo asi 90 % roztoku.

K sedimentované DNA bylo dále přidáno 100 μ l vychlazeného 75% etanolu pro promytí peletu. Roztok byl opět zhomogenizován zatřepáním a sražená DNA následně zcentrifugována po dobu 10 minut při maximální rychlosti (14 000 \times g). Z mikrozkušavky bylo stejným způsobem opatrně odebráno asi 100 μ l roztoku. Otevřené mikrozkušavky byly vloženy do ohřívače nastaveného na teplotu 40 $^{\circ}$ C na přibližně 3 hodiny pro odpaření zbývajících etanolu a vody. Na závěr byl pelet DNA rozpuštěn ve 20 μ l deionizované vody.

PCR produkty jsem prohlédla v širokospektrálním spektrofotometru Nanodrop ND-1000 v modulu Nucleic Acid. Z PCR produktů jsem vybrala ty, které měly naměřené hodnoty koncentrace vyšší než 10 ng/ μ l. Podle sekvenačního protokolu jsem namíchala vzorky na sekvenační reakci o určitém objemu PCR produktu s 0,5 μ l reverzního primeru, doplněné deionizovanou vodou do objemu 8 μ l. PCR produkty jsem odeslala na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA, Core facility- Genomika, PŘF UK, BIOCEV ve Vestci (viz Příloha VIII).

3. 5. 4. Analýza sekvenačních dat

Sekvence očištěné od sekvencí primerů a případných nečitelných oblastí v programu Chromas byly porovnány se záznamy v GenBank v programu Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Tento program porovnává shodu mezi sekvencemi nukleotidů (nebo proteinů) se sekvenčními databázemi a vypočítává statistickou významnost.

Pro zjištění příbuznosti a fylogenetické pozice se zkonstruoval fylogenetický strom s použitím stejných sekvencí jako v práci Weigl et al. (2012). Nově vytvořený fylogenetický strom zahrnuje identické sekvence mikrosporidiálních parazitů perlooček r. *Daphnia* a blízké příbuzných mikrosporidií napadajících ostatní druhy, ke kterým byly přidány dvě nové

sekvence nakažených perlooček z Bělče a sekvence *Agglomerata cladocera* (Sokolova et al. 2016).

Sekvence byly „alignovány“ algoritmem MUSCLE, špatně „alignované“ oblasti s větším množstvím insercí a delecí byly odstraněny v programu Gblocks 0.91 s použitím méně přísných nastavení, což vedlo k vytvoření výsledného elimentu dlouhého 404 bp (délkou srovnatelný s Weigl et al. 2012 – 406 bp). Vztahy mezi jednotlivými taxony byly odvozeny pomocí metody maximální věrohodnosti modelem evoluce GTR+G, který byl vybrán pomocí Bayesovského informačního kritéria, v programu MEGA7. Podpora větví ve výsledném stromu byla odhadnuta pomocí neparametrického „bootstrappingu“ na 100 opakování s hodnotou podpory nad 50 %.

VÝSLEDKY

SEZÓNŇÍ DYNAMIKA POPULACE PERLOOČEK A VODNÍCH BEZOBRATLÝCH

V sezóně 2014 se zkoumané perloočky *Daphnia pulex* na lokalitě začínaly objevovat koncem března, výrazný vzestup populace nastal přibližně v polovině dubna. Maximální denzity dosáhla populace perlooček *D. pulex* na konci května, tj. okolo odběru 30. května. Efipiální samice se objevovaly v nízkém počtu v průběhu celé sezóny, jejich maximální výskyt jsem zaznamenala v polovině května. Juvenilové se nacházeli ve všech odběrových termínech, k prvnímu výraznému populačnímu vzrůstu došlo 15. dubna a k dalšímu 30. května. Zastoupení juvenilů bylo početnější na mělčině než v hlubší části. Samci perlooček se sporadicky vyskytovali od 15. dubna, ale jejich počet více než 10x stoupl v polovině května. Výrazný propad populace perlooček nastal 30. dubna a velikost populace prudce poklesla v průběhu července (viz Příloha VI).

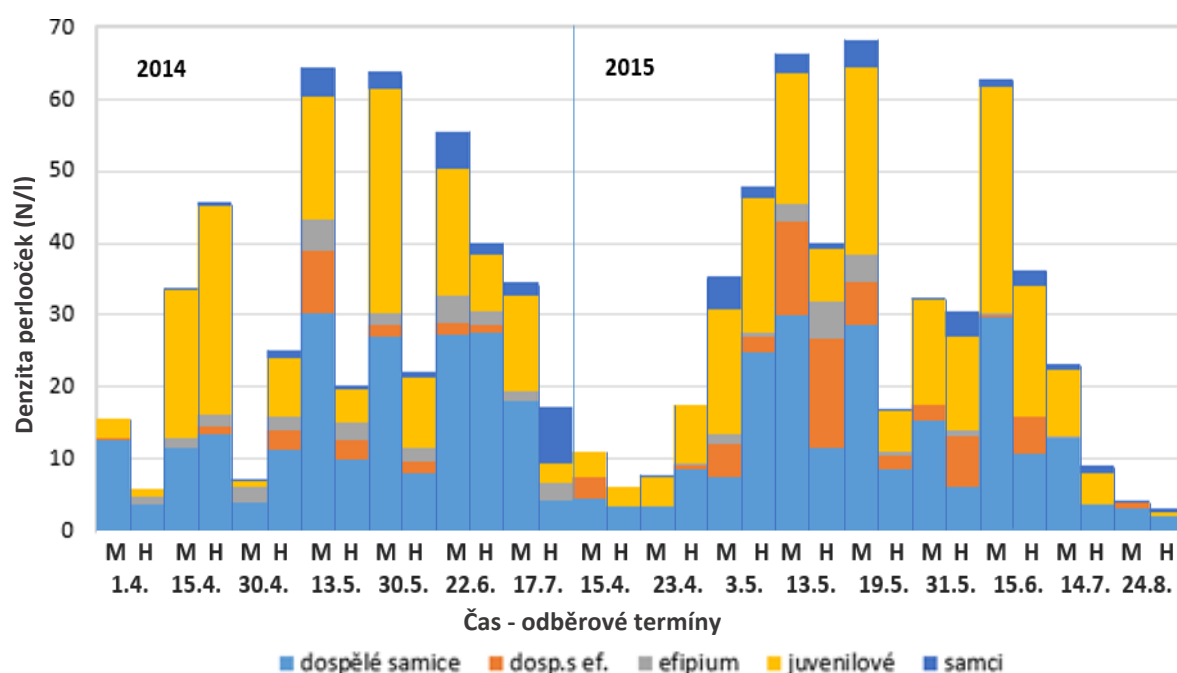
V laboratoři se mi podařilo určit do druhu tyto živočichy, které se na lokalitě nacházely (příloha): kromě perlooček *Daphnia pulex* také *Simocephalus vetulus*, který se na lokalitě začal vyskytovat v průběhu léta. Čočkovec *Chydorus sphaericus* se na lokalitě vyskytoval celou sezónu, největší velikosti jeho populace dosahovala na přelomu května a června. Buchanky *Diacyclops bicuspidatus* se na lokalitě vyskytovaly po celou sezónu, nejpočetnější byla jejich populace na začátku jara. Larvy dvoukřídlého hmyzu se v tůni vyskytovaly především v dubnu, kromě koreter jsem už v květnu larvy dvoukřídlého hmyzu v odebraných vzorcích nepozorovala. Dále jsem mezi bezobratlými pozorovala pijavku *Dina lineata*, larvu potápníka rýhovaného *Acilius sulcatus*, bruslařku *Gerris lacustris*, a bahnivka *Bithynia tentaculata*, larvy jepic, zástupce nitěnek, žížalic a efipia zvržená ze dna tůně.

V sezóně 2015 se perloočky na lokalitě začínaly objevovat začátkem dubna. Efipiální samice se nacházely v tůni po celou sezónu, samci až od 23. dubna, výskyt juvenilů byl podobný jako v r. 2014. Maximálních hodnot dosáhla populace v polovině května. 31.5. došlo k populačnímu propadu a populace perlooček vymizela koncem srpna. Oproti r. 2014 byla denzita perlooček r. 2015 vyšší (obr. 9)

Výskyt dalších zástupců zooplanktonu buchanek Cyclopoida a čočkovců Chydoridae byl obdobný jako v předchozí sezóně, jen byly jejich populace početnější. Larvy dvoukřídlého hmyzu jsem v odebraných vzorcích pozorovala do 3.5., koretry se objevily ještě v červenci a

srpnu, komáří larvy v srpnu. Příležitostně jsem v odběrech nacházela larvy potápníka, jepic. Zástupci nitěnkovitých a efipia zvířená ze dna se vyskytovaly průběžně po celou sezónu (viz Příloha).

Obr. 9. Histogram sezónní dynamiky perlooček v sezónách 2014 a 2015. Perlooček jsou rozděleny do 5 kategorií: dospělé samice, dospělé samice s efípiem (zkratka dosp. s ef.), plovoucí efípia, juvenilové a samci. Na ose x jsou znázorněna odběrové termíny s místem odběru M – mělčina, H – hlubší část, na ose y je znázorněna denzita perlooček (v počtu jedinců na litr).



PREVALENCE MIKROSPORIDIÁLNÍ INFEKCE

Infikované perloočky se v sezóně 2014 začínaly na lokalitě objevovat začátkem května a mizí v průběhu července. Perloočky nakažené mikrosporidii byly nalezeny pouze ve vzorcích pořízených v termínech 13. 5., 30. 5. a 22. 6. U mnou zkoumaných jedinců se jednalo se výhradně o mikrosporidii „HVV“, přítomnost *B. singularis* v těchto vzorcích jsem nepozorovala. Hodnoty prevalence v období, kdy jsem detekovala mikrosporidiální infekci, se pohybovaly od minimálních 2 % po maximálních 18 % z termínu 22.6. (tab. 1). Nejvíce nakažených perlooček se nachází v kategorii „dospělé samice“ z 13.5. z hlubší části (max.

počet 90 z celkového počtu 2635 jedinců, dílčí prevalence pro tuto kategorii je 3,4%), nakažení v ostatních kategoriích se pohybují vyrovnaně v průběhu sezóny v hodnotách jednotek.

Tab. 1. Hodnoty prevalence mikrosporidiální infekce pro sezónu 2014

Prevalence infekce 2014	mělčina (v %)	hlubší část (v %)
13. 5. 2014	2,6	4,0
30. 5. 2014	4,8	1,9
22. 6. 2014	18,0	11,5

Z odběrů předchozí sezóny 2014 jsem již měla vytvořený odhad přítomnosti infekce, a proto jsem ji mohla lépe kontrolovat a zintenzivnět terénní odběry v době propuknutí infekce v sezóně 2015. Perloočky nakažené mikrosporidii „HVH“ byly nalezeny v pěti terénních odběrech, a to v termínech 3. 5., 13. 5., 19. 5., 31. 5. a 15. 6. Nákaza mikrosporidií *B. singularis* byla nalezena jen v termínech 13. 5. v počtu 15 perlooček nakažených vůči 185 nakaženým mikrosporidiím „HVH“ z celkový počtu 11994 perlooček) a 19. 5. v počtu 9 nakažených perlooček *B. singularis* vůči 89 nakažených mikrosporidiím „HVH“ z celkového počtu 1533 perlooček. Hodnoty prevalence v období, kdy jsem detekovala mikrosporidiální infekci, se pohybovaly od minimálních 0,05 % po maximálních 6 %, které byly dosaženy 31. 5. (tab. 2).

Tab. 2. Hodnoty prevalence mikrosporidiální infekce pro sezónu 2015

Prevalence infekce 2015	Infekce mělčina (v %)	Infekce hlubší část (v %)
3. 5. 2015	0	0,05
13. 5. 2015	1,4	2,1
19. 5. 2015	4,9	1,8
31. 5. 2015	6,0	0,5
15. 6. 2015	0,1	0,9

V roce 2016 jsem provedla odběry jen ve třech termínech, a to 9.5.2016, 22.5.2016 a 22.6.2016, kdy jsem kvůli nízkému stavu hladiny mohla odebrat jen jeden vzorek. Pozorováním pod stereomikroskopem jsem zjistila, že ve všech vzorcích se hojně nachází *B. singularis*, oproti mikrosporidii HVH je přítomná až 4 x více, např. v termínu 9.5.2015 z 323 nakažených perlooček, bylo 275 nakažených *B. singularis*. V sezóně 2016 infekce propukla až v 25% prevalenci (tab. 3). Mezi perloočkami nakaženými mikrosporidiím „HVH“ jsem

pozorovala samice s embryi i efipiální samice, zatímco u perlooček nakažených mikrosporidii *Berwaldia singularis* jsem dospělé samice s embryi ani s efípii nepozorovala.

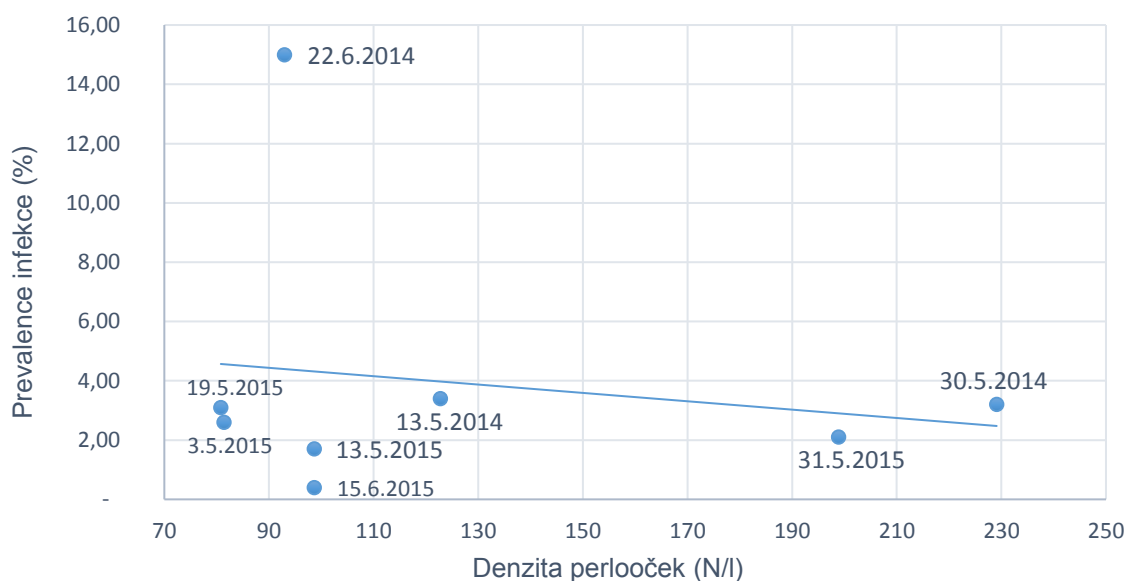
Tab 3. Hodnoty prevalence mikrosporidiální infekce pro sezónu 2016

Prevalence infekce 2016	mělčina (%)	hlubší část (%)
9.5.2016	13,9	6,9
22.5.2016	24,7	12,0
22.6.2016	18,6	

VYHODNOCOVÁNÍ DAT STATISTICKÝMI METODAMI

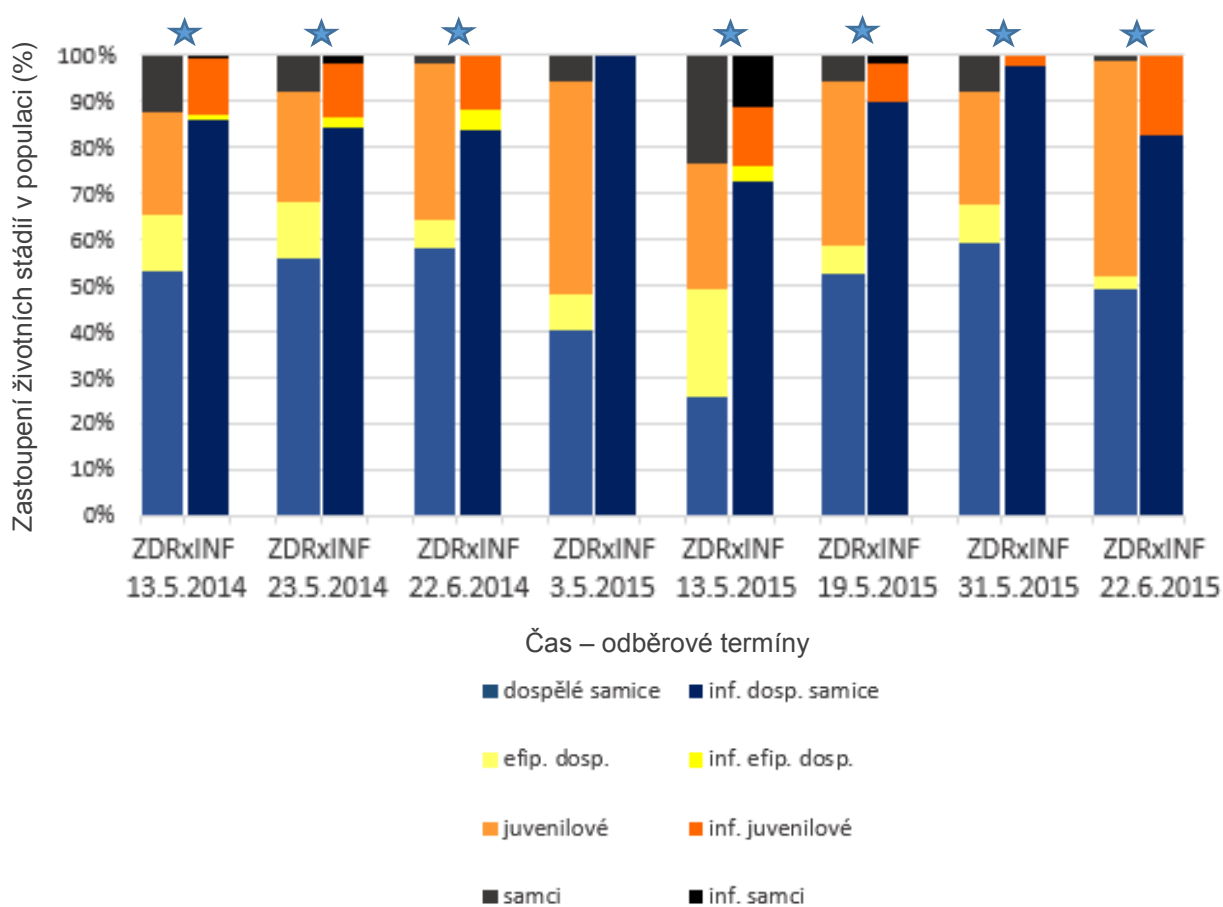
Pomocí Pearsonova korelačního koeficientu jsem testovala, zda míra prevalence ne/závisí na velikosti populace perlooček. Pearsonův korelační koeficient vyšel $\rho = -0,175$ – tyto dva jevy jsou na sobě signifikantně nezávislé (P hodnota = 0,68). Nezávislost těchto dvou jevů na sobě byla očekávána, neboť většina přírodních jevů je charakteristická svou proměnlivostí a ovlivněním mnoha faktory, které nemusejí (a nebyly) do souboru dat zahrnuty, což je patrné u odlehle hodnoty z odběrového data 22. 6. 2014. Výsledky jsem graficky znázornila bodovým diagramem (obr. 10).

Obr. 10 Vztah mezi denzitou hostitelských perlooček a prevalencí infekce mikrosporidii HVH z osmi odběrových termínů v sezónách 2014 a 2015.



Dále jsem statisticky testovala, jestli se signifikantně neliší podíly jednotlivých životních stádií mezi zdravými a nemocnými perloočkami. Ne/závislost jsem porovnávala pomocí kontingenční tabulky (chí-kvadrát testem). Z výsledků vyplývá, že se podíly jednotlivých životních stádií mezi zdravými a nemocnými signifikantně lišily, což je dobře patrné i ze sloupcového grafu, kde jsou vedle sebe porovnány obě skupiny (obr. 11). Nejnakaženější kategorií jsou dospělé samice, které v 10-násobných hodnotách převyšují ostatní kategorie. Nepozorovala jsem u samice s efiíí nákazu mikrosporidii *B. singularis*, pouze nákazu mikrosporidií „HVH“. Výjimku tvoří hodnoty z odběrového data 3.5.2015, které nemělo smysl testovat, neboť se zde vyskytovaly pouze 3 nemocné perloočky z kategorie dospělé samice na celkový počet 11 373 perlooček.

Obr. 11. Porovnání podílů jednotlivých životních stádií zdravých a nemocných perlooček. Hvězdičkou * jsou označené signifikantní rozdíly mezi životními stádii u jednotlivých odběrových dat. Zkratka „ZDR“ znamená zdravá životní stádía, „INF“ znamená infikovaná životní stádía.



VÝSLEDKY LABORATORNÍCH POKUSŮ S PŘENOSEM INFEKCE

Mikrosporidiální spory byly přítomny pouze ve střevech u sady dospělých perlooček, které byly krmené suspenzí zelených řas a mikrosporidiálních spor. Tyto perloočky byly testované na horizontální přenos nákazy a míru virulence spor. V tomto případě nelze předpokládat přenos infekce, neboť u perlooček nepropukla mikrosporidiální nákaza (nepozorovala jsem příznaky infekce) a všechny spory byly posléze vyloučeny zaživacím traktem. Ani v dalších sadách perlooček či sériích pokusů jsem nepozorovala příznaky mikrosporidiální infekce.

AMPLIFIKACE DNA MIKROSPORIDIÍ

Testy s amplifikací DNA nakažených perlooček s použitím 12S primerů proběhl úspěšně. Testování amplifikace DNA bezobratlých pomocí CO-I primerů proběhlo úspěšně až po úpravě koncentrací primerů na polovinu a změny pufru (viz Příloha VII). Všechny PCR produkty perlooček a bezobratlých byly finálně amplifikovány mikrosporidiálními primery 16SMic a V1/uni-3R.

Amplifikace DNA mikrosporidií pomocí mikrosporidiálních primerů 16SMic dle Weigl et al. 2012

Nejprve jsem porovnávala zdravé perloočky s nakaženými pomocí obecných mikrosporidiálních primerů. Ukázalo se, že 16SMic primery jsou vhodné pro amplifikaci DNA mikrosporidií v hostitelských perloočkách. S PCR produkty, z DNA izolátu bezobratlých, nastaly potíže, které jsem ale identifikovala až po osekvenování, protože se amplifikovala DNA hostitelů (viz Příloha VIII).

Při opakování PCR se mi stávalo, že se jeden a ten samý PCR produkt zobrazil na gelové elektroforéze jiným výsledkem. Mohlo se jednat o chybu v přípravě PCR produktu, kontaminaci cizí DNA, nebo kontaminací chemikálií používaných pro přípravu PCR produktu a další.

Při kontrole PCR se na gelu agarózové elektroforézy zobrazily produkty viditelnými proužky na různých úrovních: na 150 bp se osekvenovaly pravděpodobně bakteriální DNA, na úrovni od 300-400 bp se osekvenovaly mikrosporidiální DNA, ale osekvenovala se i bakteriální DNA. Od této úrovně výše, především okolo 600 bp se osekvenovaly DNA hostitelů (viz obr. VIII-1, Příloha VIII).

U čtyřech PCR produktů s DNA izoláty perlooček se amplifikovaly geny pro 16S rRNA mikrosporidií a u dvou se amplifikovaly geny pro SSU rRNA.

U dvaceti PCR produktů s DNA izoláty bezobratlých se amplifikovaly geny pro 18S rRNA hostitelů, u dvou se amplifikovaly geny pro SSU rRNA a a po jednom gen pro 16S rRNA.

Amplifikace DNA mikrosporidií pomocí mikrosporidiálních primerů V1 a uni-3R dle Grabner 2017

Jelikož se ukázalo, že 16SMic primery nejsou dostatečně specifické pro mikrosporidie, byla potřeba aplikovat DNA mikrosporidií pomocí jiných mikrosporidiálních primerů V1 a uni-3R (tab. 6, příloha). Počet proužků, které se zobrazily na gelu, byl výrazně menší než v případě ampliface pomocí 16SMic primerů (příloha 10)

U jednoho PCR produktu DNA izolátu perloočky se amplifikovaly geny pro SSU v případě PCR produktů DNA izolátu bezobratlých se u třech amplifikovaly geny pro SSU a u jednoho gen pro 16S rRNA.

VÝSLEDKY SEKVENACE

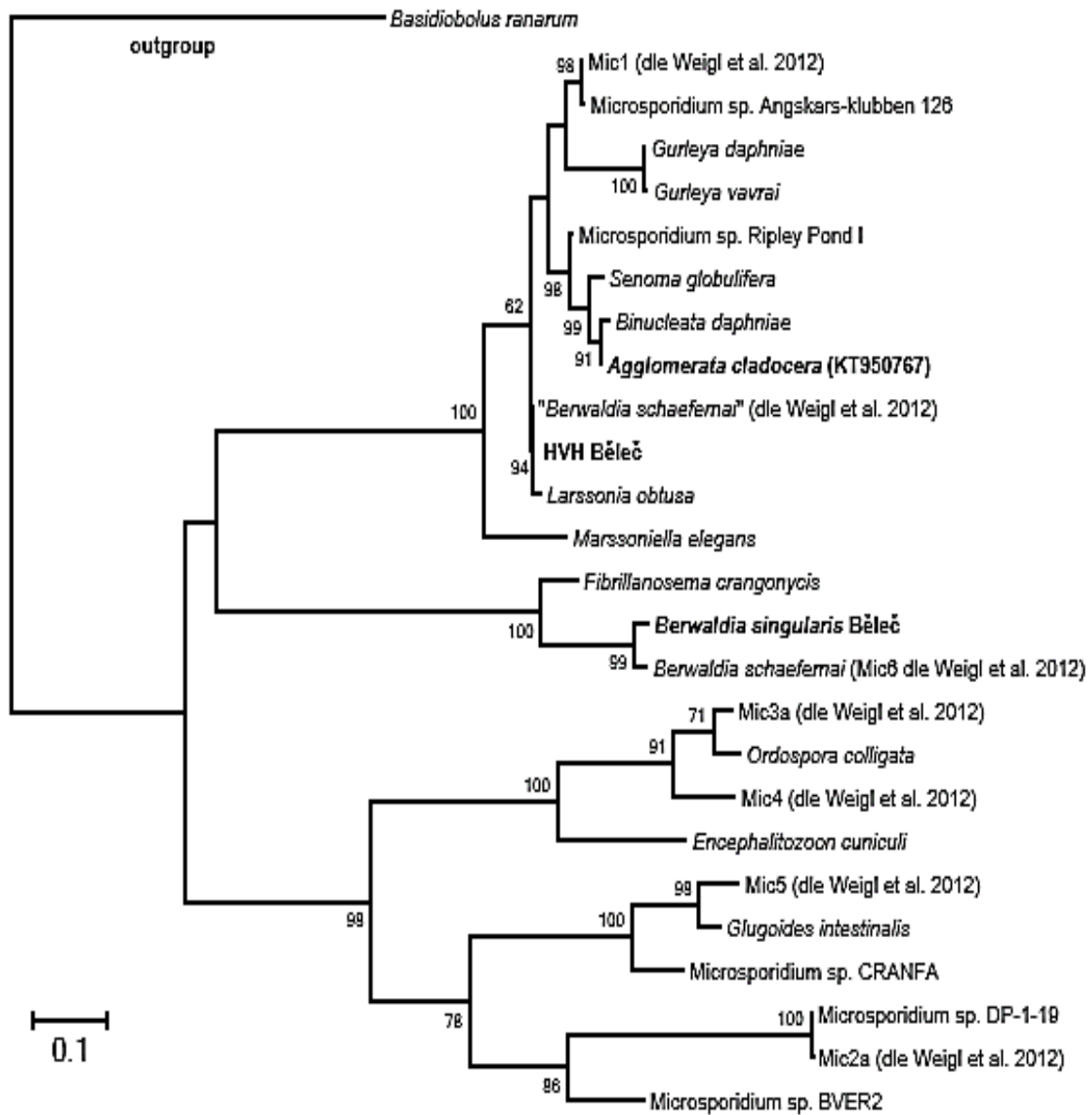
Fylogenetický strom

Nově vytvořený fylogenetický strom (s použitím stejných sekvencí jako u Weigl et al. 2016) zahrnuje sekvence mikrosporidiálních parazitů perlooček r. *Daphnia* a blízkce příbuzných mikrosporidií napadajících ostatní druhy, ke kterým byly přidány dvě nové sekvence nakažených perlooček z Bělče – *Berwaldia singularis* a „HVH“ a sekvence *Agglomerata cladocera* (Sokolova et al. 2016).

Po zařazení fragmentů sekvencí třech mikrosporidií do fylogenetického stromu (obr. 9) jsem zjistila, že mikrosporidiální sekvence, kterou jsem získala z perloočky nakažené *Berwaldia singularis*, je sesterská k sekvenci Mic-6 (dle Weigl et al. 2012), ve skutečnosti se jedná o sekvenci skutečné *Berwaldia schaefernai* (dle ústního sdělení prof. Vávry).

Mikrosporidiální sekvence „HVH“ je identická se sekvencí „*Berwaldia schaefernai*“, tj. *Berwaldia* sp. JWW 2009a (Wolinska et al. 2009) a sestersky příbuzná s *Larssonia obtusa* (Refardt et al. 2002). Původní předpoklady příbuznosti na základě morfologických podobností „HVH“ a *Agglomerata cladocera* (KT950767) se nepotvrdily, neboť *A. cladocera* patří do jiného kladu, než ve kterém se nachází *Berwaldia schaefernai*.

Obr. 9 Phylogenetický strom. na základě identických sekvencí s Weigl et al. 2012



Po osekvenování fragmentů PCR produktů, jež jsem amplifikovala 16SMic primery, jsem získala sekvence fragmentů identické se sekvencí *Berwaldia* sp. JJW-2009a (dle Wolinska et al. 2009, Weigl et al. 2012). Tyto PCR produkty byly připravené z DNA izolátů perlooček, u kterých jsem pod stereomikroskopem určila infekci mikrosporidií „HVH“ (viz Příloha IX)

U dvou perlooček, u kterých jsem pod stereomikroskopem určila infekci mikrosporidií *Berwaldia singularis*, byla osekvenována na fragmentu dlouhém 378 bp sekvence *Berwaldia singularis*, která je na 96,8% identická sMic6. Mic6 je pravá *Berwaldia schaefernai* (ústní sdělení prof. Vávry), která se nachází, byť relativně vzácně, také v přehradních nádržích (Weigl et al. 2012).

U dvou PCR produktů s DNA izoláty z bezobratlých, amplifikovaných 16SMic primery, se mi, i přes problémy s amplifikací DNA hostitelů, podařilo osekvenovat dvě mikrosporidiální sekvence. A to u PCR produktu „421“ s DNA izolátem larvy pakomára se na fragmentu dlouhém 374 bp osekvenovala identická sekvence s *Berwaldia* sp. JJW-2009a. U PCR produktu „503“ s DNA izolátem larvy komára se osekvenovala mikrosporidie, která je na 307 bp dlouhém fragmentu na 96,8% identická s *Hazardia milleri*, což je mikrosporidie specializovaná na komáry (Vossbrinck et al. 2004, 2005). Sekvence ostatních PCR produktů ukázaly, že došlo k amplifikaci SSU (v tomto případě 18S) bezobratlých – nejpodobnější byly sekvence zástupců příslušných čeledí: Culicidae, Chironomidae, Dytiscidae aj. (viz Příloha X Tab. X - 1)

U jednoho PCR produktu s DNA izolátem z perloočky, kterou jsem označila jako nakaženou „HVH“ a amplifikovala primery V1/uni-3R, se podařilo osekvenovat na fragmentu dlouhém 330 bp mikrosporidiální sekvenci identickou s „*Berwaldia schaefernai*“.

U PCR produktu „420“ s DNA izolátem zlarvy komára byla na fragmentu dlouhém 301 bp osekvenována identická sekvence se sekvencí „*Berwaldia schaefernai*“. U PCR produktu „421“ s DNA izolátem z larvy byla osekvenována rovněž, U PCR produktu „520“ a „521“ s DNA izoláty z larev pakomárů byly na fragmentu dlouhém 307 bp osekvenovány sekvence na 96% identické se sekvencí *Hazardia milleri*.

DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem se zabývala vztahy mezi mikrosporidiálními parazity a jejich hostiteli *Daphnia pulex* v prostředí lesní tůně, která byla inspirována studii na mikrosporidiích a druhovém komplexu *Daphnia longispina* v přehradách před několika lety na katedře (Stodola 2013, Hubová 2015) ve spolupráci s prof. Wolinskou (Wolinska et al. 2009a, 2009b, 2011, Weigl et al. 2012, González-Tortuero et al. 2016). Tyto studie se zabývaly populační dynamikou, genetickou strukturou perlooček a vzájemným ovlivňováním jejich parazity, mezi kterými se nacházely i mikrosporidie. Výzkum mikrosporidiích i dalších mikroparazitů je v přehradách složitý. A tak vznikl nápad, aby se vztahy mezi mikrosporidiiemi a jejich hostiteli studovaly v jednodušším prostředí tůně. Dle ústního sdělení prof. Vávry jsem se dozvěděla, že se v lesní tůni v Bělči vyskytuje stejný typ hostitelů jako v přehradách – v tůni perloočky *Daphnia pulex* a v přehradách druhový komplex *Daphnia longispina*, dále u mikrosporidií stejný rod *Berwaldia*, a to v přehradách *Berwaldia schaefernai* a v tůni *Berwaldia singularis*.

Jenomže v průběhu mé diplomové práce jsem se od prof. Vávry dozvěděla o chybě v GenBank. Pod sekvencí SSU údajně z mikrosporidie *Berwaldia schaefernai* (pod přístupovým kódem v GenBank: AY090042, Vossbrinck et al. 2004) nebyla osekvenována *Berwaldia schaefernai*, ale jiná mikrosporidie, prozatím neurčená, která nepatří do r. *Berwaldia*. Abych odlišila skutečnou mikrosporidii *B. schaefernai* (Vávra et al. 1994) a chybně označenou přehradní, budu chybně označenou psát v uvozovkách - „*Berwaldia schaefernai*“, která je téměř identická (rozdíl asi 0,5 %) se sekvencí *Berwaldia* sp. JWW2009a (FJ794857.1, Wolinska et al. 2009a).

Z důvodu záměny těchto dvou mikrosporidií jsem se obávala, že studované přehradní populace jsou výrazně odlišné od populací v tůni v Bělči. Jak to dopadlo, že nakonec mohu své výsledky porovnávat, popisují v následujících odstavcích:

Vůbec prvním svízelem se ukázala amplifikace 16SMic primery (dle Weigl et al. 2012). Přestože jsem perloočky určila pod stereomikroskopem jako nakažené, ne vždy se pomocí těchto primerů podařilo amplifikovat mikrosporidiální DNA. Po opakování PCR stejným způsobem se jeden a ten samý PCR produkt zobrazil na gelové elektroforéze jiným výsledkem. Mohlo se jednat o chybu v přípravě PCR produktu, kontaminaci cizí DNA, nebo kontaminací chemikálií používaných pro přípravu PCR produktu a další. Když jsem eliminovala zmíněné, nakonec se mi podařilo u perlooček úspěšně amplifikovat DNA mikrosporidií.

Ovšem, u PCR produktů z DNA izolátů bezobratlých se ukázalo, že 16S Mic primery nejsou dostatečně specifické pro bezobratlé, neboť použitý primerový pár 16S MIC amplifikoval nejčastěji hostitelskou DNA. Proto jsme zkusili jiný pár mikrosporidiálních primerů V1/uni-3R, použitý na vodní členovce (dle Grabner 2016), který se ukázal jako vhodnější.

Osekvenováním PCR produktů s DNA izoláty z perlooček a larev bezobratlých jsem získala tři referenční mikrosporidiální sekvence, které se shodují se sekvencemi v předcházejících odstavcích (další osekvenované sekvence byly identické s těmito (viz Příloha XI):

1. sekvence *Berwaldia singularis*, která je na 96% identická se sekvencí MIC-6 z přehrad.

2. sekvenci „HVH“, která je kompletně identická se sekvencí *Berwaldia* sp. JWW 2009a.

3. sekvenci, která je na 96,8% identická se sekvencí komářích mikrosporidie *Hazardia milleri*.

Po vytvoření fylogenetického stromu se získanými sekvencemi jsem zjistila, že sekvence *Berwaldia singularis* patří do sestersky příbuzného taxonu se sekvencí *Microsporidium* sp. MIC-6, která by na základě morfologie a fylogeneze mohla být skutečnou *Berwaldia schaefernai* (dle ústního sdělení prof. Vávry). U mikrosporidie pracovně označené jako „HVH“ jsem na začátku mé práce předpokládala, díky její morfologii, zařazení do r. Agglomerata. Při vytváření fylogenetického stromu jsem proto zařadila i sekvenci *Agglomerata cladocera* (Sokolova et al. 2016), protože mě zajímala příbuznost mezi těmito sekvencemi. Ukázalo se ale, že *Agglomerata cladocera* patří do sesterského kladu, ale fylogeneze není dostatečně podpořená, neboť hodnota podpory byla stanovena na 62 %. Osekvenováním „HVH“ jsem zjistila, že je tato sekvence 100% identická se sekvencí *Berwaldia* sp. JWW 2009a a dle jejich zařazení ve fylogenetickém stromu se jedná o totožné mikrosporidie. Obě sekvence spadají do sesterského kladu s mikrosporidii *Larssonina obtusa* s hodnotou podpory 94 %.

Původním záměrem bylo srovnávat mikrosporidie *Berwaldia singularis* z Bělče s „*Berwaldia schaefernai*“ z přehradních nádrží. Skvělým závěrem je, že obě mikrosporidie z Bělče mohou srovnávat s přehradními mikrosporidii – mikrosporidii „HVH“ s *Berwaldia* sp. JWW 2009a a *Berwaldia singularis* s *Microsporidium* sp. MIC-6.

O mikrosporidii „*Berwaldia schaefernai*“, napadající hostitelské perloočky v přehradních nádržích, byla vyslovena hypotéza, že by mohla mít vícehostitelský cyklus a jejím sekundárním hostitelem by mohl být zástupce létajícího hmyzu, který má vodní larvy (Wolinska et al. 2011). I mikrosporidie *Larssonina obtusa*, která je sestersky příbuzná

s „*Berwaldia schaefernai*“, se předpokládá vícehostitelský cyklus (Refardt et al. 2002). Vícehostitelský cyklus u vodních členovců je nejčastěji doložen mezi buchankami a komáry, které jsou napadány mikrosporidii Amblyosporidae (Andreadis 1985, 2005, Micieli et al. 2000, Vossbrinck et al. 2004, 2005). Podle sekvenace SSU rody mikrosporidií *Larssonia*, *Gurleya*, *Trichotuzetia*, *Hazardia* a *Berwaldia* patří do kladu, který je pravděpodobně sesterský čeledí Amblyosporidae (Vossbrinck et al. 2004)

Náznakem pro podpoření této hypotézy je osekvenování DNA mikrosporidie „HVH“, jež se podařilo u larev komárů a pakomárů. Samozřejmě nelze spoléhat na to, že larvy byly nakažené mikrosporidii, mohly se sporami „jen“ nakrmit. Vhodným způsobem, jak to prozkoumat, je odebrat larvy komárů a pakomárů v době, kdy perloočky ještě nejsou nakažené, tedy v březnu a dubnu. Larvy bych pro porovnání odebrala i v květnu, kdy už jsou perloočky nakažené. Pokud by larvy nebyly infikované sporami mikrosporidií, pravděpodobně by v sobě měly spory jen v trávicím traktu. Hypotézu by podpořil nález spor v dospělících (kteří se živí potravou na souši) nebo v kuklách (které nežerou vůbec).

Pro další studium by mohlo být přínosné nastudovat množství poznatků o mikrosporidii v komárech a pakomárech, které povede ke schopnosti pozorovat spory ve všech životních stádiích pakomárů a komárů pod zvětšením světelného mikroskopu a identifikovat druh, typ spor (aby se nejednalo o heterosporii) a příznaky infekce.

Hypotéze s vícehostitelským cyklem nasvědčují také (nejen mé) neúspěchy s přenosem určitých mikrosporidiálních infekcí na hostitelské perloočky v laboratorních podmínkách (Andreadis 1985, Ebert 2005, Refardt et al. 2002, 2008, Wolinska 2011). Negativní výsledky pokusů mi potvrdil i prof. Vávra, který taktéž několikrát provedl přenosy mikrosporidiálních spor z Bělče na perloočky *Daphnia pulex*. Část pozorování pokusu na elektronovém mikroskopu mi následně popsal takto: „*Po nakrmění mladé perloočky D. pulex sporami „HVH“ došlo po dvou hodinách k zaplnění střeva sporami. Z hostitele vychází část spor jen jako prázdné skořápky. V elektronovém mikroskopu jsou vidět sporoplasmy v buňkách střevního epitelu a ojedinele i ve tkáních mimo střevo. Perloočky ale rostou a žijí dál bez příznaků infekce.*“ (2015)

Domnívám se, že k přenosu mikrosporidiální infekce nemuselo dojít z důvodu, že stádium spor vyizolované z nakažených perlooček, není přizpůsobené k další infekci perlooček. Mohu jen diskutovat, co rozhoduje o schopnosti spor infikovat dalšího hostitele. Jestli to jsou vnitřní podmínky v hostiteli, určitý chemický signál, nebo zda spory musí projít další fází životního cyklu zahrnující případně i dalšího hostitele. Bylo by zajímavé provést pokusy s přenosy mikrosporidiálních spor vyizolovaných z larev pakomárů a komárů na perloočky.

Populace hostitelských perlooček se v Bělči vyskytuje přibližně od začátku dubna do září, velikost populace perloočky *Daphnia pulex* dosahuje svého populačního maxima v květnu, velikost populace klesá v průběhu léta a je nahrazena populací perloočky *Simocephalus vetulus* (osobní pozorování). V mnoha eutrofních nádržích mají perloočky dvě populační maxima související se sezónní dynamikou fytoplanktonu – na jaře a v létě (Ebert 2005).

K vrcholu promořenosti populace perlooček mikrosporidiální infekcí dochází v květnu a červnu (vlastní pozorování), k menšímu vrcholu dochází ještě na konci sezóny v průběhu září (osobní pozorování prof. Vávry). V literatuře se s mými pozorováními shodují poznatky o vysokém výskytu prevalence *Binucleata daphniae* na perloočkách *Daphnia magna* v období brzkého léta (např. Refardt 2008), nebo v období na přelomu května a června u mikrosporidie *Thelohania* sp. na perloočkách *Daphnia pulex* (Brambilla 1983).

K výskytu mikrosporidiální infekce u perlooček dochází v období s nejvyšší denzitou hostitelské populace (Brambilla 1983). Rozhodla jsem se statisticky otestovat, zda míra prevalence signifikantně závisí na denzitě hostitelských perlooček. I přes původní předpoklady, jsem signifikantní korelaci závislosti prevalence na velikosti populaci perlooček nepozorovala. Přesto to neznamená, že míra prevalence a velikost denzity nejsou společně ovlivněné určitým faktorem, který není v datech zahrnut (např. fyzikální a chemické faktory, přítomnost predátora, kastrace dospělých samic atp.), čemu by nasvědčovala i odlehlá hodnota odběrového termínu 22.6.2014. Podíly jednotlivých životních stádií zdravých a nakažených perlooček se značně liší, což je patrné např. u nakažených efipiálních samic, jejichž hodnoty výskytu jsou nízké, neboť jsem pozorovala pouze efipiální samice nakažené mikrosporidií „HVH“.

Výskyt mikrosporidií se v období 2014 – 2016 podstatně liší. V sezónách 2014 i 2015 byla na lokalitě přítomná především mikrosporidie označovaná jako „HVH“, nákaza *B. singularis* se vyskytovala zřídka. Hodnoty prevalence jsou nezvykle nízké v sezóně 2015, podle ústního sdělení prof. Vávry byl rok 2015 nejnižší na výskyt mikrosporidiální infekce, co pamatuje. Občasná nízká prevalence je zmiňovaná i v literatuře (Stirnadel et al. 1997, Wolinska et al. 2009a, Yin et al. 2012). Oproti tomu v r. 2016 se v tůni nákaza *B. singularis* vyskytuje hojně. Můžu jen odhadovat, co ovlivnilo výskyt mikrosporidiálních infekcí a hodnoty prevalence, zda to byly vnější či vnitřní faktory, nebo se jednalo o období, kdy se v tůni vyskytovaly hostitelské perloočky, jejichž klony byly vůči parazitovi více rezistentní. Pokud ano, pokles jedné mikrosporidiální infekce a vzestup jiné může být založený na principu negativní frekvenčně závislé selekci (Carius et al. 2001, Wolinska 2009a, Routtu et al. 2015).

Poněkud složitě se na začátku mé diplomové práce jevílo určování mikrosporidiální nákazy. Pozorování nákazy pod přímým světlem světelného mikroskopu se mi jevílo jako nemožné. Podezřelé nakažené perloočky jsem musela rozmačkat na podložním sklíčku, aby se rozlil obsah spor. Občas se mi podařilo mikrosporidiální infekci zaměnit s bakteriální, než jsem měla dostatečně vyzorované, jak vypadá a jak se projevuje mikrosporidiální infekce. Nejvíce se mi osvědčilo pozorování mikrosporidiální nákazy na tmavém pozadí pod stereomikroskopem. V průběhu mé diplomové práce obhájila na katedře Jana Hubová Diplomovou práci na téma Mikroparaziti a plodnost perlooček rodu *Daphnia* na gradientech v korytovitých přehradních nádržích, ve které se podrobně zabývala identifikací mikrosporidiální nákazy v perloočkách. I díky této práci jsem později dokázala určit mikrosporidiální infekci i bez rozmačkání perlooček doslova mrknutím oka.

Nejsnadnější přístup k identifikaci mikrosporidiální nákazy se jeví přes vizuální příznaky - barvu ložisek spor a lokalizaci nákazy. Spory HVH se vyskytují nejvíce v hlavě a v rostru, nákaza se postupně šíří po těle dolů podél střeva a srdce a spory mají bělavou barvu. Spory mikrosporidie *Berwaldia singularis* jsou umístěny spíše v oblasti vaječníků, tukových buněk a trávicího ústrojí, pokud se nachází i v hlavě, tak spíše v dorzální části a nezasahují až do rostra. Zajímavé je, že nákaza *B. singularis* opaleskuje do růžovofialové, takže jsem po prvotním určení několika nakažených perlooček, byla schopná rozeznat nákazu *B. singularis* díky její barvě prakticky okamžitě. U této mikrosporidie jsem nikdy nepozorovala masivní infekci, která by se projevila zaplněním celého těla perloočky sporami.

Zajímavé je, že jsem u perlooček nakažených mikrosporidii *B. singularis* nepozorovala nakažené dospělé samice s embryi či nakažené efipiální samice, zatímco u perlooček nakažených HVH jsem nakažené samice s embryi či nakažené efipiální samice pozorovala. Nabízí se otázka, zda mikrosporidie *Berwaldia singularis* hostitelské perloočky kastruje? Mnoho parazitů kastruje svého hostitele. Kastrace je považována za lepší strategii, neboť kastrovaný hostitel může stále šířit parazitické spory (Stirnadel et al. 1997, Ebert et al. 2004). Extrémním příkladem je nákaza mikrosporidii *Thelohania acuta* u hostitelské perloočky r. *Daphnia*, u kterých nikdy nebyly spatřeny samice s vajíčky. Při dalším zkoumání bych se více zaměřila na ovlivnění populační dynamiky hostitelské populace perlooček nakažených pouze mikrosporidii *Berwaldia singularis*. Zajímalo by mě, či potomci se v příští generaci či sezóně vylíhli, a jakou mají genovou strukturu.

Rozdíly a shody ve vizuálních příznacích mikrosporidii z tůně a z přehrad jsou následující: Skutečná *Berwaldia schaefernai* infikuje vaječníky, tukové buňky, a poté ostatní tkáně těla. Barva ložisek spor je nazelenalá (Larsson et al. 1994). Weigl et al. 2012 popisuje

nákazu „*Berwaldia schaefernai*“ dvěma odlišnými vizuálními vzhledy – v jednom případě byla nákaza lokalizována především v hlavě a. V druhém případě jsou zahrnuty všechny detekované mikrosporidie včetně HVH a i Mic-6.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala vztahy mezi hostitelskou perloočkou *Daphnia pulex* a jejími mikrosporidiálními parazity - *Berwaldia singularis* a blíže neurčeným druhem, označeným jako „HVH“.

Sledovala jsem velikost hostitelské populace perlooček a prevalenci mikrosporidiální infekce v průběhu sezóny. Populace perlooček se na lokalitě vyskytuje od března do září, k největší velikosti populace dochází od poloviny května. Mikrosporidiální infekce se na lokalitě začíná objevovat na začátku května. Nejvyšší výskyt mikrosporidiální infekce nastává v intervalu od konce května do poloviny června. Mikrosporidiální infekce bezpochyby ovlivňují populaci hostitelských perlooček, ale velikost populace společně s výskytem infekce a mírou prevalence na sobě nejsou přímo závislé.

Obě mikrosporidie se od sebe odlišují v příznacích, velikosti spor, výskytu i míry propuknutí infekce. Po dva roky jsem sledovala převážně infekci mikrosporidií „HVH“, aby její výskyt převýšila následující rok *Berwaldia singularis*. Pokusy s přenosy mikrosporidiální nákazy, které neproběhly úspěšně, přispěly k podpoření hypotézy o vícehostitelském cyklu mikrosporidií.

Porovnávání systémů v tůni a v přehradách díky vzájemné podobnosti a příbuznosti druhů, bylo dočasně ohroženo zjištěnou chybou v GenBank. Dosud neurčená mikrosporidie z přehrad zde byla zařazena pod jménem *Berwaldia schaefernai*, která by bez chyby byla nejbližší příbuznou mikrosporidií *Berwaldia singularis* z tůně.

Díky sekvenaci PCR produktů bylo zjištěno, že spojení mezi přehradami a tůni přeci jen existuje. Sekvence „nepravé *Berwaldia schaefernai*“ z přehrad a mikrosporidie „HVH“ z tůně se shoduje, takže se jedná o stejný druh mikrosporidie. A i mikrosporidie *Berwaldia singularis* má svoji příbuznou mikrosporidii v přehradách, a to MIC-6, která je pravou *Berwaldia schaefernai*. Sekvenací PCR produktů s DNA izoláty bezobratlých, především larev pakomárů a komárů, jsem získala referenční sekvence třech mikrosporidiálních druhů vyskytujících se v tůních.

LITERATURA

- Becnel, J. (1994). Life cycles and host-parasite relationships of Microsporidia in culicine mosquitoes. *FOLIA PARASITOLOGICA*, 41, 91-96.
- Brambilla, D. J. (1983). Microsporidiosis in a *Daphnia pulex* population. *Hydrobiologia*, 99(3), 175-188.
- Brede, N., Thielsch, A., Sandrock, C., Spaak, P., Keller, B., Streit, B. & Schwenk, K. 2006. Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Mol. Ecol. Notes* 6: 536–539.
- Carius, H. J., Little, T. J., & Ebert, D. (2001). Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55(6), 1136-1145.
- Colbourne, J. K., & Hebert, P. D. (1996). The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 351(1337), 349-360.
- Colbourne, J. K., Hebert, P. D., & Taylor, D. J. (1997). Evolutionary origins of phenotypic diversity in *Daphnia*. *Molecular evolution and adaptive radiation*, 163-188.
- Corradi, N., & Keeling, P. J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, 23(1), 1-8.
- Colbourne, J. K., Robison, B., Bogart, K., & Lynch, M. (2004). Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 485-490.
- Decaestecker, E., De Meester, L., & Ebert, D. (2002). In deep trouble: habitat selection constrained by multiple enemies in zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5481-5485.
- Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J. A., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., & De Meester, L. (2007). Host–parasite ‘Red Queen’ dynamics archived in pond sediment. *Nature*, 450(7171), 870-873.
- Duncan, A. B., & Little, T. J. (2007). Parasite-driven genetic change in a natural population of *Daphnia*. *Evolution*, 61(4), 796-803.
- Dybdahl, M. F., & Lively, C. M. (1996). The geography of coevolution: comparative population structures for a snail and its trematode parasite. *Evolution*, 2264-2275.
- Ebert, D., Lipsitch, M., & Mangin, K. L. (2000). The effect of parasites on host population density and extinction: experimental epidemiology with *Daphnia* and six microparasites. *The American Naturalist*, 156(5), 459-477.
- Ebert, D., Joachim Carius, H., Little, T., & Decaestecker, E. (2004). The evolution of virulence when parasites cause host castration and gigantism. *the american naturalist*, 164(S5), S19-S32.
- Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.

- Ebert, D. (2008). Host-parasite coevolution: insights from the *Daphnia*-parasite model system. *Current opinion in microbiology*, 11(3), 290-301.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294.
- Forró, L., Korovchinsky, N. M., Kotov, A. A., & Petrusek, A. (2008). Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 177-184.
- Franzen, C. (2005). How do microsporidia invade cells. *Folia parasitologica* (Vol. 52, No. 1/2, pp. 36-40). Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic.
- González-Tortuero, E., Rusek, J., Maayan, I., Petrusek, A., Piálek, L., Laurent, S., & Wolinska, J. (2016). Genetic diversity of two *Daphnia*-infecting microsporidian parasites, based on sequence variation in the internal transcribed spacer region. *Parasites & vectors*, 9(1), 293.
- Grabner, D. S. (2017). Hidden diversity: parasites of stream arthropods. *Freshwater Biology*, 62(1), 52-64.
- Haag, K. L., Larsson, J. R., Refardt, D., & Ebert, D. (2011). Cytological and molecular description of *Hamiltosporidium tvaerminnensis* gen. et sp. nov., a microsporidian parasite of *Daphnia magna*, and establishment of *Hamiltosporidium magnivora* comb. nov. *Parasitology*, 138(04), 447-462.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular. *MicrobiologySpectrum*. Dostupné z ResearchGate. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016
- Hubová, J. (2015). Mikroparaziti a plodnost perlooček rodu *Daphnia* na gradientech v korytovitých přehradních nádržích. Diplomová práce. Katedra ekologie, Univerzita Karlova v Praze.
- Hudec, I. (2010). Fauna Slovenska III. Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda, Onychopoda, VEDA, vydavateľ'stvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, 31-33.
- Huyse, T., Poulin, R., & Théron, A. (2005). Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in parasitology*, 21(10), 469-475.
- Innes, D. J., & Singleton, D. R. (2000). Variation in allocation to sexual and asexual reproduction among clones of cyclically parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4), 771-787.
- James, T. Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., & Stajich, J. E. (2013). Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and microsporidia. *Current Biology*, 23(16), 1548-1553.
- Jokela, J., Dybdahl, M. F., & Lively, C. M. (2009). The maintenance of sex, clonal dynamics, and host-parasite coevolution in a mixed population of sexual and asexual snails. *The american naturalist*, 174(S1), S43-S53.
- Karpov, S. A., Mamkaeva, M. A., Benzerara, K., Moreira, D., & López-García, P. (2014). Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium aff. melosirae* (Aphelida, Opisthosporidia). *Protist*, 165(4), 512-526.

- Kleiven, O. T., Larsson, P., & Hobæk, A. (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*, 197-206.
- Koskella, B., & Lively, C. M. (2009). Evidence for negative frequency-dependent selection during experimental coevolution of a freshwater snail and a sterilizing trematode. *Evolution*, 63(9), 2213-2221.
- Lampert, W. (2006). *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology* 54: 607-620.
- Larsson, R. (1981). A new microsporidium *Berwaldia singularis* gen. et sp. nov. from *Daphnia pulex* and a survey of microsporidia described from Cladocera. *Parasitology*, 83(02), 325-342.
- Larsson, J. R., Ebert, D., & Vávra, J. (1996). Ultrastructural study of Glugea cladocera Pfeiffer, 1895, and transfer to the genus Agglomerata (Microspora, Duboscqiidae). *European Journal of Protistology*, 32(4), 412-422.
- Larsson, J. R., Ebert, D., Manginand, K. L., & Vavra, J. (1998). Ultrastructural study and description of *Flabelliforma magnivora* sp. n. (Microspora: Duboscqiidae), a microsporidian parasite of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera: Daphniidae). *Acta Protozoologica*, 37, 41-52.
- Little, T. J., & Ebert, D. (1999). Associations between parasitism and host genotype in natural populations of *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Animal Ecology*, 68(1), 134-149.
- Little, T. J., & Ebert, D. (2001). Temporal patterns of genetic variation for resistance and infectivity in a *Daphnia*-microparasite system. *Evolution*, 55(6), 1146-1152.
- Lively, C. M. (2010). A review of Red Queen models for the persistence of obligate sexual reproduction. *Journal of Heredity*, 101(suppl 1), S13-S20.
- Lohr, J. N., Laforsch, C., Koerner, H., & Wolinska, J. (2010). A *Daphnia* parasite (*Caullerya mesnili*) constitutes a new member of the Ichthyosporea, a group of protists near the animal–fungi divergence. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 328-336.
- Lom, J. (1999). Spor o mitochondrie. Měli je už nejstarší eukaryonti? *Vesmír* 78: 203-207.
- Mangin, K. L., Lipsitch, M., & Ebert, D. (1995). Virulence and transmission modes of two microsporidia in *Daphnia magna*. *Parasitology*, 111(02), 133-142.
- Metzger, C. M., Luijckx, P., Bento, G., Mariadassou, M., & Ebert, D. (2016). The Red Queen lives: Epistasis between linked resistance loci. *Evolution*, 70(2), 480-487.
- Mieli, M. V., Garcia, J. J., & Becnel, J. J. (2000). Life Cycle and Description of *Amblyospora camposi* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the Mosquito *Culex renatoi* (Diptera, Culicidae) and the Copepod *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda, Cyclopidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(6), 575-580.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.
- Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB journal*, 7(1), 113-123.

- Petrusek, A. (2010). Modelka *Daphnia*. Perloočky jako modelové organismy v biologii. *Vesmír* 89: 470-473
- Refardt, D., Canning, E.U., Mathis, A., Cheney, S.A., Lafranchi-Tristem, N.J. & Ebert, D. (2002). Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia that infect *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Parasitology* 124: 381–389.
- Refardt, D., Decaestecker, E., Johnson, P. T., & Vávra, J. (2008). Morphology, molecular phylogeny, and ecology of *Binucleata daphniae* ng, n. sp. (Fungi: Microsporidia), a parasite of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Branchiopoda). *Journal of eukaryotic microbiology*, 55(5), 393-408.
- Roth, O., Ebert, D., Vizoso, D. B., Bieger, A., & Lass, S. (2008). Male-biased sex-ratio distortion caused by *Octosporea bayeri*, a vertically and horizontally-transmitted parasite of *Daphnia magna*. *International journal for parasitology*, 38(8), 969-979.
- Routtu, J., & Ebert, D. (2015). Genetic architecture of resistance in *Daphnia* hosts against two species of host-specific parasites. *Heredity*, 114(2), 241.
- Schwenk, K., Sand, A., Boersma, M., Brehm, M., Mader, E., Offerhaus, D., & Spaak, P. (1998). Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera. *Aquatic Ecology*, 32(1), 37-51.
- Sokolova, Y. Y., Senderskiy, I. V., & Tokarev, Y. S. (2016). Microsporidia *Alfvenia sibirica* sp. n. and *Agglomerata cladocera* (Pfeiffer) 1895, from Siberian microcrustaceans and phylogenetic relationships within the “Aquatic outgroup” lineage of fresh water microsporidia. *Journal of invertebrate pathology*, 136, 81-91.
- Stentiford, G. D., Feist, S. W., Stone, D. M., Bateman, K. S., & Dunn, A. M. (2013). Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends in parasitology*, 29(11), 567-578.
- Stirnadel, H. A., & Ebert, D. (1997). Prevalence, host specificity and impact on host fecundity of microparasites and epibionts in three sympatric *Daphnia* species. *Journal of Animal Ecology*, 212-222.
- Stollewerk, A. (2010). The water flea *Daphnia*-a 'new' model system for ecology and evolution? *Journal of Biology*, 9(2), 21.
- Stodola, J. (2013). Detailní taxonomická a klonální struktura populací druhového komplexu *Daphnia longispina* na podélném gradientu přehradních nádrží. Diplomová práce. Katedra ekologie, Univerzita Karlova v Praze.
- Vávra, J., & Larsson, J. R. (1994). *Berwaldia schaefernai* (Jírovec, 1937) comb. n. (Protozoa, Microsporida), fine structure, life cycle, and relationship to *Berwaldia singularis* Larsson, 1981. *European journal of protistology*, 30(1), 45-54.
- Vávra, J., & Lukeš, J. (2013). Microsporidia and ‘the art of living together’. *Adv Parasitol*, 82, 253-319.

- Vávra, J., Hylíš, M., Fiala, I., & Nebesářová, J. (2016). *Globulispora mitoportans* ng, n. sp. (Opisthosporidia: Microsporidia) a microsporidian parasite of daphnids with unusual spore organization and prominent mitosome-like vesicles. *Journal of invertebrate pathology*, 135, 43-52.
- Vávra, J., Hylíš, M., Fiala, I., Sacherová, V., & Vossbrinck, C. R. (2017). Microsporidia of the genus *Berwaldia* Larsson, 1981 (Opisthosporidia, Microsporidia), parasites of daphnids (Crustacea, Branchiopoda): structure, biology and a corrected molecular phylogeny; description of *Berwaldia nana* sp. n. and *Berwaldia hypodermica* sp. n. (In press) *European Journal of Protistology*
- Vizoso, D. B., & Ebert, D. (2004). Within-host dynamics of a microsporidium with horizontal and vertical transmission: *Octospora bayeri* in *Daphnia magna*. *Parasitology*, 128(01), 31-38.
- Vizoso, D. B., & Ebert, D. (2005). Phenotypic plasticity of host–parasite interactions in response to the route of infection. *Journal of evolutionary biology*, 18(4), 911-921.
- Vossbrinck, C.R., Andreadis, T.G., Vávra, J. & Becnel, J.J. (2004). Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic microsporidia (Microsporidia: Amblyosporidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 259–261.
- Vossbrinck, C. R., & Debrunner-Vossbrinck, B. A. (2005). Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia parasitologica*, 52(1-2), 131-142.
- Weigl, S., Körner, H., Petrusek, A., Seda, J., & Wolinska, J. (2012). Natural distribution and co-infection patterns of microsporidia parasites in the *Daphnia longispina* complex. *Parasitology*, 139(07), 870-880.
- Wolinska, J., Giessler, S., & Koerner, H. (2009a). Molecular identification and hidden diversity of novel *Daphnia* parasites from European lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7051-7059.
- Wolinska, J., & Spaak, P. (2009b). The cost of being common: evidence from natural *Daphnia* populations. *Evolution*, 63(7), 1893-1901.
- Wolinska, J., Spaak, P., Koerner, H., Petrusek, A., Seda, J., & Giessler, S. (2011). Transmission mode affects the population genetic structure of *Daphnia* parasites. *Journal of evolutionary biology*, 24(2), 265-273.
- Xu, Y., & Weiss, L. M. (2005). The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *International journal for parasitology*, 35(9), 941-953.
- Yin, M., Petrusek, A., Seda, J., & Wolinska, J. (2012). Fine-scale genetic analysis of *Daphnia* host populations infected by two virulent parasites—strong fluctuations in clonal structure at small temporal and spatial scales. *International Journal for Parasitology*, 42(1), 115-121.
-

Tab. I - 1 Kalendář odběrův r. 2014

datum	čas	konduktivita (μs)	teplota ($^{\circ}\text{C}$)	vzorky	pozn.
1.4.2014	10:00	78	7,3	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (11 l měřična, 10 l hloubka)	Okřehek cca na 90% hladiny.
15.4.2014	10:00	67	5,8	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živý zooplankton	Okřehek na 100 % hladiny, hodně řas a pylu.
30.4.2014	18:00	87	14,2	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 3x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živý zooplankton	Okřehek, perloočky neinfekční.
13.5.2014	19:00	67	11,3	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (5 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živý zooplankton	Potvrzena HVH inf. - min 10 j/l, BS inf. ne. Okřehek.
30.5.2014	14:00	69	12,6	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živý zooplankton	Vysoká denzita perlooček. Okřehek.
22.6.2014	18:00	61	14,6	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živý zooplankton	HVH inf. Nástup samců. Bez larev. Kulminace okřešku.
17.7.2014	10:00	66	17,7	2x kvalita ETOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (5 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živý zooplankton	0 HVH inf, silná bakteriální inf..

PŘÍLOHA I

PŘÍLOHA II

Tab. II – 1 Kalenář odběrů v r. 2015

datum	čas	konduktivita (μ S)	teplota ($^{\circ}$ C)	vzorky	pozn.
16.3.2015	10:00	100	5,8	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živého zooplanktonu	0 okřehkek, 0 perfoočky; buchanky, nitěny, <u>efipia</u> - ANO
31.3.2015	9:30	98	4,4	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živého zooplanktonu	0 okřehkek, 0 perfoočky; buchanky; <u>efipia</u> - ANO
12.4.2015	16:00	93	13	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 2x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 1 l živého zooplanktonu	0 okřehkek, 0 dafnie
23.4.2015	10:00	15	10	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 1x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živého zooplanktonu	HODNĚ SAMIC S VAJÍČKY, 0 okřehkek
3.5.2015	16:00	106	15	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 1x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živého zooplanktonu	0 okřehkek, HVH INF.
13.5.2015	10:30	NA	13	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 1x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živého zooplanktonu	nástup okřehku, pyl na hladině, nástup <u>efipjálních</u> perfooček, bez <u>fluometru</u>
19.5.2015	12:00	NA	NA	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 1x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živého zooplanktonu	INF HVH i BS
31.5.2015	16:00	NA	16	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 1x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živého zooplanktonu	INF
15.6.2015	14:00	NA	NA	2x kvalita EtOH (hloubka vs. měřična), 1x kvantita FORM (10 l měřična, 10 l hloubka) + 2 l živého zooplanktonu	s prof. Vávrou, mnoho okřehku
14.7.2015	10:00	NA	21	1x kvalita EtOH (1 úroveň), 1x kvantita FORM (10 l) + 1 l živého zooplanktonu	okřehkek, pokles hladiny cca o 30-40 cm, INF 0, <u>D. gulex</u> málo
24.8.2015	16:00	NA	25	1x kvalita EtOH (1 úroveň), 1x kvantita FORM (10 l) + 1 l živého zooplanktonu	výška hladiny cca 30 cm, hustý okřehkek, perfoočky odhad 3 j/l
15.10.2015	10:00	NA	12	1x kvantita FORM (1 úroveň) + 1 l <u>živoků</u>	hladina cca 20 cm jen ve středu tůně, odebrána pouze 1 kvantita, 0 perfooček

Tab. III - 1 Kalendář odběrů v r. 2016

datum	čas	konduktivita (μS)	teplota (°C)	vzorky	pozn.
9.5.2016	9:30	NA	14	2 l živého zooplanktonu, 1 x kvalita měčičina, 1x kvalit hloubka,	odběr bezebratřích pro genovou analýzu, pñedešším infekce <i>Berwaldia singularis</i> .
22.5.2016	16:00	NA	16	2 l živého zooplanktonu, 1 x kvalita měčičina, 1x kvalit hloubka	s prof. Vávrou, vysoká prevalence <i>Berwaldia singularis</i> , málo HVH.
22.6.2016	14:00	NA	19	1 l živého zooplanktonu, 1x kvalita měčičina	Stále infekce <i>B. singularis</i> i HVH.

PŘÍLOHA III

PŘÍLOHA IV

Tab. IV – 1 Vybavení potřebné pro terénní odběry

vialka 100 ml (min 4 ks)	rybářské brodící kalhoty
planktonka na tyči (hustota ok 100 μm)	terénní fluorimetr pro stanovení chlorofylu
filtrovací síť (hustota ok 40-100 μm)	kapesní oxymetr
ttubicový odběrák vody	papír, tužka, permafrix
formalín 4% 100 ml	foťák
EtOH 96% 100 ml	cedník normální
sběrná nádoba (kýbl)	bílá miska
litrová odběrová nádoba	entomopinzeta
PET lahve na živý zooplankton (1-2 ks)	bílá miska

PŘÍLOHA V

Tab. V- 1 Denzita zkoumaného zooplanktonu v r. 2014

Denzita 2014 (N/l)	měřina (M) hlubší část (H)	dospělé		efipijní		juvenilové		samicí		Clydoriidae	Cyclopoidea	koretra Chaoboridae	pakomár Chironomidae	komár Culicidae	ostatní	efipium
		samec	samec	samec	samec	perioček	perioček									
14.4.2014	M	13,0	0,1	2,6	0,0	0,2	43,3	0,0	0,1	0,0	0,5	0,2				
	H	3,6	0	1	0	0,2	19,8	0,1	0,5	0	0	0	0	0	1,2	
15.4.2014	M	11,5	0	20,8	0,3	2,3	34	0,1	0,4	0,8	0,1	1,3				
	H	13,5	1	29	0,5	43,5	25	0,1	0,4	0	0	0	0	1,6		
30.4.2014	M	4	0,1	0,9	0,1	6,6	14,6	0,3	0,1	0	0,6	2				
	H	11,3	2,7	8	1,1	1,8	2	0	0,1	0	0,2	1,9				
13.5.2014	M	30,2	8,6	17	4	1,6	10	0	0	0	0,6	4,4				
	H	10	2,5	4,7	0,3	0,3	2	0	0	0	0	2,6				
30.5.2014	M	27	1,7	31,3	2,3	33	2	0,1	0	0	0	1,5				
	H	8,1	1,6	9,9	0,8	11	2,5	0,1	0	0	0,1	1,8				
22.6.2014	M	27,5	1,6	17,5	5,2	5,5	1,5	0	0	0	0	3,8				
	H	27,5	1,2	8	1,6	6,5	0,5	0	0	0	0	1,7				
17.7.2014	M	18	0	13,3	2	4	5	0	0	0	0	1,4				
	H	4,3	0	2,6	0,8	1	1,5	0	0	0	0	2,4				
1.9.2014	M+H	0	0	0	0	2,5	1,8	0	0	0	0,7	0				

PŘÍLOHA VI

Tab. VI - 1. Denzita zkoumaného zooplanktonu v r. 2015

Denzita 2015 (N/l)	měřina (M) hloubka (H)	dospělé		efipijní		juvenilové	samci perioček	Chydoridae	Cyclopoidea	koratra Chaoboridae	pakomár Chironomidae	komár Culicidae	ostatní	efipium
		samice	samice	samice	samice									
15.4.2015	M	4,4	3	3,6	0	0	22	0,2	1	0	0	0	0	0
	H	3,3	0	2,8	0	35	42	0,1	0,5	0,1	0	0	0	0
23.4.2015	M	3,3	0	4,3	0,2	0,3	36	0,2	0,9	0,2	0,5	0	0	0
	H	8,5	0,6	8,1	0	12	28	0	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3
3.5.2015	M	7,5	4,5	17,3	4,7	2,4	16	0	0,2	1	1	1	1,5	1,5
	H	24,7	2,3	18,6	1,8	1,8	13,1	0	0,1	0	0	0,2	0,2	0,6
13.5.2015	M	30	13	18	2,9	2,8	13,5	0	0	0	0	0	0,2	2,5
	H	11,6	15	7,2	1,0	0,3	8,9	0	0	0	0	0	0	5,3
19.5.2015	M	28,5	6	26	3,8	0,7	5,4	0	0	0	0	0	0,1	4
	H	8,5	2,0	5,8	0,2	11,0	13,0	0	0	0	0	0	0,1	0,4
31.5.2015	M	15,2	2,2	14,7	0,3	13	0,6	0	0	0	0	0	0	0
	H	6,0	7,2	13,0	3,5	19,2	0,5	0	0	0	0	0	0	0,8
15.6.2015	M	29,7	0,4	31,3	1,2	6,8	0,1	0	0	0	0	0	0	0,2
	H	10,7	5,2	18,0	2,2	4,2	1,5	0	0	0	0	0	0	0,1
14.7.2015	M	13	0	9,3	0,8	2	3,5	1,1	0	0	0	0	0	0,1
	H	3,6	0	4,5	1,0	1,0	3,7	0	0	0	0	0	0	0,0
24.8.2015	M	3	1	0	0	0,2	1,5	2,5	0	0	0	0	0	0,2
	H	2	0	0	0,5	0,5	3,7	0	0	0	0,2	0	0	0,7
15.10.2015	M+H	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0,1	0,7	0,1

PŘÍLOHA VII

Tab. VII – 1 PCR protokoly

Název primeru	Druh	PCR proces	Koncentrace produktů
12S-F 12S-R	12 SSU rRNA Metazoa	94° C – 1 min 38 x [94° C – 1 min, 56° C – 1 min, 72° C – 2 min] 72° C – 7 min	2 mM MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ pufr 0,15 mM dNTP 0,5 U/μl TAQ polymeráza 2 x 0,4 μM primer 1 % DMSO
16SMic general F 16SMic general R	Microsporidia spp. (Weigl et al. 2012)	95° C – 3 min 35 x [95° C – 30 s, 65° C – 30 s, 72° C – 30s] 72° C – 7 min	2 mM MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ pufr 0,25 mM dNTP 1,0 U/μl TAQ polymeráza 2 x 0,5 μM primer
16S-BERW F 16S-BERW R	<i>B. schaefernai</i> (Weigl et al. 2012)	95° C – 3 min 35 x [95° C – 30 s, 58° C – 30 s, 72° C – 30s] 72° C – 7 min	2 mM MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ pufr 0,25 mM dNTP 0,0625 U/μl TAQ polymeráza 2 x 0,5 μM primer 1 % DMSO
CO-I-F CO-I-R	16S - Metazoa	94° C – 2:30 min 40 x [90° C – 30 s, 48° C – 1 min, 72° C – 1 min] 72° C – 10 min	2,2 mM MgCl ₂ KCl pufr 0,15 mM dNTP 0,7 U/μl TAQ polymeráza 2 x 0,18 μM primer
V1 MIC-uni-3R	12 SSU rRNA Microsporidia spp. (Grabner 2017)	94 °C-3 min, 35 x [95 °C - 15 s, 68 °C - 30 s 72°C - 30s] 72°C - 3 min	2 mM MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ pufr 0,2 mM dNTP 1,0 U/μl TAQ polymeráza 2 x 0,5 μM primer

PŘÍLOHA VIII

Tab VIII – 1 PCR produkty perlooček a bezobratlých

PCR produkty amplifikace pomocí 16SMic primery a V1/uni-3R primery se na gelu agarózové elektroforézy zobrazily následovně – okolo 200 párů bází a méně se jednalo nejčastěji o bakteriální sekvence, okolo 400 bp se jednalo o mikrosporidiální sekvence a na 600 bp a více bp se amplifikovaly sekvence bezobratlých.

č. vz.	druh	datum odběru	amplifikace DNA 16SMic primery	amplifikace DNA V1/uni-3R primery
DZ11	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ12	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ13	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ14	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ15	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ16	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ17	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ18	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, zdravé	NE	NE
DZ51	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ52	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ53	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ54	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ55	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ56	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ57	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DZ58	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, zdravé	NE	NE
DI11	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI12	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI13	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI14	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	NE	NE
DI15	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI16	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	NE	NE
DI17	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	NE	NE
DI18	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI21	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 150 bp
DI22	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 300 a 380 bp	ANO - 150 i 380 bp
DI23	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 380 bp	NE
DI24	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 400 bp	ANO - 380 bp
DI25	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 350 bp
DI26	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 350 bp
DI27	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 350 bp
DI28	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI31	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI32	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI33	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 150 i 380 bp
DI34	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 300 a 380 bp
DI35	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	NE
DI36	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 150 i 380 bp

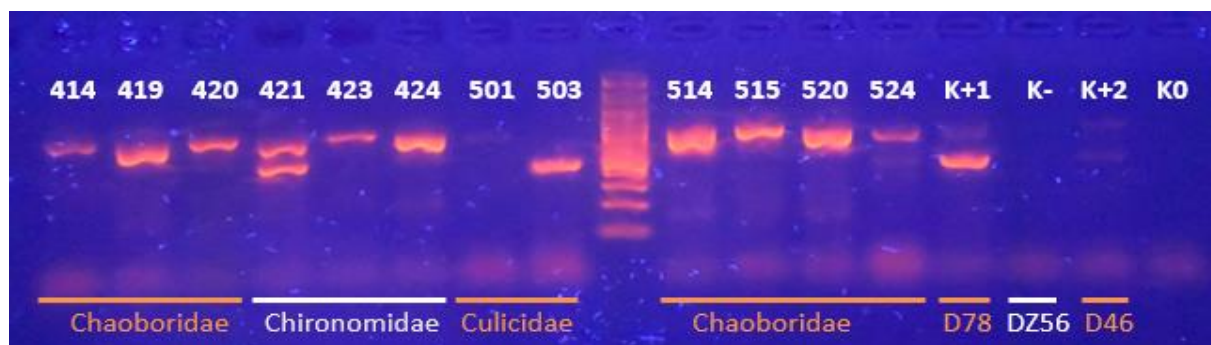
DI37	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 50 bp
DI38	<i>Daphnia pulex</i>	30. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 150 i 380 bp
DI41	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI42	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI43	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	NE	ANO - 380 bp
DI44	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI45	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	ANO - 380 bp
DI46	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	NE	ANO - 380 bp
DI47	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	NE	NE
DI48	<i>Daphnia pulex</i>	13. 5. 2014 hloubka, nakažené	ANO - 380 bp	
DI61	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	ANO- 380 bp	
DI62	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	ANO-380 bp	ANO - 150 a 380 bp
DI63	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	ANO-380 bp	NE
DI64	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	NE	NE
DI65	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	NE	NE
DI66	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	ANO - 400 bp	ANO - 380 bp
DI67	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	NE	NE
DI68	<i>Daphnia pulex</i>	30. 4. 2014 mělčina, nakažené	NE	NE
DI71	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	NE	NE
DI72	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 300 a 350 bp	ANO - 350 bp
DI73	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 400 bp	ANO - 350 bp
DI74	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 350 bp
DI75	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 350 bp
DI76	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 250 a 380 bp	ANO - 150 bp
DI77	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 250 a 380 bp	ANO - 150 bp
DI78	<i>Daphnia pulex</i>	14. 7. 2015 mělčina, nakažené	ANO - 150 i 350 bp	ANO - 150 bp
DI81	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	ANO - 250 a 380 bp	ANO - 150 a 380 bp
DI82	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	ANO - 250 a 380 bp	ANO - 150 bp
DI83	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	ANO - 250 a 380 bp	ANO - 150 a 380 bp
DI84	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	ANO - 150 bp	ANO - 150 bp
DI85	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	ANO - 250 bp	NE
DI86	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	NE	NE
DI87	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	ANO - 150 bp	NE
DI88	<i>Daphnia pulex</i>	9. 5. 2016 mělčina, nakažené	NE	NE
DI91	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 380 bp
DI92	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 380 bp
DI93	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 380 bp
DI94	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 250 bp	ANO - 380 bp
DI95	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 380 bp
DI96	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 380 bp
DI97	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	ANO - 350 bp	ANO - 380 bp
DI98	<i>Daphnia pulex</i>	22.5.2016 mělčina, nakažené	NE	NE
101	Chironomidae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
102	Chironomidae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
103	Chironomidae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
104	Chironomidae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
105	Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
106	Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
107	Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
108	Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
109	Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE

110	Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
111	Ceratopogonidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
112	Ceratopogonidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
113	Ceratopogonidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
114	Ceratopogonidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
115	pupa Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
116	pupa Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
117	pupa Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
118	pupa Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
119	pupa Chironomidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
120	Chaoboridae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
121	Chaoboridae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
122	Chaoboridae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
123	Chaoboridae	12.4.2015	NE	NE
124	Tubificidae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
201	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	ANO - 380 bp
202	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
203	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
204	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	NE
205	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	NE
206	Culicidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	NE
207	Culicidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	NE
208	Culicidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	NE
209	Culicidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	NE
210	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
211	Chaoboridae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
212	Chaoboridae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
213	pupa Culicidae	1.4.2014	NE	NE
214	pupa Culicidae	1.4.2014	ANO - 700 bp	NE
215	pupa Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
216	pupa Culicidae	1.4.2014	ANO - 400 a 650 bp	NE
217	pupa Culicidae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
218	pupa Culicidae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
219	Ceratopogonidae	12.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
220	Ceratopogonidae	12.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 150, 380 a 650 bp
221	Ceratopogonidae	12.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 150, 380 a 650 bp
222	Ceratopogonidae	12.4.2015	ANO - 400 a 650 bp	NE
223	Dytiscidae	1.4.2014	ANO - 150 a 650 bp	NE
224	Dytiscidae	1.4.2014	ANO - 150 a 650 bp	ANO - 150, 380 a 650 bp
301	Tubificidae	9.5.2016	NE	NE
302	Tubificidae	9.5.2016	NE	NE
303	Tubificidae	9.5.2016	NE	NE
304	Tubificidae	9.5.2016	ANO - 600 bp	NE
305	Tubificidae	9.5.2016	NE	NE
306	Tubificidae	9.5.2016	ANO - 600 bp	NE
307	pupa Chironomidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 150 a 380 bp

308	pupa Chironomidae	9.5.2016	NE	NE
309	pupa Culicidae	9.5.2016	ANO - 600 pb	NE
310	pupa Culicidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	NE
311	pupa Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	ANO - 150 bp
312	pupa Culicidae	9.5.2016	ANO - 400 a 650 bp	NE
313	Chaoboridae	14.7.2015	ANO - 380 a 700 bp	ANO - 150, 380 a 700 bp
314	Chaoboridae	14.7.2015	ANO - 700 bp	NE
315	Chaoboridae	14.7.2015	ANO - 700 bp	NE
316	Chaoboridae	14.7.2015	ANO - 650 bp	NE
317	Baetidae	30.4.2014	NE	NE
318	Baetidae	30.4.2014	NE	NE
319	Baetidae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
320	Baetidae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
321	dosp. Chironomidae	23.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 650 bp
322	dosp. Chironomidae	23.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
323	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	ANO - 150 bp
324	Chironomidae	23.4.2015	ANO - 650 bp	ANO - 150 bp
401	Culicidae	9.5.2016	NE	NE
402	Culicidae	9.5.2016	NE	NE
403	Culicidae	9.5.2016	NE	NE
404	Culicidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	NE
405	Culicidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	NE
406	Culicidae	30.4.2014	NE	NE
407	Culicidae	30.4.2014	NE	NE
408	Culicidae	30.4.2014	NE	NE
409	Culicidae	30.4.2014	ANO - 700 bp	NE
410	Culicidae	30.4.2014	ANO - 700 bp	NE
411	Culicidae	3.5.2015	ANO - 650 bp	NE
412	Chaoboridae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
413	Chaoboridae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
414	Culicidae	30.4.2014	ANO - 650 bp	NE
415	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
416	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 700 bp	NE
417	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
418	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
419	Culicidae	14.7.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
420	Culicidae	14.7.2015	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 380 bp
421	Culicidae	12.4.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
422	Culicidae	12.4.2015	ANO - 650 bp	NE
423	Culicidae	12.4.2015	ANO - 700 bp	NE
424	Culicidae	15.4.2014	ANO - 650 bp	NE
501	Culicidae	9.5.2016	ANO - 700 bp	NE
502	Culicidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	NE
503	Culicidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 380 bp
504	Culicidae	9.5.2016	ANO - 380 a 650 bp	NE
505	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
506	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
507	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
508	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE

509	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
510	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
511	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
512	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
513	Culicidae	9.5.2016	ANO - 650 bp	NE
514	Culicidae	14.7.2015	ANO - 650 bp	NE
515	Culicidae	14.7.2015	ANO - 700 bp	NE
516	Culicidae	14.7.2015	ANO - 650 bp	NE
517	Culicidae	14.7.2015	ANO - 380 a 700 bp	NE
518	Culicidae	14.7.2015	ANO - 380 a 650 bp	NE
519	Culicidae	1.4.2014	ANO - 650 bp	NE
520	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 380 i 700 bp
521	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	ANO - 380 i 700 bp
522	Culicidae	1.4.2014	ANO - 380 a 650 bp	NE
523	Culicidae	1.4.2014	ANO - 650 bp	NE
524	Culicidae	1.4.2014	ANO - 700 bp	NE

Obr. VIII – 1 Názorná fotografie gelu s PCR produkty z DNA izolátů bezobratlých, amplifikovaných 16S_{mic} primery (dle Weigl et al. 2012).



PŘÍLOHA IX

Tab. IX – 1 výsledky sekvenace PCR produktů s DNA izoláty z perlooček

č. vz.	NÁZEV	překryv	identita	přístupový kód v GenBank	délka sekvence
DZ56	bakterie <i>Arcicella aquatica</i>	63%	80%	KC987000.1	410
DI11-MIC	<i>Berwaldia</i> sp. JJW-2009a strain BERW_SEC02 clone 4 16S rRNA	100%	100%	FJ794857.1	380
DI13-MIC	<i>Berwaldia</i> sp. JJW-2009a strain BERW_SEC02 clone 4 16S rRNA	100%	100%	FJ794857.1	380
DI15-MIC	<i>Microsporidium</i> sp. Mic6 SSU rRNA	97%	97%	JQ012757.1	348
DI23-MIC	<i>Berwaldia</i> sp. JJW-2009a strain BERW_SEC02 clone 4 16S rRNA	100%	100%	FJ794857.1	380
DI24-MIC	NA	NA	NA	NA	NA
DI42-MIC	<i>Berwaldia</i> sp. JJW-2009a strain BERW_SEC02 clone 3 16S rRNA	64%	98%	FJ794859.1	380
DI78-MIC	bakterie <i>Flectobacillus Lacu</i>	52%	95%	NR_043554.1	417
DI82-MIC	<i>Microsporidium</i> sp. Mic6 SSU rRNA	97%	97%	JQ012757.1	348
DI63-V1	NA	NA	NA	NA	NA
DI81-V1	<i>Berwaldia schaefernai</i> isolate 1 SSU rRNA	100%	100%	AY090042.1	380
DI84-V1	bakterie <i>Arcicella aquatica</i>	18%	87%	KC987000.1	159

Tab. X - 1 Výsledky sekvenace larev bezobratlých

č. vz	NÁZEV	překryv	identita	přístupový kód v GenBank	délka sekvence
201	Zavreilimyia sp. SRM-2009 isolate ZAV or CAM08 18S rRNA	97%	99%	FJ570807.1	655
204	Paramerina sp. 1 SRM-2010 voucher V211 18S rRNA	97%	98%	HQ440641.1	655
214	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	89%	92%	HE600019.1	475
217	NA	NA	NA	NA	NA
220	NA	NA	NA	NA	NA
221	NA	NA	NA	NA	NA
223	Acilius sulcatus 18S rRNA	97%	99%	AJ318699.1	669
224	Acilius sulcatus 18S rRNA	96%	99%	AJ318699.1	662
304	Lumbriculus cf. variegatus BMW-2012 isolate Lumb 18S rRNA	96%	99%	JO821522.1	594
306	Lumbriculus cf. variegatus BMW-2012 isolate Lumb 18S rRNA	98%	99%	JO821522.1	609
311	Ochlerotatus excrucians isolate 1682 SSU rRNA	97%	99%	JF837524.1	654
313	Psectrotanypus dyari MODOC7 18S rRNA	98%	99%	HQ440664.1	659
316	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	88%	92%	HE600019.1	478
319	Zavreilimyia sp. SRM-2009 isolate ZAV or CAM08 18S rRNA	96%	98%	FJ570807.1	652
324	Zavreilimyia sp. SRM-2009 isolate ZAV or CAM08 18S rRNA	97%	98%	FJ570807.1	658
410	NA	NA	NA	NA	NA
414	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	88%	92%	HE600019.1	466
419	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	88%	92%	HE600019.1	471
420	Benwaldia schaefferai isolate 1 SSU rRNA (s V1/un1-3R primery)	100%	100%	AY090042.1	380
421	Benwaldia sp. JJW-2009a strain BERW SEC02 clone 4 16S rRNA (s MIC i V1/un1-3R primery)	100%	100%	FJ794857.1	380
423	Zavreilimyia sp. SRM-2009 isolate ZAV or CAM08 18S rRNA	97%	98%	FJ570807.1	653
424	Zavreilimyia sp. SRM-2009 isolate ZAV or CAM08 18S rRNA	98%	99%	FJ570807.1	663
501	Ochlerotatus excrucians isolate 1682 SSU rRNA	98%	99%	JF837524.1	657
503	Hazardia milleri 1 SSU rRNA (s MIC i V1/un1-3R primery)	100%	96,8%	AY090067.1	307
514	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	89%	92%	HE600019.1	473
515	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	92%	92%	HE600019.1	458
520	Hazardia milleri 1 SSU rRNA (s V1/un1-3R primery)	100%	96,8%	AY090067.1	307
524	Psorophora cyaneescens 18S rRNA	86%	88%	HE600019.1	462

PŘÍLOHA XI

Referenční sekvence 3 druhů mikrosporidií, které jsem získalasekvenací:

Komár PAK520LV1

ATGTTACAGCCTCGTCACTACCTCTGGTCCTCCAAGTGGGTAAGTTTTCGCGCCTGCTGCC
GTCCTTGGACGTGGCAGCCATCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCAAACCCCGATTCCCC
GTTACCCGTCGTCGCCGCGGTACGCACTTACCGTACCGCCTAGCTGATAGGCCAGGAACT
CACCCACGCTTGTCTTAGCAGCAGCTTACCGCTGTTATCCCCTGTCGTGGCCAGATTTTC
CTGTCCTACTGAGCCGTTCCGCCCTCCGTTACCTTCGCTGGCTTGCATGGCTTAATCCTT
GAGGCAAGCGTCCAC

Perloočka PAK11DM - HVH

TCCAGCTCCAGGAGCGTCTGTGTGTGTTGCTGCGGTTAAAGAGTGCGTAGTCGGGTTTTT
TGCCAGCAATAAAGGTGCGGTCTTCAACTGTGCATTGTGCTGGTACTTAAATCTAGGGAC
CGGAGAAGGGCAATGGTATTCGACAGCGAGGGGTGAAAAGTATGACCTGTTGAGGAGCG
ACTGAGGCGAAAGCGGTTGTCCGGGACGGGTTTCGACGATCAAGCGCGTGAGCAGGAGGAT
CGAAGGCGATTAGAGACCGTCGTAGTTCCTGCAGTAAACGATGCCAACGGGATTGCAAGC
TATGTGATTCAAGGGAAACCGAGTGTATGGGCTCCGGGGATAGTACGGGCGCAAGCCAGA
AACTTGAAGAAATtGACGGA

Perloočka PAK15DM - *Berwaldia singularis*

TCCGCCATTTCTTTAAGTTTTGTCCGTTGCCGATTACTATCCCTAGAGCCCATACTCT
TAATTTCTCTATATTGCATCAGCGCACTGACACGATAAGTAGGCATCGTTTACGGCCGGA
ACTACAACGGTATCTAATCATTCTTTGATCCTCCGGCTAACGTTCTTGACCATCAGAGGCG
TACTAGGTAATCGCTTTTCGCTACTGGTTGTCCTCGGCAGGTCTTCAATTTTCACCTCTCG
CTGCCAAATACAATTACCTCCATCCGCTCCTTAATGTTACGTCTACTGTAAGTTAGAGTG
CACTTTAAGGGTCCCTCGTTTCCAAACAGGACTATAACACGGCTACAAACTTTCTAACTAC