

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra ekologie

**Morfologická a genetická variabilita  
druhu *Chydorus sphaericus*  
(Crustacea, Cladocera)  
v závislosti na prostředí**

**Morphological and genetic variability  
of *Chydorus sphaericus* (Crustacea, Cladocera)  
depending on the environment**

**Ludmila Matušková  
(roz. Fialková)**

**Diplomová práce**

Praha, září 2008  
Školitelka: RNDr. Veronika Sacherová, Ph.D.

Prohlašuji, že práce byla vypracována samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a jiných citovaných pramenů. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré informace budou řádně citovány.

V Praze dne .....

.....

Ludmila Matušková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych velmi poděkovat mojí školitelce RNDr. Veronice Sacherové PhD. za odborné vedení mojí diplomové práce a také za její trpělivost, ochotu a užitečné rady.

Za cenné připomínky a pomoc při zpracovávání vybraných dat a vzorků patří díky i RNDr. Adamu Petruskovi PhD. a RNDr. Janu Fottovi CSc.

Děkuji také RNDr. Ivo Přikrylovi, Miroslavu Kosíkovi DiS. a Petru Janu Juračkovi Bc. za pomoc při získávání terénních vzorků a dat.

Zvláštní poděkování patří mému manželovi, který mi vždy dodával energii, optimismus a chuť do práce, a také mým rodičům za jejich neutuchající podporu během mého studia na vysoké škole.

## OBSAH

<b>ABSTRACT</b>	5
<b>ÚVOD</b>	6
<b>KAPITOLA 1: STUDOVANÝ ORGANISMUS, MODELOVÉ LOKALITY A ODBĚRY VZORKŮ</b>	8
<b>Popis studovaného organismu</b>	8
Druh <i>Chydorus sphaericus</i>	8
Morfologická variabilita a taxonomie	11
Reakce na prostředí	15
<b>Popis modelových lokalit</b>	16
Vysokohorská jezera	17
Důlní vody	18
Eutrofní rybníky	20
Tůně	21
<b>Odběry vzorků zooplanktonu</b>	24
<b>KAPITOLA 2: TAXONOMICKÉ POSTAVENÍ POPULACÍ RODU CHYDORUS NA ZÁKLADĚ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝCH METOD</b>	27
<b>Úvod</b>	27
<b>Metodika</b>	32
Izolace DNA	32
Amplifikace DNA	32
Purifikace PCR produktů	34
Sekvenování mt DNA a analýza sekvencí	34
<b>Výsledky</b>	34
<b>Diskuze</b>	39
<b>KAPITOLA 3: MORFOMETRICKÁ ANALÝZA POPULACÍ DRUHU CHYDORUS SPHAERICUS</b>	45
<b>Úvod</b>	45
<b>Metodika</b>	47
<b>Výsledky</b>	49
<b>Diskuze</b>	54
<b>ZÁVĚRY</b>	60
<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b>	61
<b>PŘÍLOHY</b>	70

## **ABSTRACT**

Genus *Chydorus* or more specifically the species of *Chydorus sphaericus* represents an extremely tolerant freshwater organism, which occurs in littoral zone of almost all kinds of aquatic habitats all over the world. It is usually associated with submerged macrophytes or substrate and also plays a key role in food webs of both vertebrate (fish) and invertebrate predators. Not only is this species in most localities the most common chydorid, but it is quite often the most common filtering cladoceran. Moreover, due to its little morphological variation most small globular representatives of the genus *Chydorus* were in the past all incorrectly ascribed to *Chydorus sphaericus*. However, thanks to more detailed studies it was suggested that so called species *Chydorus sphaericus* was not in fact a single taxonomic entity, but a group of several closely related species. It is clear today that for correct taxonomic decision it is necessary to combine all ecological, morphological, and genetic methods.

The aim of this study was to explore genetical and morphological variation in populations of *Chydorus sphaericus* from localities representing different sets of environmental factors. Four model localities were chosen: eutrophic ponds, temporary pools, mountain lakes and waterbodies affected by mining activities. The genetic structure was tested by comparing DNA sequences of partial mitochondrial gene 16S rDNA. The morphological variability was examined mainly by elliptic Fourier methods which focus on the complex outlines of studied organisms.

Based on DNA sequences, all studied populations of the genus *Chydorus* belong to the species *Chydorus sphaericus*. There was very little genetic divergence among populations (0,1 – 1,8 %). Populations formed two distinct clades in the phylogenetic reconstruction (high mountain populations and lowland populations). The high mountain clade also formed a distinct group in computed haplotype network. In the morphometrical analysis, populations divided according to the type of locality, although this distinction was not statistically significant. However, populations from all included localities differed significantly in size, mountain populations being larger than lowland ones.

This study brings the first combined results of genetical and morphometrical analysis of populations of *Chydorus sphaericus* (or of the family Chydoridae in general), and demonstrates great potential for body outlines analysis into better understanding of its ecology.

## ÚVOD

Během posledních několika desetiletí se poměrně intenzivně rozvíjejí takové oblasti ekologie, které se věnují rostoucímu vlivu pozměněného okolního přírodního prostředí (především pak v souvislosti s lidskou činností) na biologii živých organismů.

Pro studium působení různých typů prostředí na organismy jsou vhodné zejména takové taxony, které v přírodě žijí v široké škále podmínek, takže je možné populace z různých lokalit sledovat, porovnávat a případné změny jejich biologie popsat.

Jedním z možných modelových organismů, na kterém lze změny v závislosti na prostředí poměrně dobře testovat, je druh *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller, 1785) z čeledi Chydoridae (Crustacea, Cladocera). *Chydorus sphaericus* je jednou z našich nejběžnějších sladkovodních perlooček vyskytujících se typicky v litorálu stojatých vod. Je obecně považován za kosmopolitní a velmi přizpůsobivý druh, který můžeme nalézt v nejrůznějších vodních ekosystémech, včetně rašelinných a znečištěných, v nížinách i vysoko v horách, v Arktidě i v tropech (Šrámek-Hušek 1962, Fryer 1968, Frey 1980).

Úspěšnost tohoto druhu je připisována hned několika faktorům, z nichž mezi nejdůležitější patří jednak jeho výjimečná fyziologická tolerance vůči rychle se měnícím podmínkám prostředí (Boronat *et al.* 2001), jednak schopnost částečně se vyhnout predačnímu tlaku díky vlastnostem schránky (kulovitý tvar, pevnost) a jednak je to i jeho schopnost přejít z litorálního způsobu života na planktonní a získat tak nový prostor k přežívání (de Eyto *et al.* 2003). Tyto i mnohé další výhody umožňují druhu *Chydorus sphaericus* stát se na řadě lokalit dokonce dominantním zástupcem filtrujících perlooček (Fott *et al.* 1994, Sacherová *et al.* 2006, Hořická *et al.* 2006, Deneke 2000, Frey 1993 atd.).

Vzhledem k odolnosti a šíři podmínek prostředí, v nichž je druh *Chydorus sphaericus* schopen žít a rozmnožovat se, bývá tento druh příležitostně využíván k monitoringu ekologické kvality prostředí či k testům toxicity (de Eyto *et al.* 2002, de Eyto *et al.* 2003, Dekker *et al.* 2006).

Cílem práce bylo zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňují parametry prostředí populace druhu *Chydorus sphaericus*. Prvním cílem bylo odpovědět na otázku, zda všechny populace odebrané na vybraných typových lokalitách lze zařadit do druhu *Chydorus sphaericus* a zda populace z různých stanovišť tvoří geneticky oddělené skupiny.

Druhým cílem bylo porovnat rozdíly ve tvaru jedinců ze stejného souboru lokalit a zjistit, zda některé z parametrů prostředí vyvolají změnu tvaru schránek.

Diplomová práce je rozčleněna do tří hlavních kapitol. První kapitola je literární rešerší shrnující současné poznatky o zkoumaném druhu *Chydorus sphaericus* a o typech lokalit, na nichž je možné výskyt jmenovaného druhu zaznamenat a které byly jakožto modelové zahrnuty do výzkumného projektu této diplomové práce.

Druhá kapitola se věnuje objasnění taxonomického postavení populací rodu *Chydorus*, respektive druhu *Chydorus sphaericus*. Rozebírá molekulárně-genetické metody použité za účelem zjištění, zda jedinci jmenovaného rodu z populací z různých prostředí patří do stejného druhu nebo zda se jedná o různé druhy, a diskutuje nad získanými výsledky.

Třetí kapitola se zaměřuje na analýzu populací druhu *Chydorus sphaericus* z hlediska jejich morfologie. Konkrétně popisuje princip eliptické Fourierovy analýzy použité ke studiu obrysových rozdílů/podobností jak mezi jednotlivými jedinci v rámci populací, tak i mezi celými populacemi z odlišných lokalit. Na závěr se snaží vysvětlit získaná data a objasnit možné příčiny tvarových odlišností.

**KAPITOLA 1:**  
**STUDOVANÝ ORGANISMUS, MODELOVÉ LOKALITY A**  
**ODBĚRY VZORKŮ**

**Popis studovaného organismu**

**Druh *Chydorus sphaericus***

Druh *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller, 1785) patří do čeledi Chydoridae (Crustacea, Cladocera), jejíž zástupce nalézáme typicky v litorálu stojatých vod. Je obecně považován za kosmopolitního zástupce sladkovodních perlooček, kterého najdeme na všech kontinentech a skoro ve všech typech vod. Obývá jak rašeliniště, tak i poměrně značně znečištěné vody, lze ho zaznamenat v nížinách i vysoko v horách, v Arktidě i tropech (Šrámek-Hušek 1962). Většinou žije ve vztahu k povrchům, ať se jedná o makrovegetaci, vláknité řasy nebo sediment. Jako jeden z mála z této čeledi se ovšem poměrně často vyskytuje i v pelagiálu (Šrámek-Hušek 1962, Fryer 1968, de Eyto *et al.* 2003).

Druh *Chydorus sphaericus* je při pohledu z boku oválný nebo více méně okrouhlý, i když může vykazovat určitou variabilitu ve tvaru těla v různých ročních obdobích (Fryer 1968). Jeho kulovité tělo je mírně bilaterálně zploštělé. Dosahuje délky obvykle do 0,5 mm. Zabarvení schránky bývá proměnlivé, běžně od téměř průhledné až po tmavě hnědou. Povrch schránky je často políčkován, ale políčkování nemusí být zřetelné. Políčka představují okraje epidermálních buněk karapaxu (Fryer 1968). Hlava je nízká a vpředu se mění v ostré, dolů zahnuté rostrum. Labrální destička je na bázi široká, postupně se zužuje, typické je prstíkovité zakončení. Kromě oka složeného má i naupliové oko, které bývá nápadně veliké, většinou jen o málo menší a někdy dokonce i větší než oko složené (Šrámek-Hušek 1962). Dva větší hlavové póry jsou poměrně vzdálené od zadního okraje hlavového štítu, menší póry jsou mezi nimi (Duigan a Murray 1987). Antenuly jsou vždy krátké a nedosahují ani na vrchol rostra (Smirnov 1996). Obě větve antén jsou tříčlánkové a jsou vybaveny 7 plovacími brvami (Šrámek-Hušek 1962). Postabdomen je obvykle poměrně krátký a má na hřbetě na každé straně řitního otvoru řadu maličkých trnů, jejichž počet se druhově značně liší v rozmezí 8 až 15. Koncové drápky postabdomenu mají dva drobné bazální trny. Samečkové jsou oproti samičkám nižší a menší, mají tupější rostrum, na prvním páru hrudních končetin mají kopulační háček a liší se i tvar hlavového štítu a postabdomenu (Šrámek-Hušek 1962). Partenogenetické samice mají vždy dvě vajíčka,

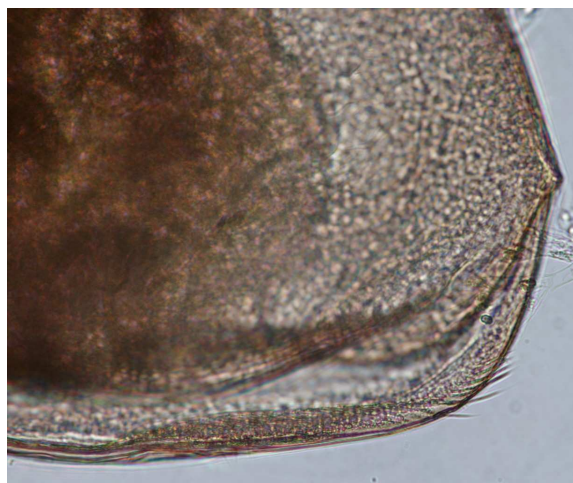


trvalé vajíčko uložené v efipiu je zpravidla jedno (výjimkou jsou druhy *Ch. ovalis* a *Ch. biovatus*, u kterých jsou vajíčka 2) (Smirnov 1996, Fryer 1968).

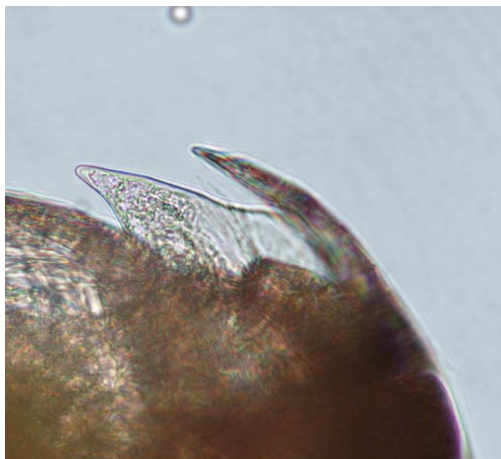
Fotodokumentace vybraných znaků je uvedena na obrázcích 1 – 8.



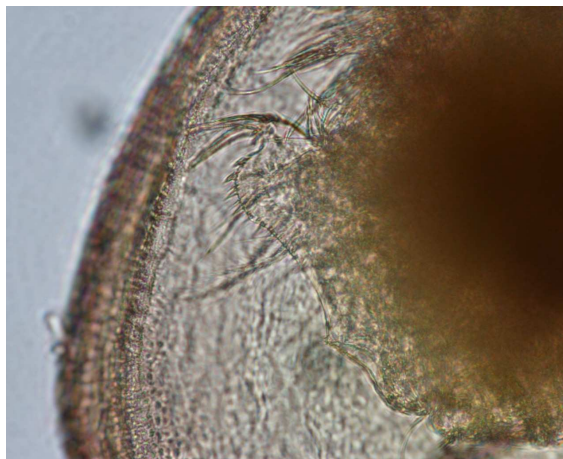
Obr. 1: Celkový tvar těla – boční pohled  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto: L. Matušková)



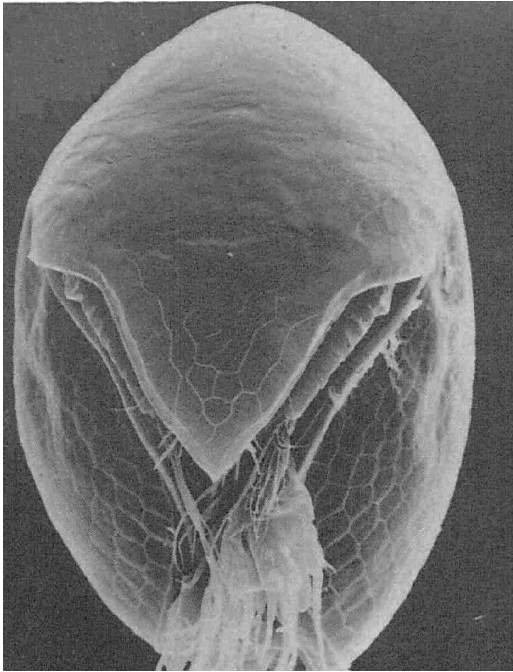
Obr. 2: Obrvené lišty na vnitřních stěnách  
schránek (*Chydorus sphaericus*)  
(foto: L. Matušková)



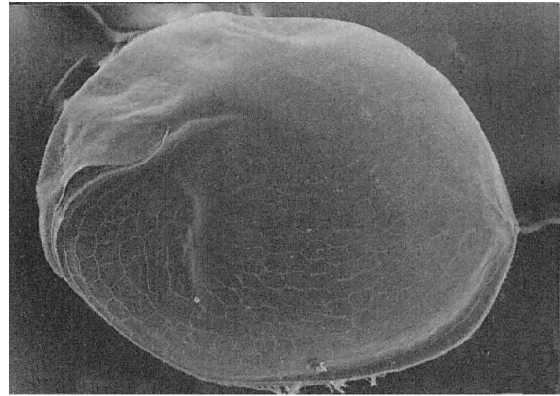
Obr. 3: Labrální destička  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto: L. Matušková)



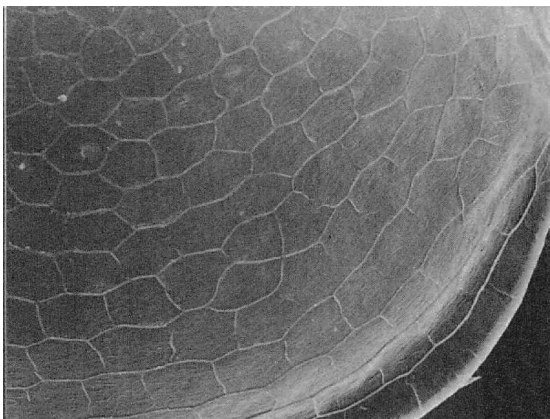
Obr. 4: Tvar a ozubení postabdomenu  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto: L. Matušková)



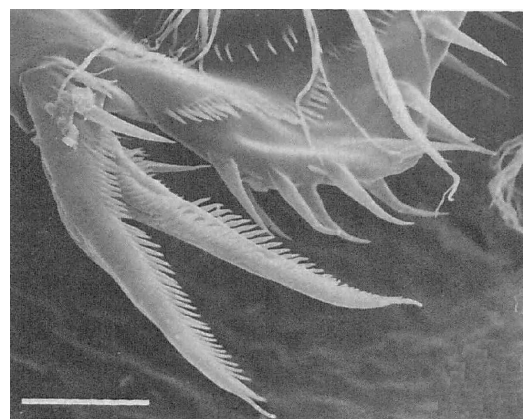
Obr. 5: Celkový tvar těla – přední pohled  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto SEM: Duigan a Murray 1987)



Obr. 6: Celkový tvar těla – boční pohled  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto SEM: Duigan a Murray 1987)



Obr. 7 : Políčkování schránky  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto SEM: Duigan a Murray 1987)



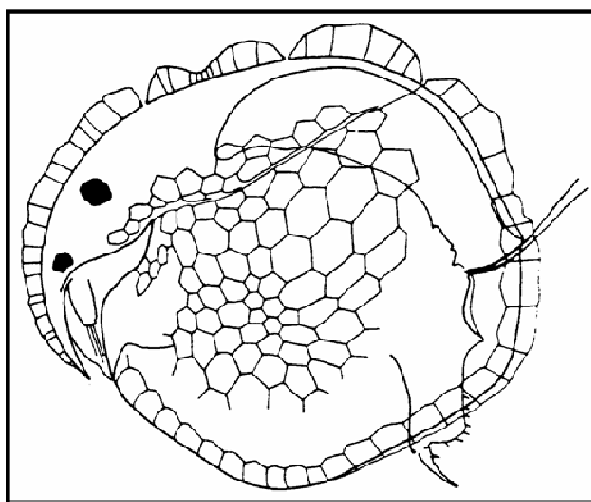
Obr. 8: Drápky postabdomenu  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto SEM: Duigan a Murray 1987)

Mezi důležité determinační znaky z výše vyjmenovaných patří zejména celkový tvar a velikost, počet drápků na postabdomenu a jeho tvar, uspořádání hlavových pórů, velikost a tvar rostra, počet brv na anténách, poloha vnitřní obrvené lišty na ventrální straně schránky (Smirnov 1996, Šrámek-Hušek 1962, Frey 1980).

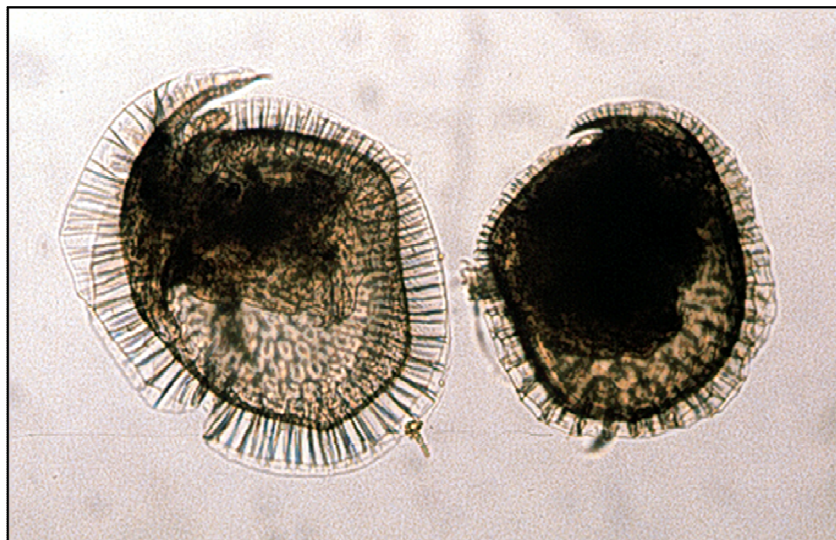
## Morfologická variabilita a taxonomie

Druh *Chydorus sphaericus* je na první pohled velmi málo morfologicky variabilní, nenalzáme u něj výrazné změny tvaru ani cyklomorfózu, jak je známe například u rodů *Daphnia* nebo *Bosmina* (např. Laforsch a Tollrian 2004, Kappes 2002, Hellsten 1999). Možná i proto je považován za kosmopolitní druh, jelikož jak napsal D.G. Frey ve své práci z roku 1980: „Besides death and taxes, one of the accepted certainties of our modern world has been that nearly all small subglobular individuals of *Chydorus* belong to the species *sphaericus*.“, a většina malých kulovitých jedinců je skutečně při studiu druhového složení zooplanktonu bez detailnějšího zkoumání označena jako *Ch. sphaericus*. Při podrobnějším srovnávání jedinců a zvláště celých populací lze ovšem nalézt celou řadu rozdílů, přičemž některé z nich mohou být závislé například i na stáří jedince (Duigan a Murray 1987, Smirnov 1996). Jedním z druhů, které byly popsány na základě detailního pohledu, je například i druh *Chydorus brevilabris* (Frey 1980).

V rámci rodu *Chydorus* ovšem existují i druhy s výraznými morfologickými znaky, které naznačují jistý potenciál pro tvarovou změnu jedinců tohoto rodu. Nejvýraznějším příkladem je skupina druhů, u nichž je políčkování buněk karapaxu dovedeno do extrému, okraje buněk jsou vytáhlé a schránka má „ježkovitý“ tvar (Obr. 9). Týká se to například druhů *Ch. faviformis* (Obr. 10), *Ch. bicornutus* (Obr. 10), *Ch. obscurirostris*, *Ch. bicollaris* či *Ch. pubescens* (Fryer 1968, Smirnov 1996). Zajímavé přitom je, že například u druhu *Ch. faviformis* mají tyto struktury pouze samice, samci se podobají samcům například druhu *Ch. sphaericus* (Smirnov 1996).

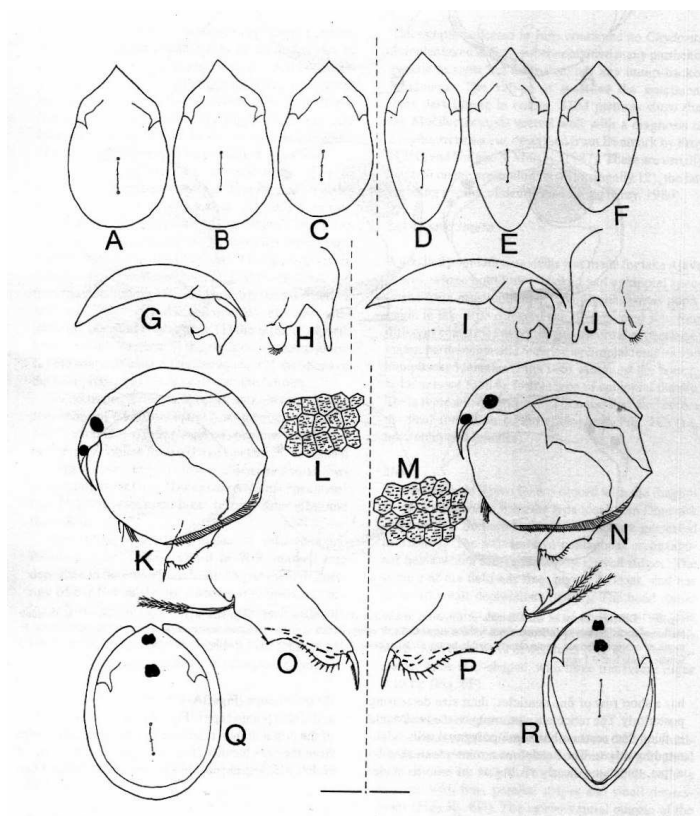


Obr. 9: „Ježkovitý“ vzhled některých druhů rodu *Chydorus* – vytáhlé okraje buněk karapaxu; políčkování (Smirnov 1996)



Obr. 10: *Chydorus bicornutus* (vlevo) a *Chydorus faviformis* (vpravo)  
(foto: V. Sacherová)

Na druhé straně ovšem existuje řada prací, které si naopak všímají malých morfologických odlišností a považují je za znaky determinující nové druhy. Příkladem může být např. *Ch. mutilus*, který byl popsán jako samostatný druh na základě specifického „hrbu“ na dorzální straně samic (Kreis 1921). Dnes se o něm ale soudí, že se jedná o postefipiální formu druhu *Ch. sphaericus* (Brancelj 1996) (Obr. 11).



Obr. 11: Srovnání partenogenetické formy *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller, 1785) (vlevo) a její postephipiální formy – t.j. *Chydorus mutilus* (vpravo), z jezera Rjavo (Slovinsko). A-F: tvary hlavového štítu (dorzální pohled); G, I: tvary hlavového štítu (laterální pohled); H, J: tvar labrální destičky; K, N: celkový tvar dospělce; L, M: detail políčkování; O, P: postabdomen; Q, R: dospělci z nadhledu. (Brancelj 1996)



Podobně je tomu i s formou *Ch. minor*, o němž se Lilljeborg (1900) (podle Frey 1980) i Sars (1890) (podle Frey 1980) původně domnívali, asi díky jeho malé velikosti, že jde o nezávislý druh. Později se ale ukázalo, že se jedná opět o varietu druhu *Ch. sphaericus* (Frey 1980). Stejně tak i „druhy“ *Ch. herrmanni* a *Ch. rylovi* jsou dnes považovány za morfotypy *Ch. sphaericus*. U mnoha dalších forem je ale zařazení stále sporné, např. *Ch. arcticus* je Smirnovem (1996) považován za morfotyp *Ch. sphaericus*, kdežto Røen (1987) ho považuje za samostatný druh, který se specifickým způsobem adaptoval na arktické podmínky.

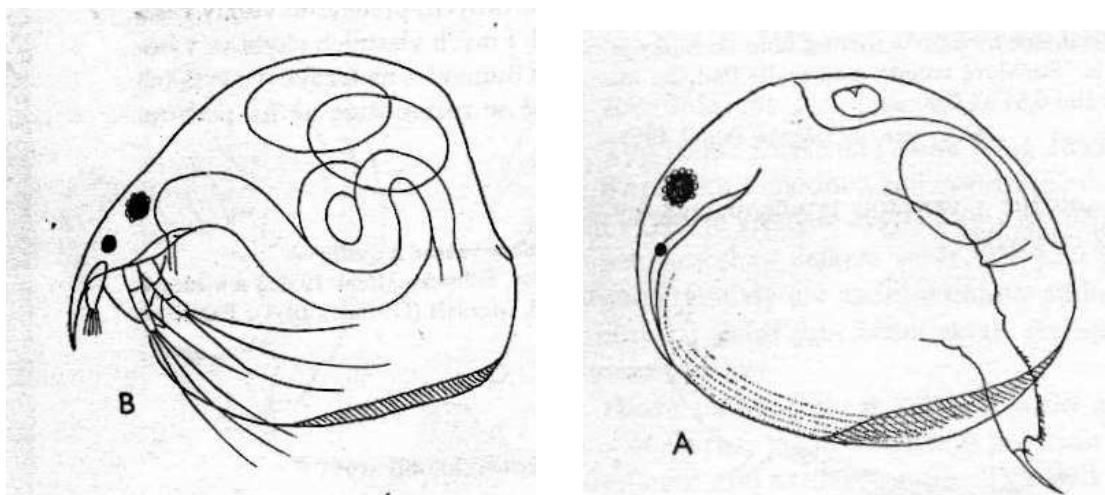
Řada autorů se pokoušela o klasifikaci jednotlivých forem/variet/druhů rodu *Chydorus*, které jsou shrnuty v následujícím přehledu (Tabulka 1).

Tabulka 1. Jednotlivé popsané druhy (formy) rodu *Chydorus* podle: Smirnov 1996; Šrámek-Hušek 1962; Brancelj 1996. Zvýrazněné jsou ty, které Frey (1980) považuje za členy komplexu *Chydorus sphaericus*.

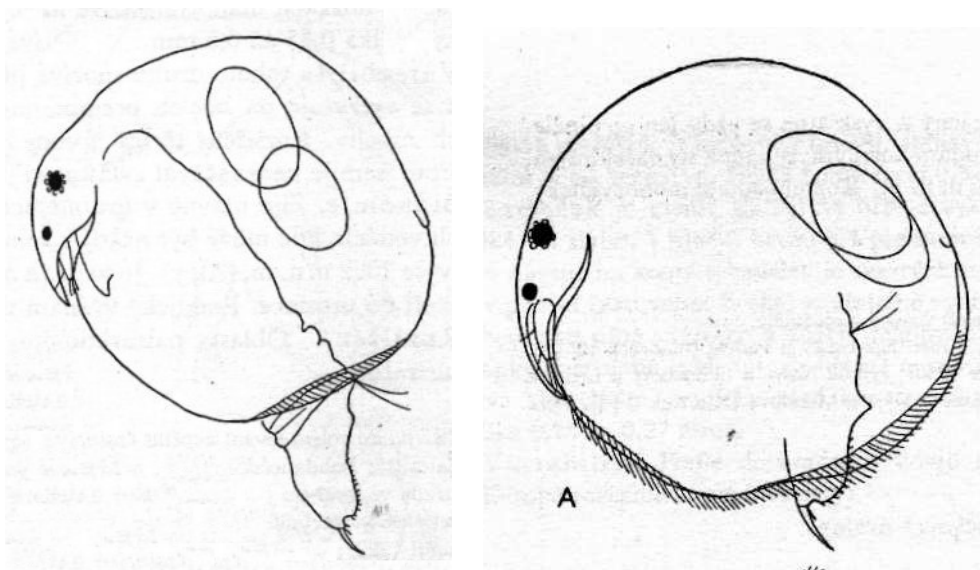
<i>Ch. albicans</i> (Gay, 1849)	<i>Ch. latifrons</i> Dana, 1852
<b><i>Ch. alexandrovii</i> Poggenpol, 1874</b>	<b><i>Ch. latus</i> Sars, 1862</b>
<i>Ch. angustirostris</i> Frey, 1987	<i>Ch. linguilabris</i> Frey, 1982
<i>Ch. arcticus</i> Roen, 1987	<b><i>Ch. leonardi</i> King, 1853</b>
<i>Ch. baicalensis</i> N.N. Smirnov & N.G. Sheveleva, 1996	<i>Ch. macquariensis</i> Brady, 1918
<i>Ch. bicornutus</i> Doolittle, 1909	<b><i>Ch. minor</i> Sars, 1891; Lilljeborg, 1900</b>
<i>Ch. bicollaris</i> Frey, 1982	<i>Ch. minutus</i> Thompson, 1879
<i>Ch. biovatus</i> Frey, 1985	<b><i>Ch. mutilus</i> Kreis, 1921</b>
<i>Ch. brehmi</i> Biswas, 1966	<b><i>Ch. nitidus</i> Schoedler, 1858</b>
<i>Ch. brevidentatus</i> Chiang Sieh-chin, 1963	<i>Ch. nutidulus</i> (Sars, 1901)
<b><i>Ch. brevilabris</i> Frey, 1980</b>	<i>Ch. obscurirostris</i> Frey, 1987
<i>Ch. canadensis</i> Chengalath & Hann, 1981	<i>Ch. opacus</i> Frey, 1987
<i>Ch. carolinae</i> Methuen, 1910	<i>Ch. ovalis</i> Kurz, 1874
<b><i>Ch. caelatus</i> Schoedler, 1862</b>	<i>Ch. parvireticulatus</i> Frey, 1987
<i>Ch. ceylonicus</i> Daday, 1898	<i>Ch. parvus</i> Daday, 1898
<i>Ch. ciliatus</i> Poggenpol, 1874	<b><i>Ch. patagonicus</i> Ekman, 1900</b>
<i>Ch. clelandi</i> Henry, 1919	<i>Ch. piger</i> Sars, 1861
<i>Ch. denticulatus</i> Brehm, 1934	<i>Ch. pizzarri</i> Alonso, 1988
<i>Ch. dentifer</i> Daday, 1905	<b><i>Ch. punctatus</i> Hellich, 1877</b>
<i>Ch. euynotus</i> Sars, 1901	<i>Ch. pubescens</i> Sars, 1901
<i>Ch. faviformis</i> Birge, 1893	<i>Ch. reticulatus</i> Daday, 1898
<i>Ch. gibbus</i> Sars, 1890	<b><i>Ch. rylovi</i> Mukhamediev, 1963</b>
<i>Ch. gibsoni</i> Brady, 1906	<b><i>Ch. sphaericus</i> (O.F. Müller, 1785)</b>
<i>Ch. globosus</i> Baird, 1843	<i>Ch. striatus</i> Klocke, 1893
<i>Ch. godeti</i> Delachaux, 1919	<i>Ch. sinensis</i> Frey, 1987
<b><i>Ch. herrmanni</i> Brehm, 1934</b>	<i>Ch. tilhoi</i> Rey & Saint-Jean, 1969
<i>Ch. invaginatus</i> Frey, 1982	<b><i>Ch. tuberculatus</i> Poggenpol, 1874</b>
<i>Ch. kallipigos</i> Brehm, 1934	<i>Ch. undulatus</i> Chiang, 1963

Přesné taxonomické zařazení těchto popsaných variant je ovšem značně nejasné a komplikované. Smirnov (1996) je rozděluje do několika fylogenetických linií (v závorkách je zjednodušeně uvedeno, o jaké formy se jedná) : linie 'sphaericus' (formy se 7 brvami na anténách ), linie 'ovalis' (formy s 8 brvami na anténách ), linie 'eurynotus' (tropické formy) a linie 'faviformis' (formy s „ježatými“ schránkami); přičemž linie 'sphaericus', jejímž typovým druhem je *Chydorus sphaericus*, je asi nejkontroverznější. Frey (1980), který se zabýval komplexem *Chydorus sphaericus*, rozděluje tento komplex na dvě linie: linie 'sphaericus' a linie 'brevilabris', které se liší ve vzdálenosti hlavových pórů, a to jednak od sebe navzájem a jednak od zadního okraje hlavového štítu a navíc se liší i tvarem labrální destičky, která není u linie 'brevilabris' prstíkovitě zakončena.

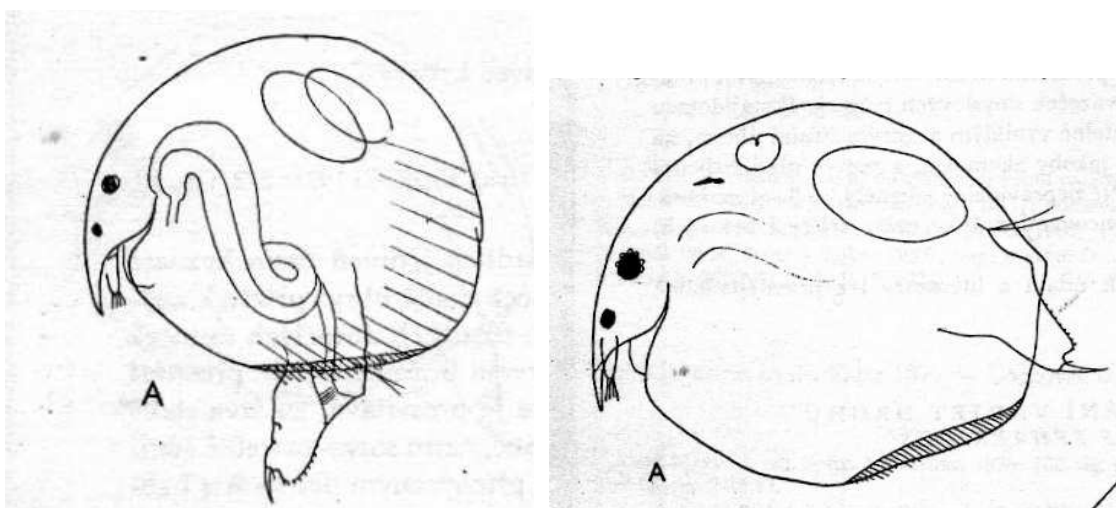
Na našem území bylo doposud zaznamenáno následujících šest forem: *Chydorus globosus* Baird 1843, *Chydorus gibbus* Sars 1890, *Chydorus piger* Sars 1861, *Chydorus sphaericus* (O.F. Müller 1785), *Chydorus latus* Sars 1862 a *Chydorus ovalis* Kurz 1874. R. Šrámek-Hušek považuje tyto formy za jednotlivé druhy (Šrámek-Hušek, 1962). O tom, které z těchto „druhů“ jsou skutečnými druhy, by se ale dalo opět polemizovat. Existují totiž domněnky, že *Ch. gibbus*, *Ch. latus* a možná i *Ch. piger* jsou ve skutečnosti jen morfotypy druhu *Ch. sphaericus* (Smirnov 1996). Obrázky jednotlivých druhů/morfotypů na našem území (Obr. 12-17).



Obr. 12, 13: *Chydorus gibbus* (vlevo) a *Chydorus globosus* (vpravo)  
(kresba: Šrámek-Hušek 1962)



Obr. 14, 15: *Chydorus latus* (vlevo) a *Chydorus ovalis* (vpravo)  
(kresba: Šrámek-Hušek 1962)



Obr. 16, 17: *Chydorus piger* (vlevo) a *Chydorus sphaericus* (vpravo)  
(kresba: Šrámek-Hušek 1962)

Je také zřejmé, že otázku, které z morfologicky odlišných variant lze považovat za samostatné druhy a které pouze za odlišné morfotypy těchto druhů, vzniklé např. vlivem vnějšího prostředí, nelze zodpovědět bez doplnění morfologických studií o molekulárně genetické metody, které příbuznost populací mohou jasně prokázat/vyvrátit (Colbourne 1996, Duffy 2004 aj.)

### **Reakce na prostředí**

U populací, které jsou morfologicky odlišné, je možné předpokládat, že některé morfologické rozdíly mohou být vyvolané např. působením pozměněných parametrů

vnějšího prostředí. Konkrétně zvýšená pigmentace morfortypů ve vysokohorských jezerech je dána zvýšenou intenzitou UV záření, jelikož melaniny a karotenoidy slouží jako ochrana před tímto zářením (Rautio a Korhola 2002a). Nízké pH nebo vyšší salinita pak mohou způsobit tvarové změny buněk karapaxu v důsledku ochrany proti těmto nepříznivým podmínkám, popřípadě může být vyvolána změna celkového tvaru schránky. Mimoto je známa i určitá plasticita v tloušťce schránek v závislosti na okolním prostředí, která byla pozorovaná například u rodu *Daphnia*. Laforsch *et al.* (2004) tuto plasticitu vysvětlují jako možný způsob reakce na přítomnost predátorů (Laforsch *et al.* 2004). Do jaké míry je ale prostředí schopné tyto změny vyvolat, se zatím přesně neví.

O přímém vlivu prostředí na druh *Chydorus sphaericus* víme především to, že je značně přizpůsobivý a tolerantní vůči zhoršeným podmínkám prostředí. Snáší například velmi široký rozsah pH (byl pozorován při pH 3,2-10,6, Deneke 2000) či vyšší salinitu (Frey 1993). Je značně odolný i vůči nízkým koncentracím rozpuštěného kyslíku ve vodě (letální koncentrace při teplotě 19-21°C činí 0,36 mg/l) (Fryer 1968) nebo k vysokým teplotám (letální teplota je 38°C) (Fryer 1968). Díky této vysoké toleranci se *Chydorus sphaericus* stává na mnoha místech nejen nejběžnějším představitelem čeledi Chydoridae, ale nejběžnějším představitelem filtrujících perlooček vůbec. V oligotrofních acidifikovaných vysokohorských jezerech například velmi často dominuje (Fott *et al.* 1994, Sacherová *et al.* 2006, Hrbáček *et al.* 1974). Poměrně odolný je i v širokém gradientu toxických látek, např. z důlní činnosti (Deneke 2000, Wollman *et al.* 2000), což umožňuje jeho využití v testech toxicity, kdy určení vlivu kontaminujících látek (např. Cu, Cd, NH<sub>3</sub> aj.) na tento druh může pomoci při stanovování potenciálního vlivu těchto látek na ostatní členy vodního společenstva (Dekker *et al.* 2006, Bossuyt a Janssen 2005).

### **Popis modelových lokalit**

Pro posouzení vlivu rozlišného vodního prostředí na biologii živého organismu, v tomto případě druhu *Chydorus sphaericus*, bylo vybráno několik modelových lokalit. Jednalo se konkrétně o acidifikovaná vysokohorská jezera, nádrže vznikající v souvislosti s důlní činností, eutrofní rybníky a drobné tůně převážně periodického charakteru. Všechny tyto rozmanité lokality se navíc nacházejí na relativně malém území České republiky nebo v jejím nejbližším okolí, což bylo velmi vhodné z hlediska sběru dat a materiálu.



## **Vysokohorská jezera**

Vysokohorská jezera představují zcela specifické ekosystémy s celou řadou charakteristických faktorů. Mezi nejdůležitější patří krátká vegetační sezóna a dlouhá doba pokrytí jezer ledem, navíc pro jezera ležící v zóně nad hranicí lesa je to dále oligotrofie, ve většině případů absence makrovegetace a převážně kamenitá litorální zóna (Kopáček *et al.* 2006, Sacherová *et al.* 2006).

Jako modelová byla pro tuto diplomovou práci zvolena vysokohorská jezera v Tatrách, která jsou zajímavá tím, že často reprezentují lokality, které prošly v důsledku intenzivní antropogenní činnosti v průběhu 80. let minulého století procesem acidifikace a nyní jsou ve fázi zotavování z acidifikace. Přesto v mnoha jezerech dosud přetrvávají průvodní jevy acidifikace, totiž snížené pH a přítomnost toxických forem některých kovů (zejména Al, Fe, Zn, Cu a Pb). Důvodem je mimo jiné i fakt, že řada jezer leží na žulovém podloží s nízkou pufrací kapacitou, což zpomaluje zpětné navracení k původním podmínkám. (Kopáček *et al.* 2006, Sacherová *et al.* 2006).

Nám nejbližší jezera tohoto typu jsou jezera ve Vysokých a Polských Tatrách. U tatranských jezer v nadmořské výšce nad 2000 m je obvyklé i zalednění od října až do června. Navíc průměrná roční teplota vzduchu, která klesá o 0,6°C na každých 100 m nadmořské výšky, se pohybuje v rozmezí 1,6 až -3,8°C v nadmořské výšce mezi 1778 a 2635 m (Kopáček *et al.* 2006), takže se jezera nemohou příliš ohřát a teplota vody je celoročně relativně nízká.

Další zmiňovanou vlastností horských jezer je jejich oligotrofní charakter. Průhlednost vody je obecně vysoká, obsah živin ve vodě je nízký. Vlivem nízkého pH také dochází k vysrážení huminových kyselin, které obvykle snižují průhlednost, a voda v jezerech je tudíž díky těmto dvěma faktorům často průhledná až na dno. Díky tomu jsou organismy, které v těchto jezerech žijí, vystaveny zvýšené intenzitě UV záření, které proniká i do hlubších vrstev vody. Je možné pozorovat, že druhy žijící v horském jezeře vykazují oproti týmž druhům vyskytujícím se třeba v nížinném rybníku výrazně tmavší zbarvení (díky přítomnosti melaninů nebo karotenoidů) (např. Hansson L.A. 2000, Hansson L.A. 2004, Tollrian a Heibl 2004, Rautio a Korhola 2002b, Vinebrooke a Leavitt 1999, Hebert a Emery 1990). To platí i pro studovanou populaci.

(Fotodokumentace dokládající barevný rozdíl u druhu *Chydorus sphaericus* – Obr. 18 a 19).



Obr. 18: Světlé zbarvení  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto: L. Matušková)



Obr. 19: Tmavé zbarvení  
(*Chydorus sphaericus*)  
(foto: L. Matušková)

Diverzita planktonního společenstva horských jezer je obecně nízká. Jen málo organismů je schopno přizpůsobit se a přežít v nepříznivých podmínkách, jež jezera nabízejí. Zcela typickými zástupci jsou druhy z čeledi Chydoridae, kteří se obecně hojně vyskytují v přirozeně kyselých vodách (rašeliniště apod.). Nejběžnějším a zároveň často i dominantním druhem je *Chydorus sphaericus*. Dále se relativně hojně vyskytují druhy *Alona affinis*, *Alona quadrangularis* či *Acroperus harpae*. V menší míře lze ale nalézt i druhy *Eurycercus lamellatus*, *Alonella excisa*, *Alona rectangula* či *Alona guttata* (Sacherová *et al.* 2006). Z dalších zástupců třídy Cladocera lze nalézt druhy jako *Ceriodaphnia quadrangula*, *Daphnia longispina* a *Bosmina longirostris*. Z podtřídy Copepoda se objevují hlavně druhy *Acanthocyclops vernalis*, *Eucyclops serrulatus* a *Arctodiaptomus alpinus*, které jsou rovněž známy svou tolerancí k nízkým hodnotám pH (Hořická *et al.* 2006, Sacherová *et al.* 2006, Vranovský 1992).

### **Důlní vody**

V oblastech, kde stále probíhá intenzivní těžba nerostných surovin, ale i v oblastech dnes už k těžbě nevyužívaných, dochází k výraznému ovlivnění jak podzemních, tak povrchových vod (Banks *et al.* 1997, García-Criado *et al.* 1999, Soucek *et al.* 2000, Nixdorf 2005, Ji-Eun a Yeongkyoo 2008). Vody odtékající z důlních děl, ale i z výsypek (násyp hlušiny horninového odpadu) jsou charakteristické svým specifickým složením a všude na světě jsou si v zásadě podobné. Tyto důlní vody obvykle zásobují jezera na dně důlní propadliny nebo zatopená šterkoviště, odkud pak voda odtéká dále do povodí a

negativně ovlivňuje rybníky, řeky a spodní vody, které se v povodí nacházejí. Záleží při tom samozřejmě na míře znečištění a na vzdálenosti od zdroje. Obecně bývají důlní vody označovány termínem Acid mine drainage – AMD (Hezina 2000).

Jak už tento termín napovídá, je pro naprostou většinu důlních vod charakteristické nízké pH a kromě toho i obohacení o rozpuštěné ionty. Důlní činnost umožňuje přístup kyslíku do hlubších geologických vrstev, což má za následek zvýšenou oxidaci primárních minerálů, které se zde nacházejí a které byly původně v redukováném stavu (ke stejné oxidaci dochází i v případě, že jsou primární minerály vynášeny z důlních šachet na povrch a ukládány na výsypkách) (Banks *et al.* 1997). Nejběžnějšími minerály, k jejichž oxidaci dochází, jsou zejména disulfid železnatý ( $\text{FeS}_2$ ) neboli pyrit a dále také sulfidy typu  $\text{XS}_2$ , kde  $\text{X} = \text{As}, \text{Bi}, \text{Cd}, \text{Co}, \text{Cu}, \text{Ga}, \text{In}, \text{Hg}, \text{Mo}, \text{Pb}, \text{Sb}, \text{Zn}, \text{Se}$  aj. (Banks *et al.* 1997). Po uzavření dolu dochází k radikální změně hydrologického režimu, je ukončeno aktivní odčerpávání podzemních vod a nastává postupné zaplavování dolu vodou. Poté, co podzemní vody vystoupají na úroveň tzv. dědičné šachty, se sice omezí přístup kyslíku a sníží se tak i oxidace minerálů, na druhé straně se však do vody vyluhují složky, které byly uvolněny v průběhu aktivní činnosti dolu (Banks *et al.* 1997). Vzhledem k tomu, že se obvykle ještě sníží promývání celé oblasti srážkovými vodami, které pórové vody ředily, dochází k prudkému zvýšení salinity vlivem nárůstu koncentrací různých iontů ve vodě. Jde hlavně o kationty železa a v závislosti na druhu těžené suroviny i dalších kovů (viz výše), z aniontů jsou to pak zejména sírany, jež v reakci s vodou tvoří kyselinu sírovou, která následně působí výrazné snížení pH důlních vod (Banks *et al.* 1997, Soucek *et al.* 2000). pH těchto vod může klesnout i na hodnoty menší než 3 (Wollmann *et al.* 2000).

Nízké pH a vysoké koncentrace iontů nejrůznějších prvků, zvláště pak těžkých kovů, se na těchto mladých lokalitách v raném stádiu sukcese odráží jak v nízké druhové bohatosti organismů, tak i v celkově malém množství biomasy (Soucek *et al.* 2000). Pro zooplankton důlních jezer jsou typická zejména Rotifera (*Cephalodella hoodi*, *Elosa woralii*, *Brachionus sericus*), důležitými kolonizátory těchto habitatů jsou také zástupci řádu Cladocera (četné jsou druhy *Chydorus sphaericus*, *Acroperus harpae*, *Scapholeberis mucronata*, *Bosmina longirostris*, *Ceriodaphnia pulchella*, *Sida crystallina*) a zástupci podtřídy Copepoda (např. *Diacyclops* sp.) (Belyaeva a Deneke 2007, Wollmann *et al.* 2000, Deneke 2000).

Hlavní oblasti těžby nerostných surovin na našem území leží na Ostravsku (Ostravsko-karvinská pánev, tj. jižní část Hornoslezské pánve, zasahující k nám z Polska), kde se v hlubinných dolech těží černé uhlí, a v Podkrušnohoří, kde se v převážně povrchových dolech těží hnědé uhlí. V obou těchto oblastech se ale nacházejí i doly, které byly v minulosti (zejména v 90. letech minulého století) v důsledku útlumu těžby uzavřeny (např. doly Antonín, Medard, Michal, Anežka, Felicián atd.). Asi největší množství vod souvisejících s důlní činností, ať už se jedná o vybudované rekultivační nádrže nebo o vodní plochy vzniklé samovolným přírodním zatopením důlních propadlin, se nalézají právě v Podkrušnohoří. Příkladem dolů a lomů, které již byly zatopeny vodou, nebo u nichž se hydrický způsob rekultivace teprve plánuje, jsou lomy Boden, Medard-Libík, Michal, Jiří a Družba, Ležáky, Most atd. ([1], [2]). Kromě nádrží vzniklých na místě původního lomu či dolu, existuje i celá řada umělých vytvořených nádrží či „jezírek“, která byla zřízena přímo na výsypkách v rámci postupné územní rekultivace. Příkladem takových „jezírek“ jsou Žluté jezírko, Přikrylovo červené jezírko, nádrže Milena, Jaroslav, Miroslav atd. (i část vzorků použitých v této diplomové práci, pochází právě z uměle založených nádrží na území Podkrušnohorské výsypky).

### **Eutrofní rybníky**

Česká republika patří k těm zemím, v nichž má rybníkářství velmi dlouhou tradici a kde jsou rybníky nejběžnějším typem stojatých vod. Na celém našem území je evidováno na téměř 50 000 větších či menších rybníků, které pokrývají plochu o velikosti přibližně 52 000 ha. Za asi nejvýznamnější oblast, co do počtu a rozlohy rybníků, můžeme označit jižní Čechy, respektive Třeboňsko. Zde se nalézají zhruba 7 000 rybníků o celkové rozloze okolo 25 000 ha (Myšiak *et al.* 2004).

Téměř všechny naše rybníky mají průměrnou hloubku menší než 1,5 m a maximální zpravidla menší než 3 až 5 m (nejhlubší rybník Staňkovský má maximální hloubku kolem 15 m), plošná velikost jednotlivých rybníků se pohybuje od méně než 1 ha až po několik 100 ha (největší rybník Rožmberk má rozlohu asi 1 000 ha) (Myšiak *et al.* 2004, Hartman *et al.* 2005).

Oproti minulosti, kdy měly naše rybníky oligotrofní či mezotrofní charakter, je naprostá většina z nich v dnešní době eutrofních, často až hypertrofních. Zvýšená trofie je dána nadměrnou koncentrací dusíku ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), fosforu ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) a organických látek ve vodě. Tyto se do vody dostávají v důsledku intenzifikace hospodaření používáním

hnojení a krmení, ale také v důsledku zvýšených splachů, obsahujících minerální hnojiva, ze zemědělského povodí. Dalším, i když spíše vzácným, zdrojem jsou nedostatečně čištěné komunální odpadní vody obsahující fosfátové prací prášky a fekálie (Hally 2002).

Typickým znakem eutrofních rybníků je velmi nízká průhlednost (mezi 0,5 až 2 m, u hypertrofních vod je menší než 0,5 m (OECD 1982), vysoká úživnost, přítomnost ryb (= predátorů), anoxická vrstva u dna (Pokorný 2002), vyšší pH (až 8,0; Hally 2002), hustý porost makrovegetace v litorální zóně.

Díky vysoké úživnosti je množství živočišné biomasy v našich rybnících značně veliké a druhová pestrost je obvykle ovlivněna populační hustotou ryb. V rybnících, kde je nízká populační hustota ryb, dominují velké druhy ze skupin, jako jsou například Cladocera a Copepoda; menší význam mají i Rotifera. V rybnících s vysokou populační hustotou ryb dominují spíše menší zástupci těchto skupin a hojně se vyskytují Rotifera (Kořínek *et al.* 1987).

Morfologická variabilita jednotlivých zástupců zooplanktonu, kteří se pohybují hlavně v pelagiálu, je pak vyvolávána především přítomností predátorů nebo změnou teploty (respektive viskozity) vody. Pozorované byly například různé typy cyklomorfóz (tzv. inducible defences) (Laforsch a Tollrian 2004, Lass 2003 aj.). U organismů, které jsou převážně litorální a v pelagiálu se vyskytují spíše zřídka, jako je třeba druh *Chydorus sphaericus*, podobné tvarové změny zatím popsány nebyly.

## **Tůň**

Tůň jsou unikátní, dynamické a ekologicky velmi významné systémy. Jedná se o sladkovodní habitaty přirozeného nebo umělého původu, které lze podle podmínek krajiny, v níž se vyskytují, rozdělit na několik hlavních typů: 1) tůň v nivách potoků a řek (včetně rašelinných tůní v pramenných oblastech), 2) tůň v blízkosti rybníků nebo rybníčních soustav a 3) tůň v otevřené zemědělské krajině (Hlaváč a Jermlová 2005). Nejhojněji se vyskytujícím typem jsou tůň nacházející se při řekách či potocích, které vznikají oddělením od mrtvých ramen rozvětvených toků nebo zatopením terénní deprese v okolní nivě. Tůň v blízkosti rybníků nebo v zemědělské krajině se nacházejí buďto v plochých podmáčených loukách, které byly v minulosti často zaváženy zeminou a zarovnávané s okolním terénem, nebo jsou budovány mezi poli, která byla původně velkoplošně odvodněna a kde dnes nahrazují ekosystémy pramenišť (Hlaváč a Jermlová 2005).

Tůňe jsou zpravidla izolované a za normálního stavu vody nebývají spojeny s tokem ani jiným vodním ekosystémem. V případě, že se nachází ve větším počtu na malém území, a tudíž v těsné blízkosti, mohou být vzájemně propojené prostřednictvím přirozených půdních drenáží (Prach 2003, [3], [4]). Pro tůňe je charakteristické také to, že jsou nevypustitelné, a v období, kdy jsou zaplněné vodou, představují obohacení zásob povrchové vody (Just *et al.* 2005).

Tůňe mají buďto ráz trvalé vodní plochy nebo, což je mnohem častější, jsou periodické. Trvalé tůňe jsou vodou zásobovány konstantně a jejich objem je během sezóny víceméně stálý. Naproti tomu periodické tůňe se plní jen občasně a mají v průběhu roku proměnlivý rozsah v závislosti na měnícím se přísunu vody z okolního prostředí (Just *et al.* 2005). Periodicita jednotlivých tůní může být nadto více či méně pravidelná, od tůní, které se plní každoročně až po tůňe, které se v důsledku sucha naplní jen jednou za několik let. Z periodických tůní jsou významné zejména tůňe jednoleté, které se zavodňují pravidelně, a to obvykle brzy na jaře. Tyto tůňe jsou syceny především záplavovými vodami z tajícího sněhu a ledu, vytrvalými jarními dešti nebo průsaky z propustných vrstev, v průběhu časného léta je zásobují bouřkové lijáky a v pozdním létě pak pravidelně vysychají. Při zmenšujícím se objemu pak dochází současně ke zvyšování kolísání už tak nestálé teploty vody a zvyšování koncentrace rozpuštěných i nerozpuštěných látek. V některých letech, kdy je extrémní sucho, může dojít i k případu, že se tůň nenaplní vůbec (Hartman *et al.* 2005, [2]).

Tůňe jsou obvykle mělké a rychle se zazemňující prohlubně zaplněné vodou, jejichž charakter je ovlivněn mnoha faktory. Kromě hloubky, velikosti, délky trvání záplav a srážek, geologie podloží a vlastností substrátu dna je to také povaha okolní vegetace. Tůňe nacházející se v lesních porostech bývají zastíněné okolními stromy a značně zanesené nejružnějším organickým materiálem, nejčastěji se jedná o spadané listí, které se usazuje na dně, rozkládá se a stává se zdrojem živin pro společenstvo uvnitř tůně. Oproti tomu tůňe vzniklé na otevřeném území bývají dobře prosvětlené a zdrojem živin bývá hlavně fytoplankton, který se zde hojně rozvíjí (Hartman *et al.* 2005, Valoušek 1951, Prach 2003, Sovíková 1996).

Vzhledem k dostatku energetických zdrojů je oživení tůní bohaté, i když vzhledem k sezonalitě i proměnlivé. Typickými obyvateli jsou organismy s krátkým životním cyklem, které dokážou přežít nepříznivé podmínky (sucho, mráz, nedostatek kyslíku) ve formě odolných stádií (vajíčka, cysty aj.) nebo jsou schopni tůň včas opustit a najít si

nové místo k životu. Klasicky se zde vyskytují nejrůznější zástupci skupin Rotifera, Cladocera, Copepoda, Anostraca, Notostraca, Conchostraca, Ostracoda a larvy hmyzu, z nichž mnoho druhů je vzácných a chráněných. Nutno ale poznamenat, že konkrétní složení společenstva v tůni je vždy závislé na přítomnosti a druhu predátora (Hartman *et al.* 2005, Sovíková 1996).

Dalším specifikem tůní je absence ryb (= predátorů) zapříčiněná izolovaností a nestálostí prostředí, a tudíž v tomto směru snížený predanční tlak (Boix *et al.* 2006). Existují ale i výjimky, kdy se ryby mohou do tůní dostat náhodným splachem z řeky při velké povodni, a v tom případě pak dochází k intenzivnímu žíru a rychlému snížení populační hustoty místního společenstva (Valoušek 1951). Kromě vzácně se vyskytujících ryb patří mezi velké predátory také ptáci a obojživelníci [4]. Z menších predátorů se pak mohou uplatnit i nejrůznější draví bezobratlí, jako např. rod *Chaoborus* (Wissel a Benndorf 1998, Riessen *et al.* 1988).

Co se týká chemických a fyzikálních parametrů vody v tůních, jako třeba množství kyslíku, pH či vodivost, tak ty jsou závislé na hydrologickém režimu každé tůně, a tudíž jsou zcela přirozeně pro každou tůň jedinečné a nezřídka se mezi tůněmi zřetelně liší.

Na území ČR se nachází poměrně velké množství tůní, hojně jsou především v nivách řek a potoků, v menší míře se nacházejí ale i kdekoli jinde. Z ekologicky významných oblastí, kde se poříční tůně nacházejí, lze jmenovat například CHKO Litovelské Pomoraví, CHKO Poodří, CHKO Třeboňsko, NPR Křivé jezero – mrtvé rameno Dyje v CHKO Pálava, NPR Libický luh na Labi, NPR Hrabanovská černava nebo PR Mydlovarský luh. Velké a pravidelně se vyskytující tůně jsou celkem dobře zmapované, kdežto menší, občasné nebo nově vzniklé tůně nejsou mnohdy zaznamenané vůbec (Ezechel 2007).

Tůně jsou životně důležitým habitatem pro řadu chráněných rostlin a živočichů a jsou nezastupitelným zdrojem druhové bohatosti v přírodě. Ve snaze o jejich zachování jsou součástí nejrůznějších, i když pravda spíše ojedinělých, revitalizačních programů a vědeckých studií, při nichž jsou tůně člověkem obnovovány nebo zcela nově zakládány a jsou sledovány z hlediska jejich sukcesního vývoje a měnících se ekologických podmínek (Just *et al.* 2005, Sovíková 1996, Rulík a Měkotová 1995, [5]).



## Odběry vzorků zooplanktonu

Terénní odběry vzorků zooplanktonu probíhaly pro celý projekt této diplomové práce jednotně a byly odebírány na následujících typech lokalit: 1) vysokohorská jezera v Tatrách, 2) eutrofní rybníky na Klatovsku a Blatensku, 3) malé vodní plochy na výsypkách v Podkrušnohoří a 4) periodické tůně na Kokořínsku a v blízkosti Veselí nad Lužnicí. Přesný seznam jednotlivých lokalit je uveden v Příloze 1. Geografické umístění lokalit je zobrazeno na obrázku 20.



Obr. 20: Geografické rozmístění odebíraných lokalit; značení: zelená – eutrofní rybníky, modrá – tatranská jezera, žlutá – tůně, červená – vodní plochy na výsypkách.

Sběr vzorků probíhal v průběhu let 2004, 2006 a 2007 nepravidelně v období od července do listopadu. Vzorky byly odebírány za pomoci planktonní sítě na tyči s velikostí ok 100 $\mu$ m, přičemž tahy byly vedeny v sublitorálu ve vzdálenosti maximálně pět metrů od břehu, a to jak ve volné vodě, tak i v ponořené vegetaci. Materiál zachycený na síti byl převeden do plastových lahvíček (20ml), okamžitě fixován 96% ethanolem a označen příslušným datem a kódem lokality (Tabulka 2).



*Studovaný organismus, modelové lokality a odběry vzorků*

ČÍSLO	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU	ČÍSLO	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU
1	Žabinec	ŽA	13.9.2006	32	Kokořínsko 07	07 KOK	8.11.2006
2	Velký Pálenec	VP	8.9.2006	33	Kokořínsko 23	23 KOK	9.11.2006
3	Starý Pálenec	SP	6.9.2006	34	Kokořínsko 25	25 KOK	9.11.2006
4	Žoldánka	ŽO	11.9.2006	35	Kokořínsko 31	31 KOK	10.11.2006
5	Hadí rybník	HR	8.9.2006	36	Kokořínsko 32	32 KOK	10.11.2006
6	Vitanovy	VT	8.9.2006	37	Kokořínsko 39	39 KOK	9.11.2006
7	Smyslov-velký	SV	8.9.2006	38	Czarny Staw Gasienicowy	GA-2	09/2007
8	Smyslov-malý	SM	8.9.2006	39	Nižné Wahlenbergovo pl.	FU-4	09/2007
9	Rybník u Čertovky	CE	14.7.2007	40	Vyšné Terianské pl.	NE-1	09/2007
10	Rybník Petrovičky	PE	14.7.2007	41	Zelené javorové pl.	JA-5	09/2007
11	Němčický rybník	NR	14.7.2007	42	Vyšné Jamnické pl.	JM-5	09/2007
12	Letiny I	LT1	14.7.2007	43	Litvorové pl.	BV-3	09/2007
13	Letiny II	LT2	14.7.2007	44	Slavkovské pleso	SL-2	25.9.2004
14	Letiny III	LT3	14.7.2007	45	Starolesnianské pleso	VS-15	23.9.2004
15	Nový rybník-Točnick	TO	14.7.2007	46	Długi Staw Gasienicowy	GA-4	28.9.2004
16	Vitanovy	VT	15.7.2007	47	Vyšné Furkotské pleso	FU-7	26.9.2004
17	Hadí rybník	HR	15.7.2007	48	Batizovské pleso	BA-1	25.9.2004
18	Malá Kuš	MK	15.7.2007	49	Zelené krivánské pleso	VA-1	26.9.2004
19	Paseka I	PS1	15.7.2007	50	Capie	MY-2	26.9.2004
20	Paseka II	PS2	15.7.2007	51	Czarny Staw pod Rysami	MO-1	09/2007
21	Velká Kuš	VK	15.7.2007	52	Vyšné sesterské pl.	MY-1	09/2007
22	Velká Lípa	VL	15.7.2007	53	Vyšné Satanie pliesko	ME-4	09/2007
23	Popílkoviště Vřesová	PV	11.10.2006	54	Dolné Roháčské pl.	RO-4	09/2007
24	Boží Požehnutí	BP	11.10.2006	55	Horné Roháčské pl.	RO-1	09/2007
25	Žluté jezírko	ZJ	11.10.2006	56	Velké Hincovo pl.	ME-1	09/2007
26	Přikrylovo červené	PC	11.10.2006	57	Nižné Kozie pl.	MY-5	09/2007
27	Milena	ML	11.10.2006	58	Morskie Oko	MO-2	09/2007
28	Jaroslav	JR	11.10.2006	59	Vyšné Wahlenbergovo pl.	FU-1	09/2007
29	Karasi	KR	11.10.2006	60	Vyšné Račkové pl.	RA-1	09/2007
30	Tůň u Rudy I	TR1	23.8.2007	61	Nižné Žabie Bielovodské	BV-23	09/2007
31	Tůň u Rudy II	TR2	23.8.2007	62	Okrúhlé pl.	MY-1	09/2007

Tabulka 2: Celkový soubor všech 62 odebíraných lokalit s jejich identifikačním kódem a datem odběru.

Kromě vlastního sběru materiálu byly na většině lokalit měřeny i vybrané fyzikálně-chemické parametry vody. Multifunkční sondou YSI 556 MPS byla měřena teplota, pH, vodivost a množství rozpuštěného kyslíku, a fluorimetrem Turner (Aquafluor Handheld Fluorometer) bylo stanovováno množství chlorofylu *a* ve vodě (Příloha 1).

Získané vzorky jsem pak zpracovávala pod světelným mikroskopem. Ke konkrétnímu zařazení jednotlivých jedinců zooplanktonu do rodů a druhů jsem použila následující determinační klíče:

- Šrámek-Hušek R. (1953): Naši klanonožci.
- Smirnov N.N. (1996): Cladocera: the Chydorinae and Syciinae (Chydoridae) of the World
- Brandl Z. (nepublikovaný rukopis): Obrazový klíč k určování buchanek (Cyclopidae) povrchových vod území Československa
- Přikryl I. (2000): Klíče středoevropských Cyclopidae (bez druhů podzemních vod)
- Amoros C. (1984): Introduction Pratique a la Systematique des Organismes des Eaux Continentales Francaises – Crustaces, Cladoceres

*Studovaný organismus, modelové lokality a odběry vzorků*

- Kořínek V., Petrusek A.: Textový dichotomický klíč (Cladocera)
- Benzie J.A.H. (2005): Cladocera: The Genus Daphnia (including Daphniopsis)
- Einsle U. (1996): Copepoda: Cyclopoida – Genera Cyclops, Megacyclops, Acanthocyclops

.....

Poznámka: Vzorky z Kokořínska byly získány s již určeným druhovým složením od P.J.Juračky.

**KAPITOLA 2:**  
**TAXONOMICKÉ POSTAVENÍ POPULACÍ RODU CHYDORUS**  
**NA ZÁKLADĚ MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝCH METOD**

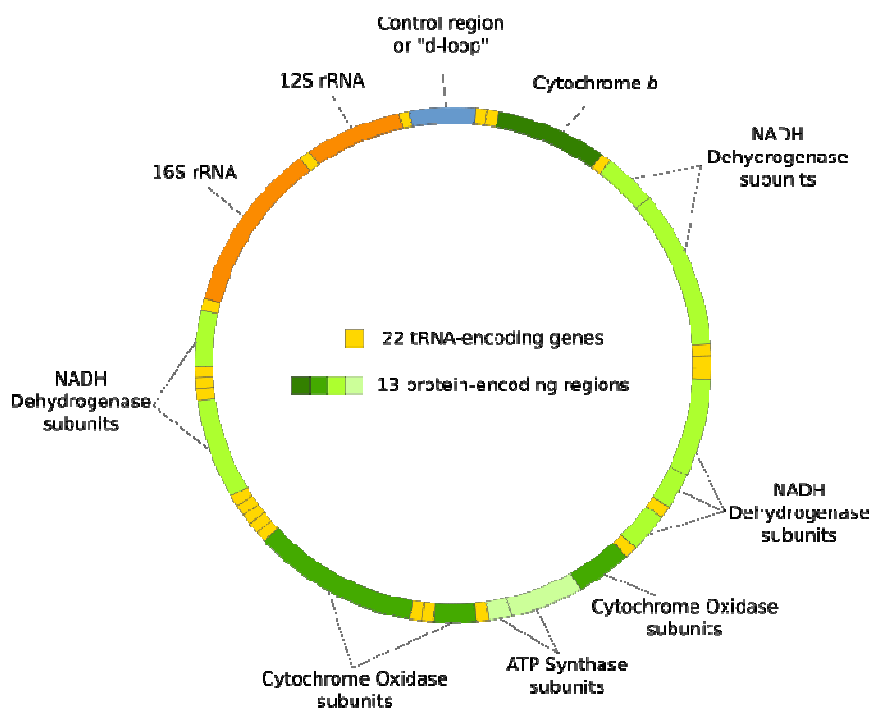
**Úvod**

Spolu s rychlým rozvojem molekulárně-genetických metod v průběhu posledních desetiletí se zvyšuje i jejich využití v nejrůznějších odvětvích současné biologie. Slouží k rozšíření poznání nejen v rámci ekologie, populační biologie, etologie a evoluce, ale zvláště velký rozmach zažívají tyto metody na poli systematické biologie, kde umožňují biologům zodpovědět otázky taxonomického postavení mnoha skupin, u nichž tradiční morfologie selhává. Molekulární metody umožňují v podmínkách *in vitro* namnožení konkrétní nukleotidové sekvence obsažené v jakémkoliv typu DNA a na základě podobností těchto sekvencí u různých druhů sledovat jejich vzájemnou příbuznost a rekonstruovat průběh jejich fylogeneze (Zima *et al.* 2004).

Pro studium fylogenetického vývoje a taxonomického členění druhů se používají jak jaderné, tak mitochondriální geny (shrnuto v Hillis a Dixon 1991). Mitochondriální geny mají přitom oproti jaderným genům jisté vlastnosti, které mohou představovat výhody pro jejich použití. Kruhová molekula mitochondriální DNA (mtDNA) se například oproti jaderné DNA vyskytuje v buňce v obrovském počtu kopií (100 až 10000), což umožňuje její vcelku snadné a rychlé namnožení a následné osekvenování vybraných genů (Alberts *et al.* 2002, [6]). Mt DNA je navíc haploidní a předává se do dalších generací pouze po mateřské linii, tudíž nedochází k rekombinaci genů mezi dvěma rodiči, jako je tomu u jaderné DNA, ale genetická informace se přenáší z matky na potomka nezměněná (Zima *et al.* 2004, Lynch a Jarrell 1993, [6]). Další výhodou mt DNA je její rychlá evoluce zapříčiněná vysokou frekvencí nukleotidových substitucí, díky čemuž je mtDNA vhodným nástrojem pro zkoumání fylogenetických vztahů mezi jedinci v rámci druhu, případně pak mezi blízce příbuznými druhy, mezi nimiž není počet odlišností v sekvencích příliš veliký (Zima *et al.* 2004, Hillis a Dixon 1991, Lynch a Jarrell 1993, [6]).

DNA mitochondrií se skládá z přibližně 16000 párů bází a kóduje celkem 37 genů. Z toho 24 genů se podílí na proteosyntetickém aparátu mitochondrií (jedná se o geny pro 12S a 16S rRNA a 22 genů pro tRNA). Zbylých 13 genů kóduje proteiny, které se podílejí na enzymatické výbavě mitochondrií (Crease 1999, Alberts *et al.* 2002, Lynch a

Jarrell 1993, [6]). Ilustrační grafické znázornění mitochondriální DNA je uvedeno na obrázku 21.



Obr. 21: Mitochondriální DNA [6]

Kompletní nukleotidovou sekvenci mitochondriální DNA se doposud podařilo získat z relativně široké škály nejrůznějších organismů. V rámci vodních bezobratlých byl celý úsek mtDNA osekvenován u mnoha mořských zástupců, například u mořských ježků druhu *Strongylocentrotus purpuratus* (Jacobs *et al.* 1988 podle Lynch a Jarrell 1993) a *Paracentrotus lividus* (Cantatore *et al.* 1989 podle Lynch a Jarrell 1993), u krevet druhu *Litopenaeus vannamei* a *Fenneropenaeus chinensis* (Shen *et al.* 2007), u nohatek druhu *Achelia bituberculata* (Park *et al.* 2007), u svijonožců druhu *Pollicipes mitella* (Lim a Hwang 2006), u stražků druhu *Squilla mantis* (Cook 2005) nebo u klanonožců druhu *Tigriopus japonicus* (Machida *et al.* 2002), ale i u řady dalších. Co se týká sladkovodních bezobratlých, tak zde je množství kompletně osekvenovaných druhů výrazně menší, ale lze uvést třeba listonoha druhu *Triops cancriformis* (Umetsu *et al.* 2002) či perloočky druhu *Daphnia pulex* (Crease 1999).

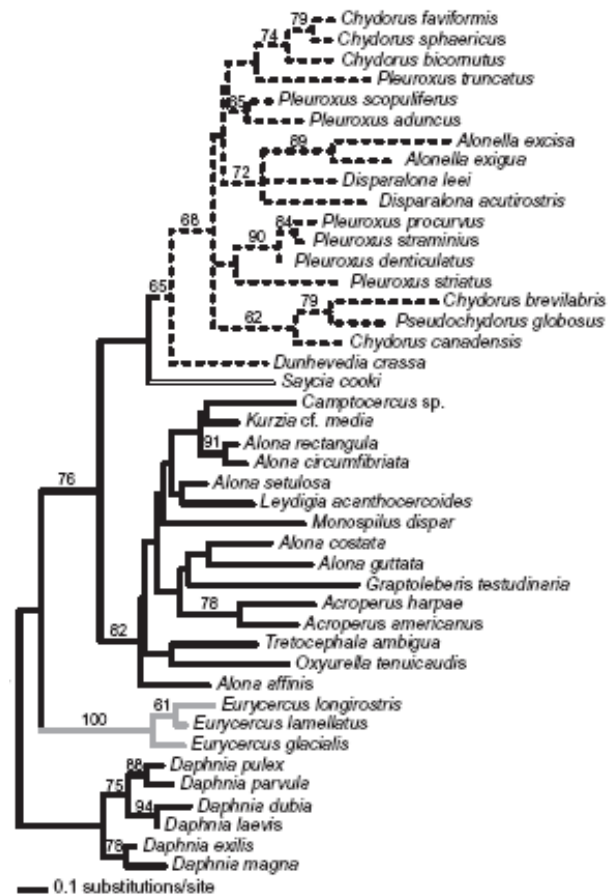
Pro účely rutinního zkoumání fylogeneze a pro odvozování kladistických stromů příbuznosti druhů na základě genetických dat se ale obvykle nevyužívá celá sekvence

mitochondriální DNA, ale jen některé její části. Nejčastěji se amplifikují a sekvenují mitochondriální ribosomální geny pro 12S srRNA (malá ribosomální podjednotka) a pro 16S lrRNA (velká ribosomální podjednotka) nebo geny pro COI (cytochrom oxidáza c podjednotka I) (Wetzera 2002, Lynch a Jarrell 1993).

I v rámci těchto mitochondriálních genů lze vysledovat rozdíly v rychlosti jejich vývoje (některé geny jsou konzervativnější než jiné) a na základě toho odvodit, pro jakou taxonomickou úroveň se hodí. Obecně lze říci, že sekvence, u nichž dochází k častým nukleotidovým substitucím, a které se tudíž vyvíjejí rychleji, jsou vhodné pro studium fylogeneze na nižší taxonomické úrovni, kdežto konzervativní sekvence s nízkou četností substitucí se používají spíše pro vyšší taxonomické úrovně (Bejdák 2006). Geny pro 12S rRNA a pro 16S rRNA jsou poměrně rychle se vyvíjející geny, které jsou použitelné pro analýzy příbuzenských vztahů mezi blízkými příbuznými druhy. Pro sledování rozdílů mezi populacemi se už ale příliš nehodí (Lynch a Jarrell 1993, Bejdák 2006). Gen pro COI je naproti tomu vhodný pro fylogentické studie až po úroveň čeledí (pro vyšší taxonomické úrovně se už ale zase nedoporučuje) (Lynch a Jarrell 1993).

Pro analýzy vývoje příbuznosti na nižší taxonomické úrovni se jako molekulární marker používá nejvíce gen pro 16S rRNA (gen pro 12S rRNA se používá poněkud méně). Kromě toho, že se tento gen vyvíjí přiměřeně rychle, tak jeho další výhodou je, že byl doposud otestován již v dostatečně velkém počtu studií (Bejdák 2006). Pro srovnání výsledků této práce jsou zásadní ty studie, které se zabývají sladkovodními perloočkami. První významnou je například studie, kdy byla sekvenace genu pro 16S rRNA použita k rekonstrukci fylogeneze u 16-ti druhů zástupců z řádu Cladocera (z infrařádů Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda a Onychopoda) a ke stanovení míry divergence mezi těmito druhy (Schwenk *et al.* 1998). Konkrétně druh *Chydorus sphaericus* byl pak zahrnut do studie fylogeneze čeledi Chydoridae (Sacherová a Hebert 2003). V této studii byla pro účely fylogeneze využita jak sekvence mitochondriálního genu 16S rDNA, tak vzhledem k tomu, že kombinováním dat získaných ze sekvenování několika různých úseků mitochondriálních či jaderných genů s různou rychlostí evoluce, lze získat přesnější obraz fylogeneze zkoumaných druhů, byly využity i sekvence mitochondriálního genu pro COI a sekvence jaderného genu 18S rDNA. Na základě srovnávání uvedených genových sekvencí autoři studie potvrdili jednak rozčlenění čeledi Chydoridae do čtyř podčeledí: Eurycercinae, Saycinae, Chydorinae a Aloninae, a navíc objasnili taxonomické postavení jednotlivých rodů, jejichž příslušnost ke jmenovaným podčeledím byla doposud určena jen

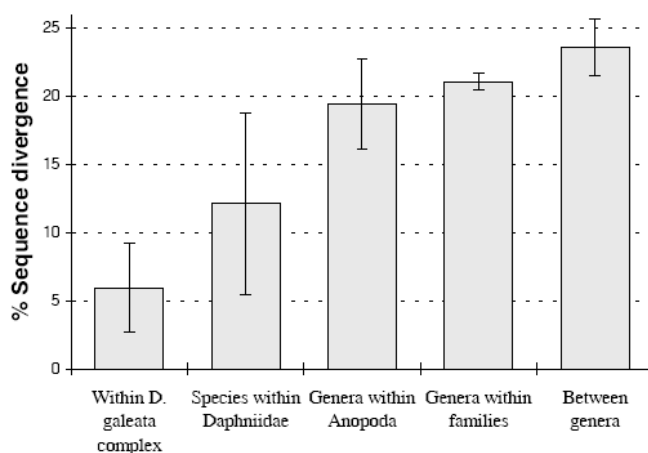
na základě morfologie (Sacherová a Hebert 2003). Fylogenetický strom (vytvořený na základě sekvencí 16S rDNA) vysvětlující taxonomické postavení vybraných druhů v rámci čeledi Chydoridae je uveden na obrázku 22. Rod *Chydorus* jako takový je v tomto případě parafyletický – štěpí se do dvou kladistických větví. V jedné větvi se nachází druhy *Chydorus brevilabris* a *Chydorus canadensis* spolu s druhem *Pseudochydorus globosus*, v druhé větvi jsou pak druhy *Chydorus faviformis*, *Chydorus sphaericus* a *Chydorus bicornutus* (Sacherová a Hebert 2003).



Obr. 22: Rekonstrukce fylogenetického stromu na základě sekvencí mitochondriálního genu 16S rDNA za použití algoritmu Maximum likelihood (ML) (šedá čára – podčeleď Eurycercinae, přerušovaná čára – podčeleď Chydorinae, dvojitá čára – podčeleď Saycinae, černá plná čára – podčeleď Aloninae a outgroup (rod *Daphnia*) (Sacherová a Hebert 2003).

Díky výše zmíněným publikacím lze získat představu o tom, jak velké rozdíly jsou mezi sekvencemi na různých taxonomických úrovních. Studie Schwenk *et al.* (1998) zabývající se příbuzenskými vztahy v řádu Cladocera například uvádí, že procentuální rozdíly v sekvencích mezi jednotlivými druhy v rámci komplexu *Daphnia galeata*

(*D. rosea*, *D. hyalina*, *D. galeata* a *D. cucullata*) tvoří v průměru 5,9% ( $\pm 3,2$ ), zatímco mezi všemi druhy z čeledi Daphniidae (včetně podrodu *Ctenodaphnia*) je to už průměrně 12,1% ( $\pm 6,5$ ). Divergence mezi odlišnými rody z infrařádu Anomopoda pak činí 19,4% ( $\pm 3,3$ ) (Obrázek 23). Sacherová a Hebert (2003) ve své práci týkající se evoluční historie čeledi Chydoridae uvádějí procentuální rozdíly v sekvencích mezi druhy v rámci rodů *Daphnia* 9,4%, *Alona* 13,8%, *Alonella* 13,7%, *Eurycercus* 8,7%, *Pleuroxus* 9,6%, *Chydorus* 12,6%, *Acroperus* 14,4% a *Disparalona* 12,3%. Mezi podčeleděmi Aloninae, Chydorinae, Saycinae a Eurycercinae uvádějí rozdíly v rozmezí 15,0% – 16,4%.



Obr. 23: Procentuální rozdíly v sekvencích mezi odlišnými taxonomickými skupinami (chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od aritmetického průměru) (Schwenk *et al.* 1998).

Podobné divergence lze nalézt i u dalších skupin organismů. Kromě jmenovaných studií existuje řada dalších prací, které rovněž využívají sekvence 16S rDNA pro sledování vztahů příbuznosti a evolučního vývoje druhů a které se zaměřují i na jiné skupiny/druhy organismů. Například u skupiny Copepoda Goetze (2003) zjistil, že intraspecifická genetická divergence se u druhů z čeledi Eucalanidae pohybuje od 0,1% do 1,7%, mezi druhy v rámci čeledi se pak pohybuje mezi 3% - 19,7%). U skupiny Lepidoptera Brower (1994) při studiu motýla druhu *Heliconius erato* zjistil, že v rámci tohoto druhu existují dvě geograficky oddělené skupiny mezi nimiž se genetická divergence pohybuje okolo 3,5%, uvnitř těchto dvou skupin jsou pak rozdíly mezi populacemi menší než 0,6%). Podobné práce i výsledky byly dále zjištěny u skupin Mollusca (Hye-Suck *et al.* 2005, Canapa *et al.* 2000), Diptera (Cook a Mostovski 2002), Echinodermata (Kerr *et al.* 2005) a dalších.

Uvedené vědecké práce jsou dobrým dokladem toho, že molekulární metody zahrnující amplifikaci a sekvenaci mitochondriální DNA jsou kvalitním nástrojem pro zkoumání příbuznosti a míry divergence mezi druhy. Vzhledem k tomu byla sekvenace mitochondriálního genu pro 16S rRNA použita i v této diplomové práci, v níž jednotlivé sekvence a jejich vzájemné srovnání umožnily stanovit druhovou příslušnost jednotlivých populací rodu *Chydorus* z odebraných vzorků.

## **Metodika**

### **Izolace DNA**

K izolaci DNA bylo použito 48 populací z různých typů modelových lokalit (Příloha 3). Z každé populace byli vybráni vždy minimálně tři jedinci, kteří byli pomocí preparační jehly přeneseni každý zvlášť do jednotlivých mikrozkušavek obsahujících 30 µl roztoku proteinázy K. Roztok proteinázy K byl předem připraven laborantkou dle návodu z práce Schwenk *et al.* (1998) a uchováván v mrazničce při teplotě -15°C. Mikrozkušavky se vzorkem byly posléze umístěny do vodní lázně o teplotě 55°C, kde se inkubovaly po dobu 24 hodin. Po uplynutí stanovené doby byla proteináza K ireverzibilně denaturována v thermocycleru (PTC-100™ Programmable Thermal Controller – MJ Research INC) při teplotě 95°C po dobu 10 minut. Výsledné vzorky byly uloženy v ledničce při teplotě 4°C až do dalšího použití v PCR reakci.

### **Amplifikace DNA**

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byl amplifikován úsek mitochondriálního genu pro 16S rRNA (velkou ribozomální RNA). K amplifikaci požadovaného úseku dlouhého 416 bp (párů bází) byly použity následující dva primery:

PRIMER 16Sch-a (5'-GAC TGT GCA AAG GTA GCA TAA TC-3')

PRIMER 16Sbr (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3')

Startovní primer 16Sch-a byl navržen speciálně pro čeleď Chydoridae (Cladocera, Crustacea) na základě srovnání sekvencí z 16S DNA z druhů *Acroperus harpae*, *Alona affinis*, *Alonella exiqa* a *Pleuroxus denticulatus*, které byly amplifikované za použití standardních primerů 16Sar a 16Sbr (Palumbi *et al.* 1991).



Reakční směs pro PCR (pro jeden vzorek) byla připravena o celkovém objemu 50  $\mu$ l a její složení bylo následující: 31,5  $\mu$ l destilované přečištěné vody; 5  $\mu$ l PCR buffer with KCL; 1,5  $\mu$ l  $MgCl_2$ ; 1  $\mu$ l dNTPs; 1  $\mu$ l Primer Sch-a; 1  $\mu$ l Primer 16Sbr; 1  $\mu$ l Taq DNA Polymerasa (Fermentas) a 8  $\mu$ l DNA získané z izolátu.

Vlastní PCR reakce probíhala v thermocyleru (PTC-100™ Programmable Thermal Controller – MJ Research INC.) dle protokolu:

**V6050**

krok	teplota	čas (min)	krok	teplota	čas (min)
1.	94,0°C	1:30	15.	54,0°C	1:00
2.	94,0°C	0:45	16.	72,0°C	1:00
3.	60,0°C	1:00	17.	1x zpět na krok 14.	
4.	72,0°C	1:00	18.	93,0°C	0:45
5.	1x zpět na krok 2.		19.	52,0°C	1:00
6.	93,0°C	0:45	20.	72,0°C	1:00
7.	58,0°C	1:00	21.	1x zpět na krok 18.	
8.	72,0°C	1:00	22.	93,0°C	0:45
9.	1x zpět na krok 6.		23.	50,0°C	1:00
10.	93,0°C	0:45	24.	72,0°C	1:00
11.	56,0°C	1:00	25.	29x zpět na krok 22.	
12.	72,0°C	1:00	26.	72,0°C	5:00
13.	1x zpět na krok 10.		27.	4,0°C	0:00
14.	93,0°C	0:45	28.	konec	

Po PCR byla provedena kontrola výsledků reakce elektroforézou na agarózovém gelu horizontálně umístěném v aparatuře (Gibco BRL Horizontal Gel Eletrophoresis Apparatur-HORIZON 20.25, Life Technologies) a zcela ponořeném v pufru (Tris-borát-EDTA neboli TBE). Složení agarózového gelu bylo následující: 0,5 g agarózy, 50 ml TBE a 2  $\mu$ l EtBr. Do jednotlivých jamek gelu bylo napipetováno vždy 5 $\mu$ l PCR produktu a 2 $\mu$ l pufru (loading buffer). Vlastní elektroforéza probíhala po dobu 30 minut při 180 V a 500 mA. Amplifikované fragmenty označené fluorescenčním barvivem byly po skončení procesu prohlíženy v UV světle a dokumentovány pomocí fotoaparátu. Délka amplifikovaných fragmentů byla porovnávána se standardem Mass Ruler DNA Ladder, Low Range.

### **Purifikace PCR produktů**

Amplifikované a ověřené PCR produkty byly před sekvenací přečištěny. Pro purifikaci byl použit MinElute PCR Purification Kit Protocol s použitím centrifugy (MinElute Handbook 06/2004). DNA zbavená primerů, polymerázy a přebytečných nukleotidů a solí byla opětovně testována elektroforézou na agarózovém gelu (stejně jako po PCR).

### **Sekvenování mt DNA a analýza sekvencí**

Přečištěné a ověřené PCR vzorky byly řádně označeny individuálním kódem, jednotlivě zabaleny do speciální parafínové fólie a odeslány expresní službou do laboratoře pro sekvenaci (Macrogen DNA Sequencing Service – Korea). Získané sekvence byly nejprve manuálně zkontrolovány a následně seřazeny (dle algoritmu ClustalW Multiple alignment) a editovány pomocí počítačového programu BioEdit Sequence Alignment Editor verze 7.0.9.0. (Hall 1999). Vlastní analýzy sekvencí a sestavení fylogenetických stromů byly provedeny v programu MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) verze 4.0.2. (Tamura *et al.* 2007). Haplotypová síť byla sestavena v programu TCS 1.2.1. (Clement *et al.* 2000).

### **Výsledky**

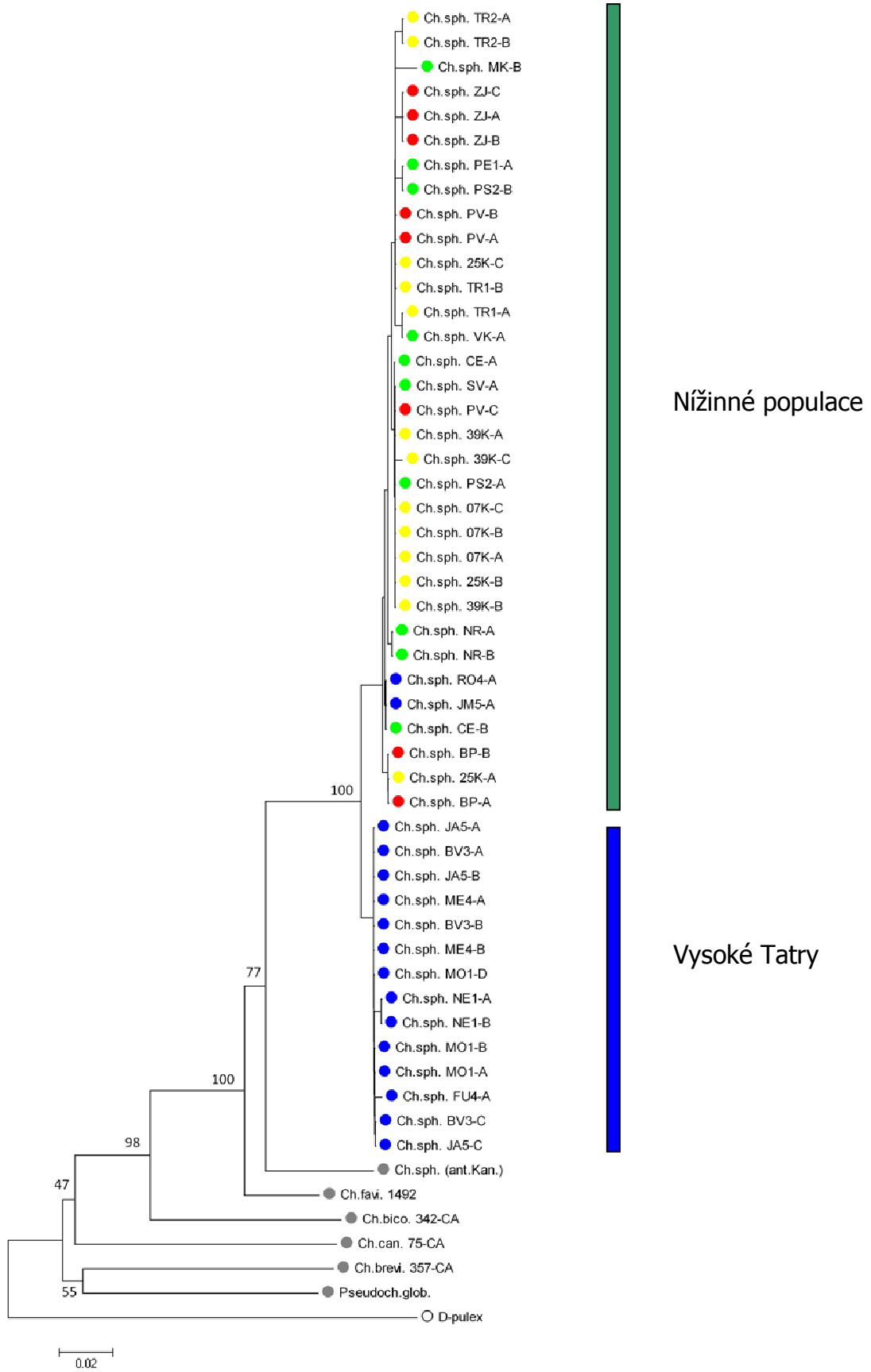
Celkem bylo v průběhu let 2004, 2006 a 2007 odebráno 62 vzorků zooplanktonu (Příloha 1) na dříve jmenovaných modelových lokalitách, přičemž rod *Chydorus* byl nalezen jen ve 48 vzorcích (přehledná tabulka je uvedena v příloze 2). Konkrétně 17 populací bylo z rybníků na Klatovsku a Blatensku, 4 populace byly z drobných vod na výsypkách v Podkrušnohoří, 19 populací bylo z tatranských jezer a 8 populací bylo z tůní v oblasti Kokořínska a Veselí nad Lužnicí. Z každé populace byli vybráni vždy minimálně tři jedinci (v ideálním případě i více jedinců), z nichž byla pomocí proteinázy K izolována DNA. Potřebný úsek DNA (úsek mitochondriálního genu pro 16S rRNA) byl následně amplifikován v PCR reakcích. Podařilo se získat celkem 47 dostatečně kvalitních sekvencí (o délce 416 párů bází) z 23 populací, které byly použitelné pro fylogenetické analýzy (Tabulka 3). K souboru získaných sekvencí bylo navíc pro účely srovnání přidáno dalších šest sekvencí téhož genu z příbuzných druhů: *Chydorus sp.* (arktická Kanada), *Chydorus faviformis*, *Chydorus bicornutus*, *Chydorus brevilabris*, *Chydorus canadensis* a *Pseudochydorus globosus* z lokalit v Kanadě (data poskytla V. Sacherová).

LOKALITA	KÓD	POČET JEDINCŮ
Smyslov-velký	SV	1
Rybník u Čertovky	CE	2
Rybník Petrovičky	PE	1
Němčický rybník	NR	2
Malá Kuš	MK	1
Paseka II	PS2	2
Velká Kuš	VK	1
Popílkoviště Vřesová	PV	2
Boží Požehnutí	BP	2
Žluté jezírko	ZJ	3
Tůň u Rudy I	TR1	2
Tůň u Rudy II	TR2	2
Kokořínsko 07	07 KOK	3
Kokořínsko 25	25 KOK	3
Kokořínsko 39	39 KOK	3
Nižné Wahlenbergovo pl.	FU-4	1
Vyšné Terianské pl.	NE-1	2
Zelené javorové pl.	JA-5	3
Vyšné Jamnické pl.	JM-5	1
Litvorové pl.	BV-3	3
Czarny Staw pod Rysami	MO-1	3
Vyšné Satanie pliesko	ME-4	2
Dolné Roháčské pl.	RO-4	1

Tabulka 3. Seznam lokalit populací zahrnutých do fylogenetické analýzy.

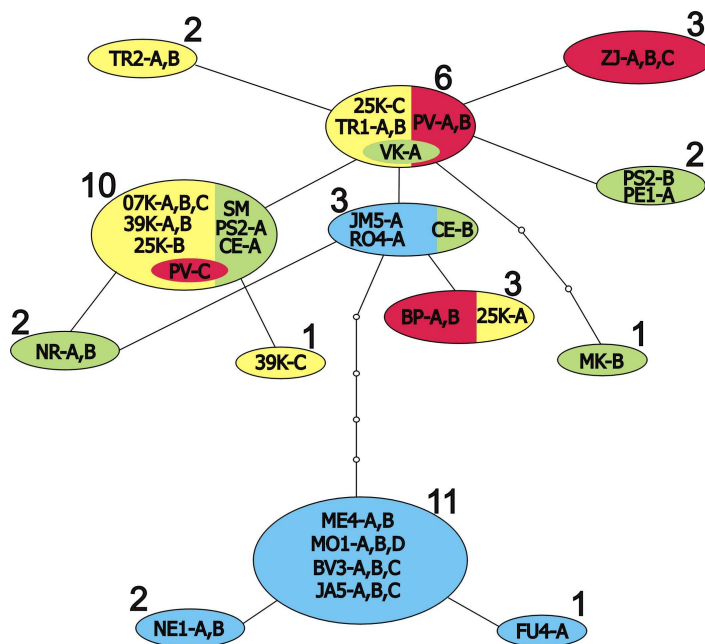
Všechny tyto sekvence byly použity pro analýzu v programu MEGA4. Ke srovnání podobnosti jednotlivých haplotypů a k rekonstrukci vztahů příbuznosti byla použita metoda Neighbor-Joining (NJ), model Nucleotide: p-distance. Pro zakořenění fenogramu byl jako outgroup použit druh *Daphnia pulex* (Obrázek 24). Ke zhodnocení míry spolehlivosti jednotlivých větví stromu byl použit tzv. bootstrap test (jedná se o neparametrickou techniku opakovaného výběru). Bootstrapové hodnoty byly generovány z 500 opakování a jsou zaznamenány v jednotlivých uzlech stromu.

Obr. 24 (viz následující strana): Kompletní strom ze všech 54 sekvencí vybrané části genu pro 16S rRNA vytvořený za pomoci algoritmu Neighbor-Joining (NJ). Kódy uváděných vzorků jsou přehledně vypsány v tabulce v Příloze 1. Měřítko odpovídá 2% rozdílu v nukleotidovém složení sekvencí. Pro lepší vizualizaci jsou vzorky rozlišeny barevnými značkami → druh *Chydorus sphaericus*: zeleně – rybníky, tmavě modře – tatranská jezera, žlutě – tůně, červeně – drobné vody na výsypkách; ostatní druhy rodu *Chydorus* – šedě; a outgroup *Daphnia pulex* – bíle



Z provedených fylogenetických analýz na první pohled zřejmé, že všechny populace rodu *Chydorus* na sledovaných modelových lokalitách patří do druhu *Chydorus sphaericus*. Populace tohoto druhu z modelových lokalit se navíc rozdělily do dvou hlavních skupin. Jednu skupinu tvoří horské jezerní populace výhradně z Vysokých Tater, do druhé skupiny se pak vyčlenily zbylé populace druhu *Chydorus sphaericus*, tj. populace z rybníků, tůní, výsypek a z jezer Západních Tater. Rozdíly mezi populacemi ve druhé skupině jsou minimální, populace tvoří poměrně ucelený soubor bez výraznějšího větvení. Populace utvářející druhou skupinu pocházejí všechny víceméně z nížinných lokalit, výjimku představují jen dvě populace pocházející ze Západních Tater, ale ani u nich není odlišení v rámci této skupiny nijak výrazné.

Ostatní uváděné druhy rodu *Chydorus* (*Ch. faviformis*, *Ch. bicornutus*, *Ch. canadensis*, *Ch. brevilabris* a *Ch. sp.*) a druh *Pseudochydorus globosus* představují relativně značně geneticky vzdálené populace, a tvoří tudíž zcela samostatné větve.



Obr. 25: Haplotypová síť srovnávaných populací. zeleně – rybníky, modře – tatrská jezera, žlutě – tůně, červeně – drobné vody na výsypkách. Každý uzel představuje změnu jednoho nukleotidu. Kódy populací jsou uvedeny v tabulce 3 (viz výše).

Bližší pohled na příbuznost jednotlivých haplotypů poskytuje haplotypová síť (Obrázek 25). V kroužcích jsou jednotlivé skupiny haplotypů, uzly na spojnicích

představují změnu jednoho nukleotidu. Z grafu je zřejmé, že populace z Vysokých Tater (tři haplotypy v dolní části grafu) se od ostatních haplotypů liší pěti mutacemi.

Pro výpočet párových rozdílů (p-distance) mezi sekvencemi byl použit stejný model jako při tvorbě Neighbor-Joining fenogramu. Rozdíly mezi populacemi byly nejprve hodnoceny z hlediska příslušnosti k modelové lokalitě (tůň, rybník, výsypka, horské jezero) (Tabulka 4). Populace tatranských jezer se od ostatních tří skupin liší o přibližně 1,7%, rozdíly mezi rybníky, tůňemi a vodami na výsypkách se pohybují okolo 0,5% z hlediska rozdílů podle topologie stromu (Obrázek 24). Mezi skupinou populací z Vysokých Tater a skupinou ostatních populací tohoto druhu byl zaznamenán rozdíl 1,8%.

	[1]	[2]	[3]	[4]
[1]tatr. jezera				
[2]rybníky	0,017			
[3]tůně	0,017	0,005		
[4]výsypky	0,016	0,006	0,005	

Tabulka 4: P-distance; párové rozdíly v části genu pro 16S rRNA mezi skupinami populací podle typu modelové lokality.

Rozdíly v sekvencích části genu pro 16S rRNA mezi populacemi odlišných druhů jsou uvedeny v Tabulce 5. Divergence byly počítány pro druhy *Daphnia pulex*, *Chydorus faviformis*, *Chydorus bicornutus*, *Chydorus brevilabris*, *Chydorus canadensis*, *Chydorus sphaericus* (modelové lokality), *Chydorus sp.* (arktická Kanada) a *Pseudochydorus globosus*. Druhu *Chydorus sphaericus* (modelové lokality) jsou nejpříbuznější druhy *Chydorus faviformis* (8,2%) a *Chydorus sp.* (arktická Kanada) (8,7%).

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
[1]D.pulex								
[2]Ch.favi.	0,280							
[3]Ch.bico.	0,276	0,124						
[4]Ch.brevi.	0,279	0,209	0,219					
[5]Ch.sp.(Ant.)	0,290	0,080	0,144	0,206				
[6]Ch.can.	0,273	0,199	0,194	0,204	0,216			
[7]Pseudoch.gl.	0,265	0,206	0,203	0,182	0,223	0,203		
[8]Ch.sph.	0,296	0,082	0,162	0,224	0,087	0,216	0,218	

Tabulka 5: P-distance, párové rozdíly v části genu pro 16S rRNA mezi populacemi odlišných druhů.

Rozdíly v sekvencích uvnitř skupin populací druhu *Chydorus sphaericus* jsou téměř nulové. Ve skupině populací z Vysokých Tater tvoří rozdíl pouze 0,1%, ve skupině zbylých populací tohoto druhu pak 0,5%. V rámci skupin podle typu modelové lokality jsou rozdíly taktéž minimální a jsou uvedeny v Tabulce 6. Uvnitř skupiny tvořené ze všech populací druhu *Chydorus sphaericus* je pak rozdíl 1%.

	D
tatran. jezera	0,004
rybníky	0,006
tůně	0,004
výsypky	0,004

Tabulka 6: P-distance, rozdíly v sekvencích části genu pro 16S rRNA uvnitř skupin.

## Diskuze

Zástupci rodu *Chydorus*, zejména pak druh *Chydorus sphaericus*, jsou schopni v hojné míře obývat nejrůznější typy ekologických habitatů (od arktických až po tropické) a současně dokáží přežívat a rozmnožovat se v širokém spektru podmínek okolního přírodního prostředí (nízké pH, vyšší salinita, zvýšená intenzita UV záření apod.). Nejen z tohoto důvodu, ale i vzhledem k na první pohled relativně nevýrazné morfologické variabilitě, byl druh *Chydorus sphaericus* ještě na počátku 20. století nesprávně považován za všudypřítomný a celosvětově rozšířený výhradní druh. Následně detailněji zaměřené studie ale ukázaly, že takzvaný „*Chydorus sphaericus*“ není ve skutečnosti samostatným taxonomickým celkem, ale že se jedná o členitou skupinu tvořenou hned několika formami/varietami, které jsou si sice navzájem blízce příbuzné, ale mezi nimiž lze ve výsledku vyzorovat jisté rozdíly, které je množné brát za dostatečně významné pro systematické odlišení druhu (Smirnov 1996). Vedle tohoto zjištění se navíc ukázalo, že kromě samostatných druhů existuje v rámci taxonu/skupiny „*Chydorus sphaericus*“ i celá řada dalších morfologických forem a variet, jejichž taxonomické postavení je sporné a nelze je jednoznačně považovat za druhy, jakožto spíše za morfotypy druhu *Chydorus sphaericus* či jiných druhů (Smirnov 1996). Vzhledem k takovýmto nesrovnalostem je pro správné zařazení do hierarchického klasifikačního systému nutné podrobit zkoumané organismy molekulárně-genetickému testování.

Jak už bylo uvedeno dříve, na našem území bylo doposud zaznamenáno šest forem/variet rodu *Chydorus* (*Ch. globosus*, *Ch. latus*, *Ch. piger*, *Ch. sphaericus*, *Ch. gibbus* a *Ch. ovalis*), u nichž není zcela jasné, zda se jedná o skutečné druhy nebo pouze o morfotypy druhu *Ch. sphaericus*. Prvním z cílů této diplomové práce proto bylo zmapovat současnou situaci na několika typech ekologicky rozlišných modelových lokalit (tůně, rybníky, vody na výsypkách a horská plesa) a otestovat nulovou hypotézu, že všechny kulovité populace rodu *Chydorus* na sledovaném území patří do druhu *Chydorus sphaericus*. V rámci studovaných populací se oddělila skupina populací z Vysokých Tater od všech ostatních skupin. Tento rozdíl vyjádřený v procentech odlišnosti sekvencí činí 1,8%. Jak bylo ale ukázáno u perlooček obecně (Schwenk *et al.* 1998), tento rozdíl odpovídá vnitrodruhovým rozdílům a lze proto s jistotou říci, že všichni testovaní jedinci z odebraných vzorků patří do druhu *Chydorus sphaericus*.

Přestože se mezi populacemi analyzovaných jedinců rodu *Chydorus* z odebíraných modelových lokalit neobjevila genetická divergence dostatečně výrazná na to, aby se dalo mluvit o rozdílných druzích, tak by se ale vzhledem k velké různorodosti lokalit a podmínek prostředí dalo alespoň předpokládat, že populace ze stejného typu lokality si budou geneticky vzájemně podobnější oproti populacím z jiných lokalit a vytvoří přinejmenším částečně oddělené skupiny. To se ale neprokázalo, naopak všechny populace (s výjimkou již zmiňované skupiny populací z Vysokých Tater) si byly relativně hodně podobné.

Několik vědeckých prací, zabývajících se rekonstrukcemi fylogeneze na základě mitochondriální DNA, potvrzuje, že rychlost evoluce všech mitochondriálních genů je v průběhu času téměř konstantní, tedy přinejmenším v počáteční fázi vývoje, kdy jsou divergence v jednotlivých sekvencích ještě nízké (Brower 1994, Lynch a Jarrell 1993). Na základě tohoto předpokladu lze matematickými výpočty stanovit tzv. „molekulární hodiny“, pomocí nichž je možné studovat historické vzájemné vztahy mezi populacemi a odvozovat zpětně přibližnou dobu vzniku konkrétních analyzovaných kladistických větví. Možnosti uplatnění takovýchto „molekulárních hodin“ v současné době neustále rostou, poměrně běžně se využívají i k analýzám druhů z kmene Arthropoda, přičemž četné vědecké studie byly provedeny na motýlech, včelách či mořských jezcích (Brower 1994, Lynch a Jarrell 1993). Kromě toho, že se potvrdila poměrně vysoká přesnost a spolehlivost „molekulárních hodin“, tak se také mimojiné zjistilo, že míra rozdílu v genových sekvencích roste na počátku vývoje s časem téměř lineárně, a že za jeden



milión let dojde k rozrůznění sekvencí DNA o 2,3 % (platí pro rozdíl do 9%) (Brower 1994).

Z této rovnice vyplývá, že při rozdílu 1,8 % mezi populacemi z Vysokých Tater a ostatními populacemi tento rozdíl představuje odhadem 780 tisíc let, což odpovídá zhruba střednímu pleistocénu (Tabulka 7).

čas	severský kontinentální ledovec		alpský ledovec
8 000	Viselské zalednění	Wisła	Würm
100 000			
125 000	Eem	Eem (IG)	Riss/Würm (IG)
	Saalské zalednění	Wartha	Riss
		Intersaale (IG)	
250 000		Saale	
300 000			
	Holsteinské zalednění	Dömnitz (IG)	
		Fuhne	
		Holstein (IG)	Mindel/Riss (IG)
	Elster	Elster	Mindel
600 000	Cromerské zalednění	Cromer (IG)	
			Günz/Mindel (IG)
900 000			
			Günz
			Donau/Günz (IG)
1,6-1,8 mil.			
			Donau

Tab. 7: Přehled pleistocénních glaciací (zpracováno z údajů [www.stratigraphy.org](http://www.stratigraphy.org)).

Pleistocén představoval v minulosti období výrazných klimatických změn, kdy docházelo k cyklickému střídání dob ledových (tzv. glaciálů) a dob meziledových (tzv. interglaciálů). V důsledku měnícího se rozsahu dvou nejvýraznějších ledovců v Evropě - skandinávského kontinentálního ledovce na severu a alpského horského ledovce na jihu - bylo ovlivněno klima i na našem území. Přestože jmenované ledovce nezasahovaly přímo až k nám (území našeho státu se nacházelo v periglaciální nezaledněné zóně), docházelo k postupnému přesunu klimatických pásem od severu k jihu a začaly se

vlivem studeného podnebí a velkých sněhových srážek tvořit lokální izolované horské ledovce, přičemž obojí mělo značný dopad na rozšíření organismů. Ty byly vlivem nepříznivých podmínek nuceny k přesunům z původních stanovišť do příznivějších refugií, kde se jim dařilo přežít a odkud se pak v interglaciálech po ústupu ledovce pomalu rozšiřovaly zpět do dřívějších lokalit nebo osidlovaly lokality nové (Hewitt 1996, Hewitt 1999, Ložek 1999, Ložek 2007). Tyto transfery, zpětné kolonizace a měnící se míra izolovanosti podněcovaly přetváření genomu organismů ve smyslu nárůstu genetické divergence, která vedla v některých případech až ke vzniku zcela nových druhů (Hewitt 1996). Haplotypová síť, sestavená ze všech analyzovaných sekvencí 16S (Obr. 25), naznačuje možný vývoj populací. Zdrojovými populacemi byly zřejmě populace z nížin, které kolonizovaly Západní (JM5, RO4) i Vysoké Tatry, ale díky nástupu výraznějších ledových epizod před zhruba 700 tis. lety následovala jejich izolace.

Všichni analyzovaní zástupci rodu *Chydorus* z modelových lokalit byli nejprve na základě sledování morfologických determinačních znaků přiřazení ke druhu *Chydorus sphaericus* a následně bylo jejich taxonomické postavení potvrzeno i genetickým testováním. Je ovšem zajímavé, že navzdory historickým záznamům, které na našem území (potažmo na Slovensku) uvádějí přítomnost celkem šesti variet/druhů rodu *Chydorus*, nebyla během pozorování a následného druhového určování žádná z dalších forem jmenovaného rodu identifikována. Modelové lokality byly přitom předem cíleně voleny tak, aby se podařilo získat co největší množství vzorků z co nejrozmanitějšího spektra prostředí a aby se tak zvýšila šance na nalezení všech forem/druhů rodu *Chydorus*. Odebírané populace se začlenily do druhu *Chydorus sphaericus* s tím, že se lišily pouze v zabarvení nebo velikosti; tvarové rozdíly nebyly na první pohled nijak patrné. Z hlediska barvy byl největší rozdíl pozorovatelný u jedinců z tatranských ples, kteří byli většinou výrazně tmavě pigmentovaní (pravděpodobně v důsledku působení intenzivního UV záření), oproti tomu jedinci z eutrofních rybníků byli obvykle pigmentovaní málo, někteří byli dokonce téměř transparentní (důvodem je nejspíš zvýšený predační tlak ze strany ryb a vysoká koncentrace rozpuštěných organických látek ve vodě, které tlumí negativní účinky UV záření). Populace z tůní a z vod na výsypkách byly pigmentované středně, žádné výrazné barevné odlišnosti u nich pozorovány nebyly. Co se rozdílů ve velikosti týká, tak na základě morfologického měření se podařilo zjistit, že populace z tatranských jezer jsou oproti populacím z tůní a vod na výsypkách relativně větší, kdežto populace

z rybníků jsou naopak o něco menší (viz grafy v kapitole Morfometrická analýza populací druhu *Chydorus sphaericus*).

Jedním z vysvětlení, proč nebylo při terénních odběrech nalezeno více forem/druhů rodu *Chydorus*, může být například to, že u některých variet/druhů (*Ch. gibbus*, *Ch. latus* a *Ch. piger*) se ve skutečnosti jedná o morfotypy druhu *Chydorus sphaericus*, přičemž rozdílná morfologie může být zapříčiněná stářím jedinců, jejich pohlavím nebo vlivem okolního prostředí (Smirnov 1996, Fryer 1968). Dalším možným důvodem je, že kromě druhu *Chydorus sphaericus* se ostatní variety/druhy vyskytují v jinou roční dobu než v jakou byly prováděny odběry vzorků (Fryer 1968). Popřípadě je samozřejmě také možné, že se jedná o druhy vzácnější, které nejsou tak četné a které se mohou navíc vyskytovat na jiných typech lokalit než na jakých byly prováděny odběry.

Jak už bylo řečeno dříve, typy modelových lokalit byly vybírány ve snaze pokrýt pokud možno co nejširší škálu podmínek prostředí, a to z hlediska jak fyzikálních tak chemických parametrů. Tatranská horská plesa se vyznačují především nízkým pH a s tím související zvýšenou koncentrací a toxicitou některých kovů, zejména hliníku. Dalšími typickými znaky těchto jezer jsou jejich oligotrofní charakter, nízká koncentrace rozpuštěných organických látek ve vodě (uhlík, huminové kyseliny aj.) a v důsledku toho i usnadněné pronikání škodlivého ultrafialového záření (UV) do hlubších vrstev vody (Kopáček *et al.* 2006, Sacherová *et al.* 2006, Hořická *et al.* 2006, Stuchlík *et al.* 2002). Pro rybníky je příznačná zvýšená eutrofie až hypertrofie způsobená nadměrnou koncentrací dusíku ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), fosforu ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) a organických látek ve vodě. Rybníky se také vyznačují vyšším pH, sníženou průhledností či místní anoxií u dna (Hally *et al.* 2002, Pokorný a Hauser 2002). Pro většinu vodních útvarů, ať už se jedná o jezera, rybníky, řeky nebo spodní vody, které byly nebo stále jsou ovlivňovány těžební činností, je kromě nízkého pH typická vysoká konduktivita vody, která odráží zvýšenou koncentraci rozpuštěných látek a celkový podíl minerálů ve vodě. Navíc se v těchto vodách obvykle vyskytují ve větší míře i těžké kovy (Cd, Co, Hg, Pb, Zn, Se, Mo aj.) (Banks *et al.* 1997, Belyaeva a Deneke 2007, Deneke 2000, Wollman *et al.* 2000). Pro tůň je charakteristická cyklická sezónní proměnlivost především měnící se koncentrace kyslíku a rozpuštěných i nerozpuštěných látek ve vodě či kolísání teploty vody (Hartman *et al.* 2005).

Je známo, že některé z výše jmenovaných fyzikálních a chemických parametrů prostředí mohou být pro organismy extrémní a mohou vystupovat jako potenciální stresové faktory ovlivňující biologii organismů včetně jejich genetické struktury. Konkrétně mohou

způsobovat změny v mutační rychlosti, měnit tak rychlost molekulární evoluce a zvyšovat genetickou diverzitu. Jedním z činitelů, který v důsledku svého mutačního vlivu přitahuje v současnosti pozornost vědců, je například UV záření. Bylo zjištěno, že měnící se intenzita a délka působení UV záření koreluje s mírou genetické divergence (Brash *et al.* 1991, Hebert *et al.* 2002). U planktonních zástupců kmene Foraminifera byla zjištěna až stokrát vyšší rychlost molekulární evoluce oproti bentickým zástupcům téhož kmene (Pawlowski *et al.* 1997). Podobný vliv UV záření (i když v menší míře) byl popsán i u kmene Echinodermata (Smith *et al.* 1992). Vyšší míra mutací v DNA organismů byla zjištěna i v souvislosti s vysokou koncentrací solí ve vodě. U druhů z hypersalinního prostředí (*Artemia salina*, *Artemia franciscana*, *Daphnia salina*) byla zaznamenána vyšší genetická divergence oproti sladkovodním zástupcům těchto rodů (rychlost nukleotidových substitucí vzrostla u 16S rDNA až o 50%) (Hebert *et al.* 2002). Tento nárůst ve výskytu mutací lze vysvětlovat buďto přímým vlivem zvýšené koncentrace solí na strukturu DNA, popřípadě je možné, že vysoká salinita ovlivňuje výkon DNA polymerázy a následně i přesnost DNA replikace (Hebert *et al.* 2002). Obdobně byl studován i posun v genetické struktuře DNA organismů žijících v prostředí s nízkým pH a zvýšenou koncentrací toxické formy hliníku, konkrétně u ryb druhu *Umbra limi* byl zjištěn výrazný nárůst genetické variability v tomto typu prostředí. Předpokládá se, že takové navýšení genetické diverzity, která může v důsledku příznivě ovlivňovat schopnost tolerance organismů k působení fyziologických stresových faktorů jako je právě nízké pH (Kopp *et al.* 1992). Dále existují studie zabývající se mutačním vlivem nejrůznějších těžkých kovů jako je například kadmium, zinek nebo olovo. U kadmia a zinku se předpokládá, že by mohly být příčinou mutačních posunů, ale zatím nebyl jejich přímý vliv jednoznačně prokázán. V případě olova byl mutagenní účinek již potvrzen (Martinez *et al.* 2004).

Vzhledem ke zmiňovaným účinkům stresových faktorů prostředí na strukturu DNA by se dalo předem usuzovat, že se zvýšená genetická divergence projeví i mezi studovanými populacemi druhu *Chydorus sphaericus* z různých typů modelových lokalit. Nic takového se ale na základě výsledků genetického testování neprokázalo a lze tudíž konstatovat, že rozdílné parametry přírodního prostředí nebyly pravděpodobně v tomto případě natolik extrémní, aby způsobily zásadní změny ve složení mitochondriální DNA.

### **KAPITOLA 3:**

## **MORFOMETRICKÁ ANALÝZA POPULACÍ DRUHU CHYDORUS SPHAERICUS**

### **Úvod**

Studium taxonomie, biodiverzity i fylogeneze bylo odjakživa spojeno s tvarovou analýzou. Nejinak je tomu i v dnešní době, kdy morfometrické metody, sloužící k řešení otázek týkajících se velikosti a tvaru objektů, hrají důležitou roli v biologickém výzkumu. Navíc spolu s rychlým rozvojem na poli statistiky a se snahou biologických disciplín přecházet od pouhého popisu organismů ke kvantifikaci získaných dat se zvyšuje technická propracovanost těchto metod a jejich snazší až téměř rutinní uplatnění v praxi (Adams *et al.* 2004). Rostoucí význam morfometrických metod je patrný z nedávného review (Adams *et al.* 2004), které dokládá, že počet studií využívajících geometrickou morfometrii mezi lety 1967 a 2001 narostl z několika prací na 90 až 110 prací za rok na konci sledovaného období.

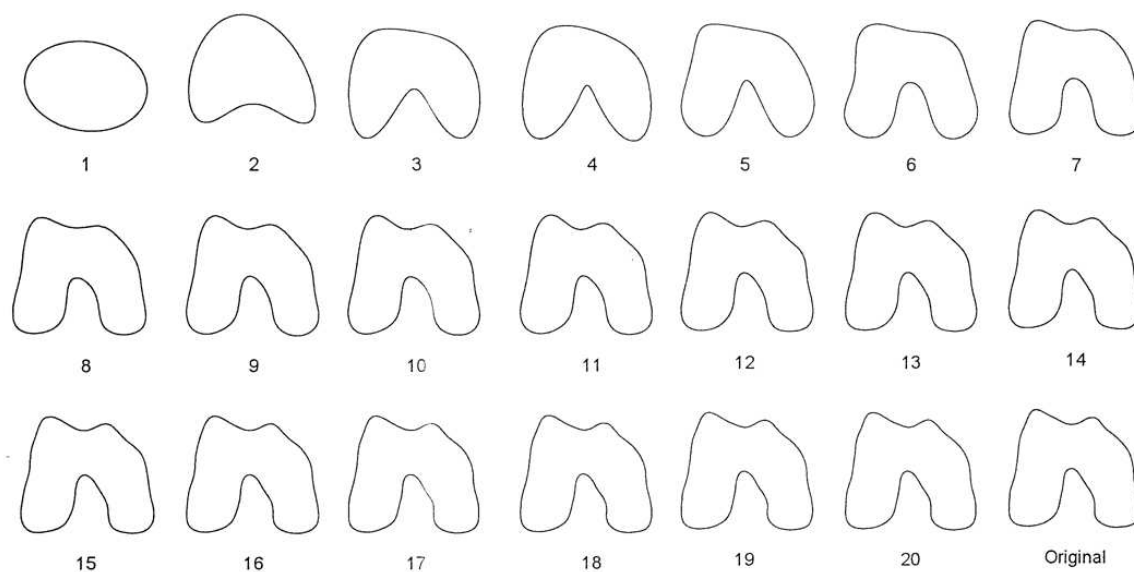
V rámci morfometrických metod rozlišujeme celou řadu měřících a vyhodnocovacích postupů, z nichž mezi dvě nejčastěji využívané skupiny postupů patří tradiční morfometrie a geometrická morfometrie.

Tradiční morfometrií, též někdy nazývanou mnohorozměrnou, se míní vícerozměrné statistické metody (např. analýza hlavních komponent, faktorová analýza, analýza diskriminačních funkcí, kanonická analýza aj.) aplikované na soubory morfologických dat vycházejících jak z lineárních rozměrů (vzdálenosti mezi body, mezi extrémy, mezi minimálním a maximálním průměrem apod.), tak z úhlových, plošných nebo objemových rozměrů. Kvůli určitým metodickým nedokonalostem a kvůli rostoucím požadavkům na vlastnosti dat přestává být ale tradiční morfometrie postupně považována za zcela dostačující pro komplexní popis objektů a stále častěji ji nahrazuje soubor metod nazývaný geometrická morfometrie. Tyto metody zahrnují analýzu obrysů a tvarů prostřednictvím křivek (např. Fourierovy analýzy) nebo význačných bodů (tzv. „landmarks“) nebo tzv. ohebných pásků (Adams *et al.* 2004, Velemínská *et al.* 2006, Zima *et al.* 2004).

Existuje celá řada prací dokládajících použití eliptické Fourierovy analýzy pro měření tvarů nejrůznějších objektů, například byly takto zkoumány lidské stehenní kosti (Le Minor a Schmittbuhl 1999), lebeční deformace (Friess a Baylac 2001), listy a kořeny rostlin (Torres *et al.* 2008, Neto *et al.* 2006, Iwata *et al.* 1998), pohlavní orgány

motýlů (Monty *et al.* 2001) a jiné. Studií vodních organismů je obecně málo, existuje několik prací týkajících se například ryb (Russo *et al.* 2007), využití při studiu vodních bezobratlých se zatím téměř výhradně věnuje laboratoř K. Schwenka v Německu (Schwenk *et al.* 2001, Schwenk *et al.* 2004). Tyto práce nicméně ukazují, že právě eliptická Fourierova analýza je velmi užitečným nástrojem.

Eliptická Fourierova analýza, na jejímž vzniku a vývoji se podíleli vědci Kuhl a Giardina (Kuhl a Giardina 1982), umožňuje kvantifikaci a popis nejen jednoduchých, ale i poměrně složitých obrysů. Tyto obrysy jsou vymezeny sérií bodů o souřadnicích  $x$  a  $y$ , přičemž jednotlivé body nemusí být podél hraniční křivky rozmístěny pravidelně. Počáteční bod křivky musí být ale jednotný pro všechny objekty, nejvhodnější je proto nějaký významný a snadno identifikovatelný bod, který je homologický pro všechny objekty. Navíc musí být provedena standardizace objektů, co se týče prostorové orientace a pokud možno i velikosti (Zima *et al.* 2004). Zkoumaný obrys je matematicky vyjádřen uspořádanou sadou harmonických složek, které jsou popsány speciálními funkcemi popisujícími elipsy. První harmonická složka přesně vyjadřuje symetrickou elipsu, následující harmonické složky pak zobrazují další tvarové detaily křivky. Reálný tvar objektu je popsán už několika prvními harmonickými složkami (jejich počet se liší u různých typů objektů podle jejich složitosti) a další harmonické složky už pak obvykle vyjadřují jemné odchylky, které jsou systematicky nevýznamné (Le Minor a Schmittbuhl 1999) (Obr. 26).



Obr. 26: Postupná rekonstrukce obrysu distální stehenní kosti člověka za použití prvních 20 harmonických složek a podoba původního tvaru (Le Minor a Schmittbuhl 1999).

Součástí funkcí popisujících jednotlivé harmonické složky jsou mimo jiné tzv. Fourierovy koeficienty (pro každou harmonickou složku se vypočítávají čtyři), které lze dále uplatnit jako vstupní data pro tzv. inverzní Fourierovu analýzu, která slouží k vytvoření průměrného tvaru složeného ze všech zkoumaných objektů, nebo pro další analýzy – např. PCA, diskriminační analýzu, shlukovou analýzu aj. (Iwata *et al.* 1998, Zima *et al.* 2004).

Cílem této části mé diplomové práce bylo za pomoci geometrické morfometrie zjistit, zda a jak jsou si morfologicky podobné jednotlivé populace druhu *Chydorus sphaericus* ze zkoumaných typových lokalit a zda jsou si podobní i jedinci v rámci těchto populací.

## **Metodika**

Pro tvarovou analýzu druhu *Chydorus sphaericus* jsem ze všech fixovaných terénních vzorků zooplanktonu, které jsem měla k dispozici, zvolila pouze ty, ve kterých bylo alespoň 15 dospělých jedinců tohoto druhu. Jednalo se konkrétně o 25 populací z vybraných modelových lokalit (Příloha 3).

Ze vzorku jsem pod binolupou vybírala vždy jen dospělé samičky s vajíčky, a to pokud možno čisté a nepoškozené. Ty jsem pak umístila do Petriho misky s 95% EtOH, kde jsem je prohlédla a případně ještě manuálně dočistila. Jedince, které jsem chtěla vyfotit, jsem pomocí Pasteurovy pipety přenesla spolu s několika kapkami 95% EtOH na podložní sklo. Kvůli snazší práci s materiálem jsem většinou nepřeváděla na podložní sklo více jak tři jedince najednou, protože 95% EtOH měl tendenci poměrně rychle vysychat. Jedince na sklíčku jsem srovnala preparační jehlou a opatrně přiklopila tenkým krycím sklem tak, aby se neponičili. Pod světelným mikroskopem jsem si na preparátu vyhledala nejzachovalejší jedince, jejichž rostrum bylo co nejvíce přiklopené k tělu a kteří se nacházeli v přesné laterální poloze (jejich dorzální okraje schránek se překrývaly). Jednotlivé jedince jsem posléze fotila pomocí digitální kamery instalované na světelném mikroskopu. Zhotovovala jsem obvykle dvě fotografie každého exempláře, jednou s objektivem o zvětšení 10x a jednou o zvětšení 20x. Nasnímaný a zároveň digitalizovaný obraz sledovaného objektu byl převeden do počítače prostřednictvím softwaru LUCIA (Laboratory Universal Computer Image Analysis) a uložen ve formátu \*.jpg.

Digitální fotografie byly následně použity pro tvarovou analýzu. Fotografie bylo nutno před vlastní analýzou ještě poupravit. V programu ACDSee 9 Photo Manager byl upraven jednak kontrast a jas pro lepší zviditelnění obrysu sledovaných objektů, dále byla upravena velikost fotografií tak, aby velikost jedinců odpovídala jednotnému zvětšení 10x, a nakonec byla upravena orientace a poloha jedinců na fotografiích tak, že rostrum jedinců směřovalo doleva a spojnice naupliového oka a posteriorního „výběžku“ (místo na zadní straně karapaxu kde se spojují dorzální okraje schránky) byla přibližně ve vodorovné poloze (Obrázek 27).



Obr. 27: Orientace a poloha analyzovaných jedinců spolu s vyznačením vynášených bodů.

Pro účely geometrické morfometrie byla analýza tvaru každého jedince prováděna vynesemím série přibližně 50 bodů v rovnoměrných vzdálenostech podél celého jeho obrysu, přičemž výchozím bodem byl posteriorní „výběžek“ a body byly vynášeny po směru hodinových ručiček. Vyznačení jednotlivých bodů a digitalizace souřadnic byly provedeny v programu tpsDig (Rohlf 2006). Souřadnice  $x$  a  $y$  těchto bodů byly následně použity pro eliptickou Fourierovu analýzu.

Pro účely tradiční morfometrie byla analýza prováděna měřením délkových a šířkových vztahů. Parametr délky představoval rozměr úsečky vycházející ze středu naupliového oka a sahající až k posteriornímu „výběžku“. Rozměr kolmice na tuto úsečku v nejvyšším bodě horní strany karapaxu pak představoval parametr výšky. Měření



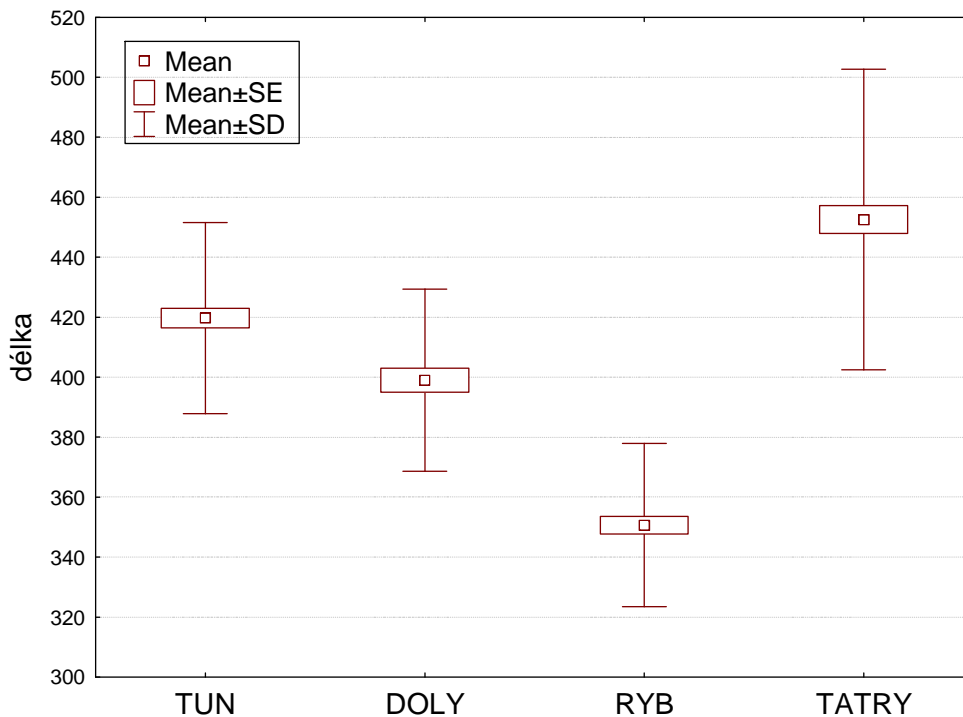
jednotlivých vzdáleností byla rovněž prováděna v programu tpsDig (Rohlf 2006), rozměry byly udávány v pixelech.

Vyhodnocená data byla dále upravována v programu MS Excel a zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (principal components analysis – PCA) v programu STATISTICA 7.0. (StatSoft).

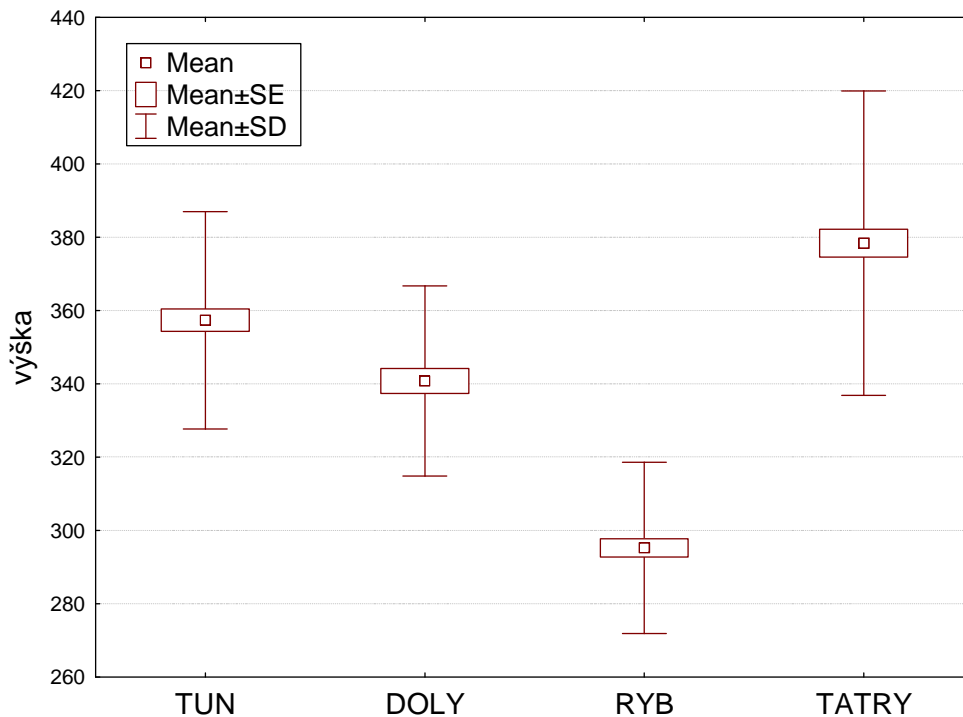
## **Výsledky**

Pro tvarovou analýzu zaměřenou na obrysové linie zástupců druhu *Chydorus sphaericus* bylo použito celkem 25 populací ze čtyř typů modelových lokalit: 7 populací z tatranských jezer, 7 populací z rybníků na Klatovsku a Blatensku, 4 populace z tůní na Kokořínsku a u Veselí nad Lužnicí a 7 populací z vodních ploch na výsypkách v Podkrušnohoří (Příloha 3). Z každé populace bylo analyzováno vždy přibližně 15 jedinců, kompletní soubor dat čítal celkem 357 analyzovaných jedinců.

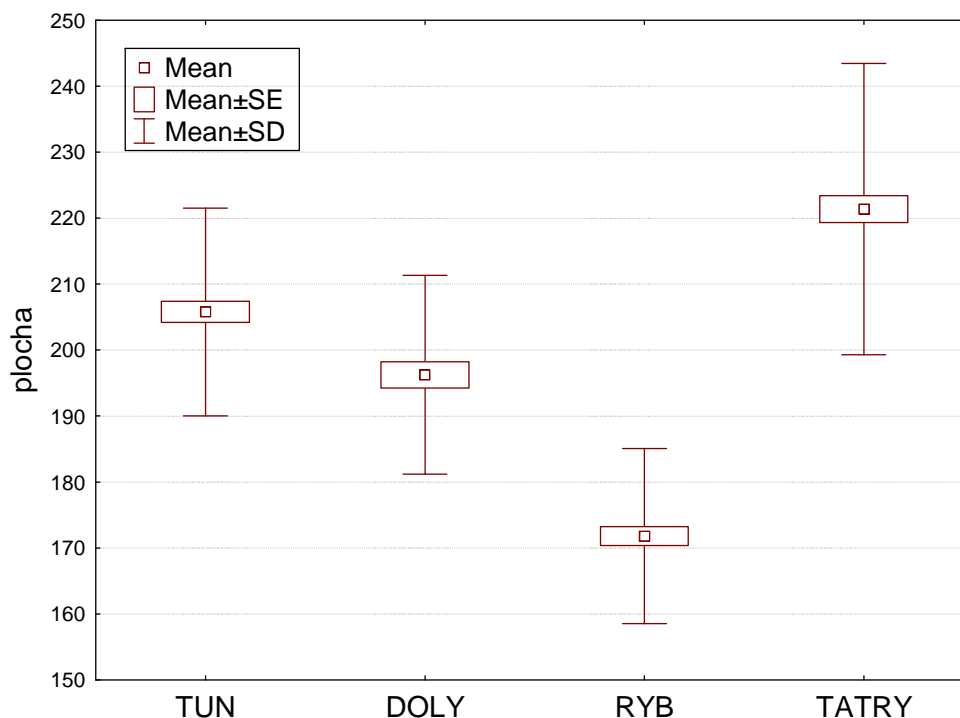
Jedinci ze sledovaných populací byli nejprve srovnáni pomocí lineárních parametrů. Jednotlivá porovnání naměřených délek, šířek a vypočítaných celkových ploch (celkovou plochou se v tomto případě rozumí laterální plocha vymezená obrysovou křivkou) všech jedinců rozčleněných podle typu lokality jsou uvedeny v grafech 1, 2 a 3 (hodnoty jsou uvedeny v pixelech). Všechny tři parametry byly testovány analýzou variance (ANOVA) a následně Fisherovým LSD post-hoc testem. Všechny čtyři skupiny populací se statisticky významně ( $p < 0,01$ ) ve sledovaných parametrech navzájem liší. Největší rozdíly jsou patrné mezi populacemi z horských jezer a z rybníků, kdežto mezi populacemi z tůní a vod na výsypkách jsou rozdíly jen malé (detailní tabulky statistických dat viz Příloha 4).



Graf 1: Box-plot znázorňující rozdíly v délkách (v pixelech) mezi čtyřmi skupinami populací z různých modelových lokalit; středy boxů představují průměrné hodnoty



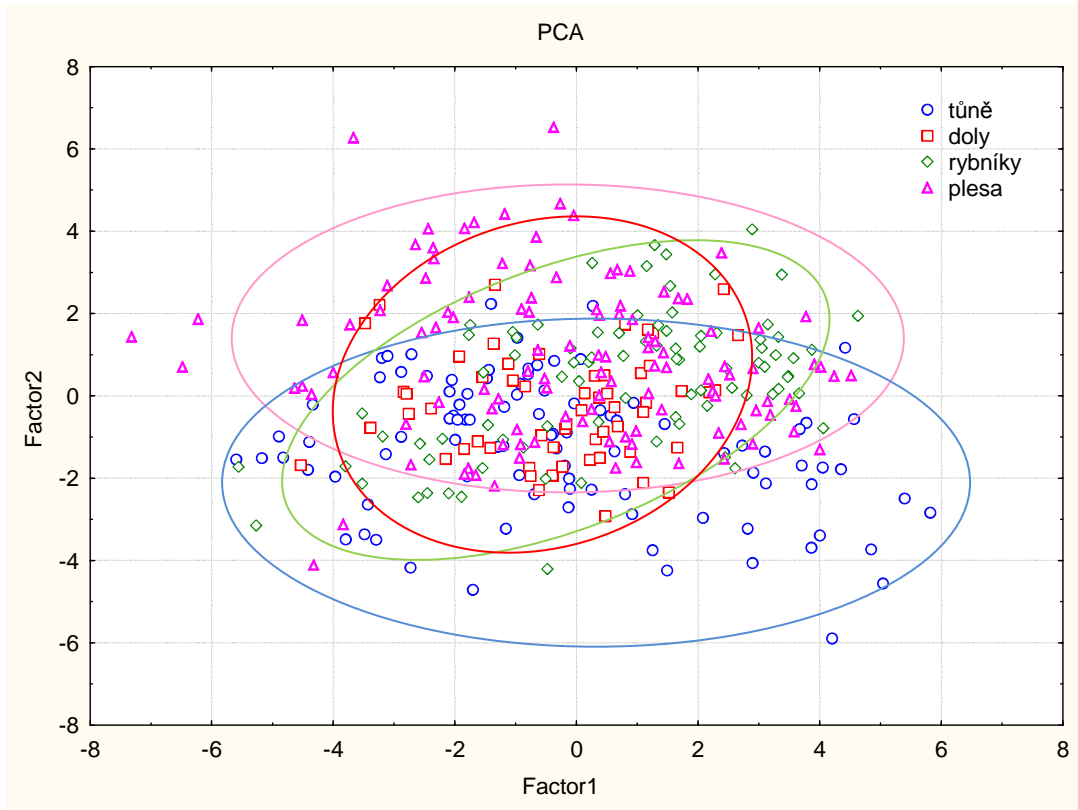
Graf 2: Box-plot znázorňující rozdíly ve výškách (v pixelech) mezi čtyřmi skupinami populací z různých modelových lokalit; středy boxů představují průměrné hodnoty



Graf 3: Box-plot znázorňující rozdíly v plochách (v pixelech<sup>2</sup>) mezi čtyřmi skupinami populací z různých modelových lokalit; středy boxů představují průměrné hodnoty

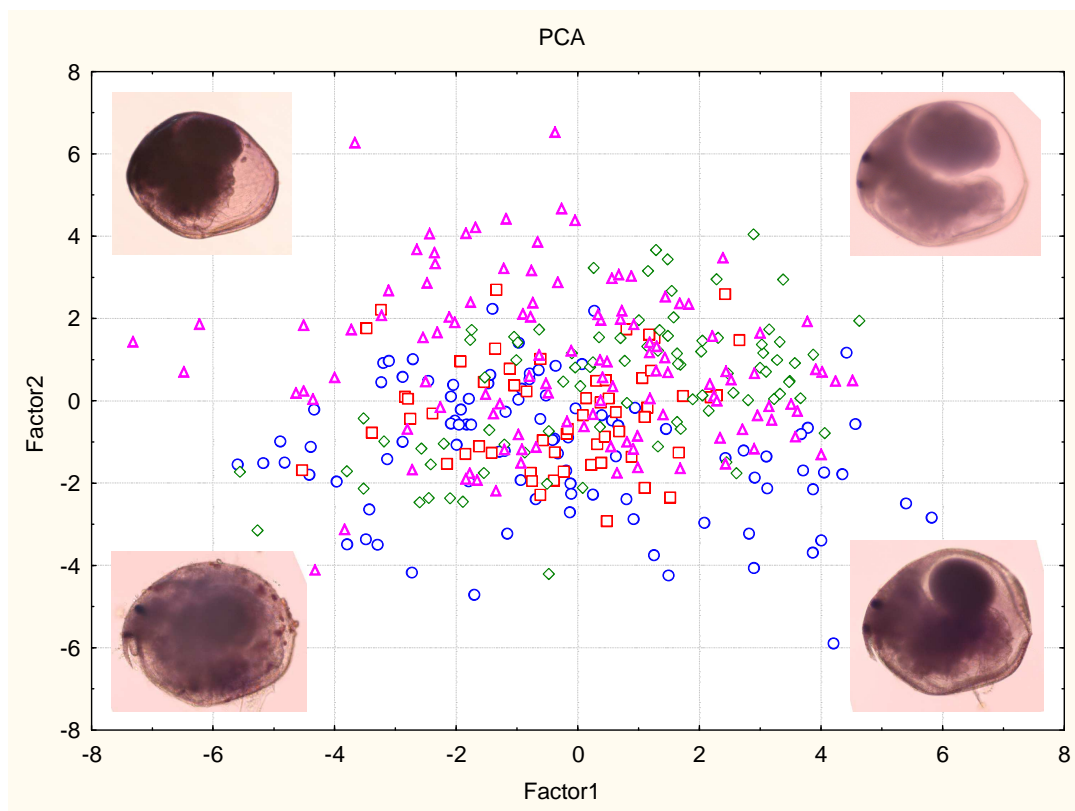
Na základě výsledků získaných zpracováním morfometrických dat (eliptická Fourierova analýza a PCA) byly sestaveny následující grafy, které přehledně shrnují tvarovou variabilitu populací druhu *Chydorus sphaericus* (Graf 4, Graf 5, Graf 6).

Graf 4 znázorňuje podobnost všech jedinců ze studovaných populací v závislosti na typu modelové lokality (tůň, doly, rybníky, plesa), z níž byli jedinci odebíráni. Z grafu je poměrně patrné, že jedinci z téhož typu lokality tvoří shluky, které se sice částečně prostupují, ale i přesto lze rozeznat určité tendence k vzájemnému odlišení. To vypovídá o tom, že jedinci v rámci jednoho typu lokality jsou si co do tvaru podobnější v porovnání s jedinci z lokality jiného typu. Populace z tatrských ples (FU4, FU7, GA2, JA5, NE1, SL2 a VS15) se částečně vyčleňují do shluku, který převládá v horní polovině grafu. To samé platí i pro populace z tůní (07KOK, 23KOK, 25KOK, 31KOK, 32KOK, 39KOK a TR2), které ale tvoří shluk naopak spíše v dolní polovině grafu. U populací z rybníků (CE, NR, PE, PS2, TO, VK a VL) a z dolů (BP, KR, PV a ZJ) nejsou v tomto grafu shluky tolik patrné.



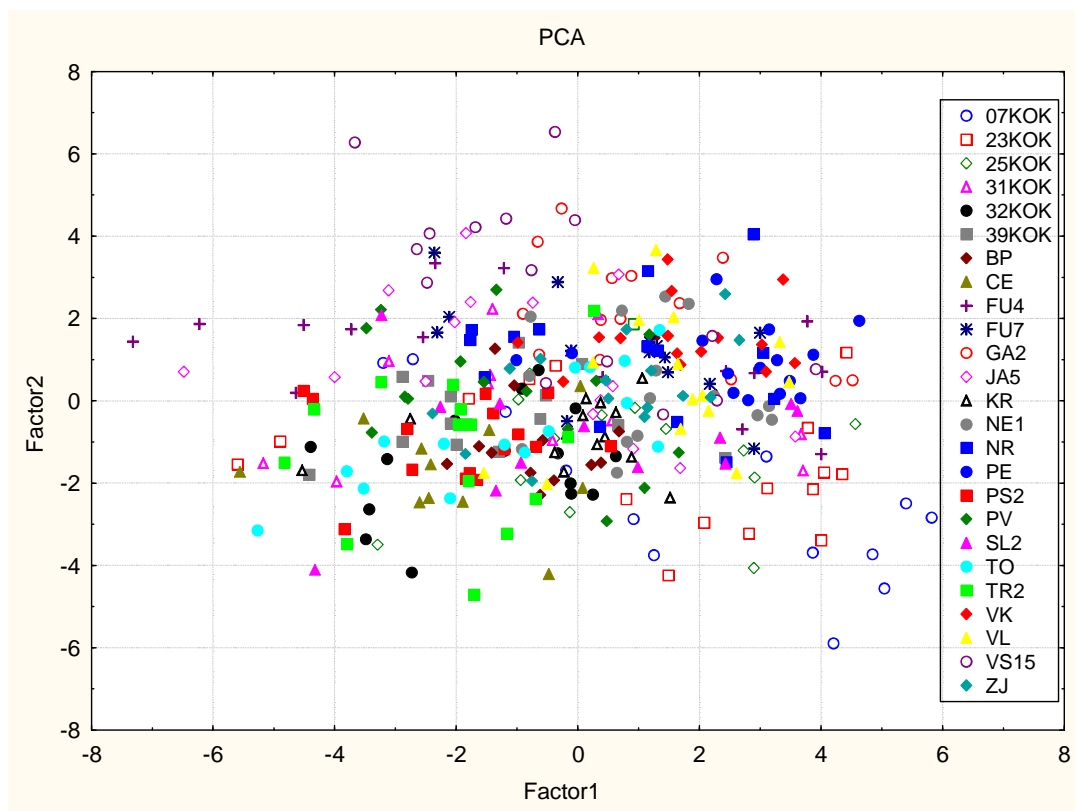
Graf 4

Graf 5 je rozšířením Grafu 4, jsou zde pro lepší znázornění rozdílných trendů uvedeny i fotografie konkrétních zástupců druhu *Chydorus sphaericus*, kteří představují extrém v jednotlivých trendech a na kterých je relativně dobře vidět měnící se tvar obrysové linie. Nejvýrazněji je rozdíl v celkovém tvaru vidět mezi jedincem v levém horním rohu grafu (podlouhlý oválný tvar) a jedincem v pravém dolním rohu grafu (kulatý tvar).



Graf 5

Graf 6 pak zobrazuje prosté srovnání všech populací, bez příslušnosti k typu lokality. Žádná populace není statisticky významně odlišná od ostatních. Jedinci v rámci kompletního souboru vytvářejí více či méně kompaktní nahloučení, která odpovídají jednotlivým populacím, z čehož lze opět vyvodit, že jedinci uvnitř konkrétních populací jsou si o něco podobnější než mezi populacemi. Navíc i z tohoto grafu je zřejmé, že v některých populacích jsou si jedinci více podobní než v jiných. Například jedinci v rámci populací KR, PE, CE a BP tvoří dobře viditelné shluky a lze říci, že jsou si více podobní oproti jedincům z ostatních populací. Naopak například shluky u populací NR, SL2 či 07KOK již tak zjevné nejsou.



Graf 6

Z morfometrické analýzy zaměřené na obrysově linie jedinců druhu *Chydorus sphaericus* vychází, že 7,4% z celkové tvarové variability lze vysvětlit modelovým typem lokalit (tedy to, zda jedinci pochází z tůně, plesa, rybníka nebo výsypky), 29,7% vysvětlují lokality v rámci svého typu (tedy variabilita populací uvnitř jednotlivých typů). Celková variabilita mezi lokalitami tvoří tudíž 37,1% ( $p < 0,002$ ). Zbýlých 62,9% tvoří individuální variabilita jedinců uvnitř jednotlivých lokalit.

## Diskuze

Zástupci druhu *Chydorus sphaericus* jsou na první pohled tvarově uniformní a nevykazují nijak zvlášť výrazné morfologické rozdíly. Při detailnějším zkoumání některých determinačních znaků je ale možné nalézt řadu drobných tvarových odlišností. Nedořešenou otázkou přitom stále zůstává, zda lze tyto rozdíly považovat za dostatečně výrazné na to, aby umožnily odlišení samostatného druhu, nebo zda mohou být projevem tvarové plasticity, která není geneticky fixovaná, ale je pouze podmíněně vyvolaná působením okolního přírodního prostředí.

V průběhu historického vývoje taxonomické klasifikace rodu *Chydorus*, respektive druhu *Chydorus sphaericus*, došlo několikrát k tomu, že právě na základě těchto malých odlišností byly popsány zcela nové druhy. Později se ale v několika případech podařilo prokázat, že se jedná pouze o zmiňovanou tvarovou plasticitu a že popsané „druhy“ jsou ve skutečnosti morfotypy/variety druhu *Chydorus sphaericus*. Jako příklad takových sporně určených „druhů“ lze uvést druh *Chydorus mutilus*, který byl popsán na základě „hrbu“ na dorzální straně samic, druh *Chydorus minor* determinovaný na základě jeho malé velikosti, nebo druhy *Chydorus rylovi*, *Chydorus herrmanni* a *Chydorus arcticus*, které byly rovněž určeny podle specifických odchylek některých morfologických znaků (délka a tvar rostra, postavení hlavových pórů, políčkování karapaxu, tvar a počet drápků postabdomenu) (Smirnov 1996, Røen 1987, Brancelj 1996). V případě druhů rodu *Chydorus* popsaných na našem území se pochybnosti ohledně správného taxonomického určení týkají především druhů *Chydorus gibbus*, *Chydorus latus* a *Chydorus piger*, u nichž je rovněž možné, že se jedná o variety druhu *Chydorus sphaericus* (Smirnov 1996).

Kromě výše uvedených prací existují i další morfologicko-ekologické studie, které u druhu *Chydorus sphaericus* (popřípadě i u jiných zástupců rodu *Chydorus*) dokládají určitý potenciál k tvarovým změnám a tuto tvarovou plasticitu vysvětlují obvykle nejruznějšími faktory včetně působení parametrů prostředí. U druhu *Chydorus sphaericus* byla například popsána sezónní tvarová proměnlivost dorzální strany schránek, kdy u některých jedinců dochází ke vzniku specifického zádového „hrbu“. Předpokládá se, že důvodem je rozdílná fáze reprodukčního cyklu, a jedinci se zádovým „hrbem“ jsou považováni za samice, u kterých došlo k tvarové deformaci v důsledku odhození efipia (Smirnov 1996, Brancelj 1996, Fryer 1968). Další rozdíly v morfologii byly popsány například v závislosti na pohlaví jedinců. Konkrétně u druhu *Chydorus faviformis* se u samic vyskytuje extrémně zvýrazněné políčkování buněk karapaxu, kdežto u samců tento znak chybí, a ti se podobají spíše zástupcům druhu *Chydorus sphaericus* (Frey 1982, Smirnov 1996). U druhu *Chydorus sphaericus* lze nalézt vedle tvarových změn i změny v zabarvení karapaxu. U zooplanktonu obecně je známo, že jedinci pocházející z vysokohorských oligotrofních jezer jsou v důsledku vysokého obsahu pigmentu melaninu ve schránkách výrazně tmavě zbarveni. Oproti tomu jedinci žijící třeba v eutrofních rybnících mají melaninu málo a jsou často téměř průhlední. Barevná rozdílnost je dána intenzitou dopadajícího ultrafialového záření a dále také množstvím rozpuštěných organických látek ve vodě, charakterem makrovegetace, přítomností vodního květu či

roční dobou (Rautio a Korhola 2002). Tento poznatek platí i v případě druhu *Chydorus sphaericus*. Dalším morfologickým znakem, u něhož se projevuje určitá míra variability v závislosti na prostředí, je tloušťka schránek. Podařilo se zjistit, že vlivem zvýšené koncentrace rybích kairomonů ve vodě dochází k zesilování tloušťky schránky. U perlooček byly tyto rozdíly studovány zatím jen u rodu *Daphnia*, nicméně se dá předpokládat, že se podobným způsobem projeví i u jiných zástupců zooplanktonu, například i u druhu *Chydorus sphaericus* (Laforsch *et al.* 2004).

Navzdory tomu, že se geometrická morfometrie stává v současnosti stále častěji využívanou metodou a pomalu roste počet vědeckých studií, v nichž se uplatňuje, tak práce tohoto druhu, které by se zaměřovaly na vodní planktonní společenstva téměř chybí. Existuje jen několik málo morfometrických analýz týkajících se tvarové diferenciace u rodu *Daphnia* (Schwenk *et al.* 2004, Schwenk *et al.* 2001), u fytoplanktonu byla měření tvarových rozdílů prováděna například na chrysomonádách (Pichrtová 2007). Analýzy tvarové rozmanitosti druhu *Chydorus sphaericus* však chybí zcela. Tato diplomová práce je první, která přináší nové poznatky ohledně morfologické plasticity jmenovaného druhu a která testuje celkem 25 populací druhu *Chydorus sphaericus* ze čtyř typů modelových lokalit, jež se lišily vlastnostmi prostředí.

Na základě nejprve přímého pozorování a následného exaktního morfologického měření se podařilo zjistit, že studování jedinci druhu *Chydorus sphaericus* z různých lokalit vykazují rozdíly nejen ve tvaru, ale i v zabarvení a velikosti. Při sledování barevnosti schránek jedinců se ukázalo, že populace z vysokohorských jezer mají schránky výrazně tmavě pigmentované. Příčinou zvýšené produkce barviva melaninu a jeho následné inkorporace do stěn schránek je nejspíše intenzivní působení ultrafialového záření. V těchto horských jezerech, jež mají často silně oligotrofní charakter, se ultrafialové záření dostává i do hlubších vrstev vody pod hladinou a může nepříznivě ovlivňovat životaschopnost a reprodukci organismů. Intenzivní tvorba melaninu je tudíž nezbytnou podmínkou k přežití. Navíc tento typ vysokohorských jezer, ze kterých vzorky zooplanktonu pocházejí, neobsahuje většinou žádnou rybí obsádku, což pro tmavě zbarvené jedince znamená, že nejsou v důsledku své zvýšené viditelnosti ohroženi vyšší mírou predčního tlaku a nemusí tvorbu melaninu omezovat. Oproti tomu populace z ostatních typů modelových lokalit nijak extrémně pigmentované nejsou, populace z eutrofních rybníků jsou dokonce téměř průhledné. V eutrofních rybnících bývá obvykle vysoká koncentrace organických látek, vegetační zákal a hojná makrovegetace, které brání



pronikání ultrafialového záření do vody a chrání tak vodní živčichy před jeho negativními vlivy. Na rozdíl od horských jezer je v našich rybnících rybí obsádka vysoká a celkově se vyskytuje i větší množství bezobratlých predátorů, takže je z důvodu ochrany před ulovením nízká pigmentace velmi výhodná. Vzhledem k tomu, že zkoumané vodní plochy na výsypkách nebyly nijak zvlášť eutrofizované a byla zde ve většině případů absence ryb, tak by se dalo soudit, že populace z těchto lokalit budou tmavěji zbarvené podobně jako populace z horských jezer. To se ale nepotvrdilo. Populace se pohybovaly přibližně na pomezí dvou zmiňovaných barevných extrémů horských jezer a eutrofních rybníků, což napovídá tomu, že zde svou roli hrají ještě další parametry prostředí (například pH). Co se týká tůní, tak ty představují lokality poměrně eutrofní, ale na rozdíl o rybníků bez rybí obsádky a bez význačných predátorů, takže průměrná intenzita zbarvení vcelku dobře odpovídá. Nejvhodnějším způsobem, jak by se daly barevné rozdíly mezi populacemi sledovat a přesně kvantifikovat, je měření koncentrace melaninu ve schránkách jedinců. Tato možnost byla při analýzách rovněž uvažována, ale kvůli technickým obtížím při procesu extrakce melaninu se jí nepodařilo zrealizovat.

Co do velikosti byly mezi populacemi z různých typů lokalit rovněž naměřeny určité rozdíly (uváděno v pixelech). U populací z vysokohorských tatranských jezer byla zjištěna průměrná délka 452,6; výška 378,4 a plocha 221,4. U populací z rybníků dosahovaly průměrné hodnoty délky 350,7; výšky 295,2 a plochy 171,8. Populace z tůní měly průměrnou délku 419,7; výšku 357,4 a plochu 205,8. A populace z vod na výsypkách dosahovaly průměrné délky 399,0; výšky 340,8 a plochy 196,3. Z uvedených výsledků jednoznačně vyplývá, že celkově největší byli jedinci z vysokohorských populací, kdežto jedinci z rybníků byly nejmenší. Populace z tůní a z vod na výsypkách se velikostně pohybovaly přibližně uprostřed mezi horskými a rybníčními populacemi (obdobně jako v případě zbarvení). Jako potenciální důvody rozdílných velikostí by v úvahu přicházely rozdílná dostupnost potravy, různá míra predačního tlaku, rozdílná doba odběru vzorků během sezóny nebo vliv některého z parametrů prostředí (pH, teplota, koncentrace kyslíku, vodivost, těžké kovy aj.). Vzhledem k tomu, že se ale na základě získaných výsledků nepodařil prokázat výhradní vliv některého z parametrů prostředí na velikost, tak je pravděpodobné, že se na velikostním rozrůznění jedinců a populací podílí kombinace všech těchto faktorů nebo že zde působí ještě zcela jiný prvek, který nebyl do analýzy zahrnut. Navíc vzhledem k výsledkům předešlého genetického testování byl vyloučen vliv genetických rozdílů na tvarovou plasticitu.

Při hodnocení obrysového tvaru jednotlivých jedinců se z výsledků eliptické Fourierovy analýzy a PCA podařilo zjistit, že ve zkoumaném souboru vzorků existuje jak větší podobnost mezi jedinci v rámci různých populací, tak jsou si mezi sebou podobnější i populace v rámci typu modelové lokality. Z hlediska typu lokality se alespoň částečně oddělily populace z horských ples a z tůní, kdežto populace z rybníků a z vod na výsypkách se rozprostřely mezi ně. Rovněž mezi jedinci z různých populací (patrně například u KR, PE, CE a BP) se projevila vyšší míra podobnosti oproti ostatním populacím. Původní předpoklad, že by některý z parametrů prostředí (např. pH, vodivost nebo teplota) mohl mít významný vliv na tvarové rozdíly mezi populacemi z různých typů lokalit se nepodařilo jednoznačně prokázat, což opět komplikuje možné vysvětlení tvarové variability. Nicméně je zjevné, že vliv různých typů lokalit na tvarovou plasticitu jedinců existuje, ale pravděpodobně se jedná o komplexní spolupůsobení více faktorů prostředí.

Vzhledem k potenciální tvarové variabilitě jedinců druhu *Chydorus sphaericus* během sezóny by bylo samozřejmě optimální, kdyby byly všechny terénní vzorky zooplanktonu odebírány každý rok ve stejnou dobu (měsíc). Tento požadavek se ale z technických důvodů nepodařilo zcela zajistit a odběry byly prováděny průběžně od července až do listopadu. Pro tvarové analýzy byly proto alespoň použity pouze dospělé samičky s vajíčky, aby se snížila pravděpodobnost, že by morfologické rozdíly mohly být způsobeny rozdílnou fází reprodukčního cyklu a že by se jednalo o změny v důsledku odhození efiípie. Ale ani přes toto opatření nelze jednoznačně vyloučit, že by určitá část tvarové variability, která se u studovaných organismů projevila, mohla být do jisté míry právě důsledkem sezónní proměnlivosti. Dalším faktorem, u kterého by se dal uvažovat eventuální vliv na obrysovou morfologii jedinců, je způsob fixace vzorků při odběrech zooplanktonu. Vzorky byly již v terénu fixovány 96% ethanolem a v laboratoři pak byli jedinci z různých populací navzájem srovnáváni pod binolupou nebo mikroskopem a byly sledovány na první pohled zjevné tvarové odchylky. U několika málo jedinců byly zjištěny částečné deformace rostra, kdy se rostrum nepřírozně odchlipovalo od zbytku těla. Pro zjištění, zda vznik těchto deformací nesouvisí se způsobem fixace, respektive s koncentrací fixačního činidla, byl proveden následující pokus. Do pěti plastických lahvíček byl rozředěn 96% ethanol na výsledné koncentrace 50%, 60%, 70%, 80% a 90%, šestá lahvíčka byla naplněna nezředěným 96% ethanolem. Do každé lahvíčky bylo umístěno vždy 20 jedinců druhu *Chydorus sphaericus* a takto nafixované vzorky se nechaly stát do druhého dne, aby se případný vliv fixačního činidla maximálně projevilo.

Následující den byly organismy zkoumány a srovnávány. V jednotlivých lahvičkách s ethanolem bylo nalezeno vždy víceméně podobné množství jedinců s deformovaným rostrem, tudíž lze předpokládat, že zde neexistuje žádná přímá závislost mezi koncentrací fixačního činidla a počtem vzniklých tvarových odchylek a že k deformacím dochází nejspíše pouze vlivem náhody. Nicméně aby se snížila možnost, že takto nepřírozně tvarově odlišní jedinci negativně ovlivní výsledky morfologických analýz, byli pro jistotu předem z testování vyloučeni a pro studii byli použiti pouze kompaktní jedinci s přiloženým rostrem.

V současné době prakticky neexistuje žádná studie, která by se podobným způsobem zabývala tvarovou variabilitou zooplanktonu v závislosti na prostředí a jejíž výsledky by byly relevantní vzhledem k těm, které se podařilo získat v této diplomové práci. Práce využívající eliptickou Fourierovu analýzu bývají zaměřené na zcela jiné taxony organismů a jejich data se většinou zaměřují na odlišnou problematiku, tudíž srovnávání získaných dat s daty jiných studií by bylo neefektivní.

Hlavním přínosem této studie tedy je, že se podařilo ukázat, že i u vnitrodruhového srovnání velmi příbuzných populací tohoto morfologicky málo variabilního druhu lze nalézt rozdíly, které je do určité míry možné korelovat s prostředím, ve kterém žijí.

## **ZÁVĚRY**

Výsledky mé vědecké práce týkající se genetické a morfologické variability druhu *Chydorus sphaericus* lze přehledně shrnout do několika následujících bodů:

- Všechny kulovité populace rodu *Chydorus* ze čtyř typů modelových lokalit (horská plesa, rybníky, tůně, vody na výsypkách) lze na základě genetického testování spolehlivě zařadit do druhu *Chydorus sphaericus*.
- Vliv rozdílných podmínek prostředí se na genetickém rozdělení zkoumaných populací žádným zásadním způsobem neprojevuje. Z celého souboru analyzovaných populací se částečně vyčlenily pouze populace z Vysokých Tater, ostatní populace vytvořily homogenní směs bez rozdílů. Genetická divergence populací z Vysokých Tater je nízká a je pravděpodobně dána historickým vývojem dané oblasti, nikoliv přímým vlivem chemických či fyzikálních faktorů.
- Na základě morfometrických měření se zjistilo, že populace druhu *Chydorus sphaericus* ze sledovaných lokalit se liší nejen v zabarvení a velikosti, ale i v obrysovém tvaru. Vzhledem k tomu, že pozorované rozdíly mezi populacemi se shodují s typovým rozlišením lokalit, lze usuzovat, že morfologická plasticita jedinců v populacích je zapříčiněna působením odlišného prostředí, nicméně výhradní vliv některého z parametrů prostředí se jednoznačně neprokázal, tudíž zde působí pravděpodobně kombinace více faktorů nebo další prvky, které nebyly v této studii uvažovány. Navíc vzhledem k výsledkům genetického testování lze s jistotou říci, že tvarová plasticita není dána genetickým rozdílem.

**SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY**

- Adams D.C., Rohlf F.J. a Slice D.E.** (2004): Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the 'Revolutin'. Italian Journal of Zoology, 71: 5-16
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. a Walter P.** (2002): Molecular Biology of the Cell. Garland Science. 4. Vydání
- Amoros C.** (1984): Introduction Pratique a la Systematique des Organismes des Eaux Continentales Francaises – Crustaces, Cladoceres. Bulletin de la Societe Linneenne de Lyon – 53année, n°3
- Banks D., Younger P.L., Arnesen R.T., Iversen E.R. a Banks S.B.** (1997): Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. Environmental Geology 32 (3), 157-174, October
- Bejdák P.** (2006): Využití molekulárních markerů pro fylogenetické a taxonomické analýzy dvoukřídleho hmyzu (Diptera). Bakalářská práce. Ústav experimentální biologie - Oddělení genetiky a molekulární biologie. Brno
- Belyaeva M. a Deneke R.** (2007): Colonization of acidic mining lakes: *Chydorus sphaericus* and other Cladocera within a dynamic horizontal pH gradient (pH 3-7) in Lake Senftenberger See (Germany). Hydrobiologia 594: 97-108
- Benzie J.A.H.** (2005): Cladocera: The Genus Daphnia (including Daphniopsis). Backhuys Publishers, Leiden (publikace ze série určovacích klíčů: Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World; No. 21)
- Boix D., Sala J., Gascón S. a Brucet S.** (2006): Predation in a temporary pond with special attention to the trophic role of *Triops cancriformis* (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca). Hydrobiologia 571 (1): 341-353
- Boronat L., Miracle M.R. a Armengol X.** (2001): Cladoceran assemblages in a mineralization gradient. Hydrobiologia 442: 75-88
- Bossuyt B.T.A. a Janssen C.R.** (2005): Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. Environmental Pollution 136:145-154
- Brancelj A.** (1996): *Chydorus mutilus* Kreis, 1921 – postephippial form of *Chydorus sphaericus*. Hydrobiologia 323: 45-59
- Brandl Z.** (nepublikovaný rukopis): Obrazový klíč k určování buchanek (Cyclopidae) povrchových vod území Československa
- Brash D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., Halperin A.J. a Ponten J.** (1991): A role for sunlight in skin cancer: UV induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (88): 10124-10128

- Brower A.V.Z.** (1994): Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91: 6491-6495
- Canapa A., Barucca M., Marinelli A. a Olmo E.** (2000): Molecular Data from the 16S rRNA Gene for the Phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Molecular Evolution* 50 (1): 93-97
- Cantatore P., Roberti M., Rainaldi G., Gadaleta M.N. a Saccone C.** (1989): The complete nucleotide sequence, gene organization and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. *J. Biol. Chem.* 264: 10965-10975
- Clement M., Posada D. and Crandall K.** (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.
- Colbourne J.K., Hebert P.D.N.**(1996): The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda: A molecular phylogenetic approach. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON SERIES B-BIOLOGICAL SCIENCES* 351 (1337): 349-360
- Cook C.E.** (2005): The complete mitochondrial genome of the stomatopod crustacean *Squilla mantis*. *BMC Genomics* 6: 105
- Cook C.E. a Mostovski M.B.** (2002): 16S mitochondrial sequences associate morphologically dissimilar males and females of the family Phoridae (Diptera). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 77:267-273.
- Crease T.J.** (1999): The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* 233: 89-99
- Dekker T., Greve G.D., Ter Laak T.L., Boivin M.E., Veuger B., Gortzak G., Dumfries S., Lückner S.M.G., Kraak M.H.S., Admiraal W. a van der Geest H.G.** (2006): Development and application of sediment toxicity test using the benthic cladoceran *Chydorus sphaericus*. *Environmental Pollution* 140: 231-238
- Deneke R.** (2000): Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values  $\leq 3$ . *Hydrobiologia* 433: 167-172
- Duffy M.A., Tessier A.J., Kosnik M.A.** (2004): Testing the ecological relevance of *Daphnia* species designations. *Freshwater biology* 49(1):55-64
- Einsle U.** (1996): Copepoda: Cyclopoida – Genera Cyclops, Megacyclops, Acanthocyclops. SPB Academic Publishing, Amsterdam (publikace ze série určovacích klíčů: Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World; No. 10)
- de Eyto E., Irvine K. a Free G.** (2002): The use of members of the family Chydoridae (Anomopoda, Branchiopoda) as an indicator of lake ecological quality in Ireland. *Biology and Environment. Proceedings of the Royal Irish Academy* 102B (2): 000-000

- de Eyto E., Irvine K., García-Criado F., Gyllström M., Jeppensen E., Kornijow R., Miracle M.R., Nykänen M., Bareiss Ch., Cerbin S., Salujõe J., Franken R., Stephens D. a Moss B.** (2003): The distribution of chydorids (Branchiopoda, Anomopoda) in European shallow lakes and its application to ecological quality monitoring. *Arch. Hydrobiol.* 156 (2): 181-202
- Duigan C.A. a Murray D.A.** (1987): A contribution to the taxonomy of *C. sphaericus* sens. lat. (Cladocera, Chydoridae). *Hydrobiologia* 145:113-124
- Ezechel M.** (2007): Voda v krajině – tůňe a mokřady. ČZS Hortiklub Praha, Zpravodaj č. 106
- Fott J., Pražáková M., Stuchlík E. a Stuchlíková Z.** (1994): Acidification of lakes in Šumava (Bohemia) and in the High Tatra Mountains (Slovakia). *Hydrobiologia* 274: 37-47
- Frey D.G.** (1980): On the plurality of *Chydorus sphaericus* (O.F.Müller) (Cladocera, Chydoridae), and designation of a neotype from Sjaelsø, Denmark. *Hydrobiologia* 69 (1-2): 83-123
- Frey D.G.** (1982): Honeycombing of the Carapace in the Chydorid Cladocera: The Elusive Male of *Chydorus faviformis*. *Journal of Crustacean Biology* 2 (4): 469-476
- Frey D.G.** (1993): The penetration of cladocerans into saline waters. *Hydrobiologia* 267: 233-248
- Friess M. a Baylac M.** (2001): Assessing the effects of artificial cranial deformation using Elliptic Fourier Analysis. *American Journal of Physical Anthropology* 32: 66-66
- Fryer G.** (1968). Evolution and adaptive radiation in the Chydoridae (Crustacea: Cladocera): a study in comparative functional morphology and ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 254 (795): 221–385.
- García-Criado F., Tomé A., Vega F.J. a Antolín C.** (1999): Performance of some diversity and biotic indices in rivers affected by coal mining in northwestern Spain. *Hydrobiologia* 394: 209-217
- Goetze E.** (2003): Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 2321-2331
- Hall T.A.** (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hally J., Svoboda S., Vulterin J., Holada K., Pospíšil J., Vosičková J. a Panovská Z.** (2002): Prací prostředí, životní prostředí a environmentální výchova. Univerzita Karlova, Praha. 8 s.

- Hansson L.A.** (2000): Induced pigmentation in zooplankton: a trade-off between threats from predation and ultraviolet radiation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267 (1459): 2327-2331
- Hansson L.A.** (2004): Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* 85 (4): 1005-1016
- Hartman P., Příkryl I. a Štědranský E.** (2005): *Hydrobiologie*. Informatorium, Praha
- Hebert P.D.N. a Emery C.J.** (1990): The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Functional Ecology* 4: 703-710
- Hebert P.D.N., Remigio E.A., Colbourne J.K., Tailor D.J. a Wilson C.C.** (2002): Accelerated molecular evolution in halophilic Crustaceans. *Evolution* 56(5): 909-926
- Hellsten M, Lagergren R, Stenson J.** (1999): Can extreme morphology in *Bosmina* reduce predation risk from *Leptodora*? An experimental test. *OECOLOGIA* 118 (1): 23-28
- Hewitt G.M.** (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112
- Hewitt G.M.** (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276
- Hezina T.** (2000): Porovnání koncentrací rozpuštěných látek ve výsypkových vodách a neutralizace kyselých vod jílovými materiály. (<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/lae/text/2000/6vodySU.pdf>)
- Hillis D.M. a Dixon M.T.** (1991): Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The quarterly review of biology* 66 (4): 411-452
- Hlaváč V. a Jermlová B.** (2005): Tůně a umělé drobné vodní plochy v regionu Vysočina. *Ochrana přírody* 60 (9): 276-279
- Hořícká Z., Stuchlík E., Hudec I., Černý M., Fott J. a Kopáček J.** (2006): Acidification and the structure of crustacean zooplankton in mountain lakes: the Tatra Mountains (Slovakia and Poland). *Biologia* 61 (18): 121-134
- Hrbáček J., Brtek J., Vranovský M. a Štěrbá O.** (1974): Zooplanktón a význační zástupcovia niektorých skupin drobného vodného živočíšstva tatranských plies. *Sborník TANAP* 16: 105-109
- Hye-Suck A., Young-Ju J., Kwang-Sik M., Bong-Lae K. a Seok-jung H.** (2005): Phylogenetic Analysis of Six Species of Pacific Abalone (Haliotidae) Based on DNA Sequences of 16s rRNA and Cytochrome c Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *Marine Biotechnology* 7(4): 373-80
- Iwata H., Niikura S., Matsuura S., Takano Y. a Ukai Y.** (1998): Evaluation of variation of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on image analysis using elliptic Fourier descriptors. *Euphytica* 102: 143-149



- Jacobs H.T., Elliot D.J., Veerabhadracharya M. a Farquharson A.** (1988): Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 202: 185-217
- Ji-Eun L. a Yeongkyoo K.** (2008): A quantitative estimation of the factors affecting pH changes using simple geochemical data from acid mine drainage. *Environmental Geology* 55: 65-75
- Just T., Matoušek V., Dušek M., Fischer D. a Karlík P.** (2005): Vodohospodářské revitalizace a jejich uplatnění v ochraně před povodněmi. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha
- Kappes H., Sinsch U.** (2002): Temperature- and predator- induced phenotypic plasticity in *Bosmina cornuta* and *B. pellucida* (Crustacea: Cladocera). *Freshwater biology* 47 (10):1944-1955
- Kerr A.M., Janies D.A., Ronald M., Clouse R.M., Samyn Y., Kuszak J. a Kim J.** (2005): Molecular Phylogeny of Coral-Reef Sea Cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirotida) Based on 16S Mitochondrial Ribosomal DNA Sequence. *Marine Biotechnology* 7 (1): 53-60
- Kopp R.L., Guttman S.I. a Wissing T.E.** (1992): Genetic indicators of environmental stress in central mudminnow (*Umbra limi*) populations exposed to acid deposition in the Adirondack Mountains. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11 (5): 665-676
- Kopáček J., Stuchlík E. a Hardekopf D.** (2006): Chemical composition of the Tatra Mountain lakes: II. Recovery from acidification. 61/Biologia Supplement 18., in press.
- Kořínek V., Petrusek A.:** Textový dichotomický klíč (Cladocera)
- Kořínek V., Fott J., Fuksa J, Lellák J. a Pražáková M.** (1987): Chapter 3. Carp ponds of central Europe. In: R.G. Michael (editor), *Managed Aquatic Ecosystems*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands. 29-62.
- Kuhl F. a Giardina C.R.** (1982): Elliptic Fourier features of a closed contour. *Comput Graph Image Process* 18: 236-258
- Laforsch C. a Tollrian R.** (2004): Inducible defense in multipredator environments: Cyclomorphosis in *Daphnia cucullata*. *Ekology* 85(8):2302-2311
- Laforsch C, Ngwa W., Grill W a Tollrian R.** (2004): An acoustic microscopy technique reveals hidden morfological defenses in *Daphnia*. *PNAS (Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America)* 101 (45):15911-15914, November
- Lass S. a Spaak P.** (2003): Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491 (1-3):221-239

- Le Minor J.M. a Schmittbuhl M.** (1999): Importance of elliptic Fourier methods for morphometry of complex outlines: application to the distal human femur. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 21 (6): 387-391
- Lim J.T. a Hwang U.W.** (2006): The complete mitochondrial genome of *Pollicipes mitella* (Crustacea, Maxillopoda, Cirripedia): non-monophyly of maxillopoda and crustacea. *Mol Cells* 22 (3): 314-22
- Ložek V.** (2007): Zrcadlo minulosti. Česká a slovenská krajina v kvartéru. Dokořán. Praha. 198s.
- Ložek V.** (1999): Vývoj současných ekosystémů. *Ochrana přírody* 54, 2: 35-40
- Lynch M. a Jarrell P.E.** (1993): A Method for Calibrating Molecular Clocks and Its Application to Animal Mitochondrial DNA. *Genetics* 135: 1197-1208
- Machida R.J., Myia M.U., Nishida M. a Nishida S.** (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda). *Marine Biotechnology* 4: 406-417
- Martinez E.A., Moore B.C., Schaumlöffel J. a Dasgupta N.** (2004): Teratogenic Versus Mutagenic Abnormalities in Chironomid Larvae Exposed to Zinc and Lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 193-198
- Monty L., Baylac M. a Lalanne-Cassou B.** (2001): Elliptic Fourier analysis of the form of genitalia in two *Spodoptera* species and their hybrids (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 391-400
- Myšiak J., Schwerdtner K. a Ring I.** (2004): Comparative analysis of the conflicts between carp pond farming and the protection of otters (*Lutra lutra*) in upper Lusatia and South Bohemia. Sixth Annual BIOECON Conference "Economics and the Analysis of Biology and Biodiversity" Kings College Cambridge, 2-3 September
- Neto J.C., Meyer G.E. a Jones D.D.** (2006): Plant species identification using Elliptic Fourier leaf shape analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* 50 (2): 121-134
- Nixdorf B., Lessmann D. a Deneke R.** (2005): Mining lakes in a disturbed landscape: Application of the EC Water Framework Directive and future management strategies. *Ecological Engineering* 24: 67-73
- Park S.J., Lee Y.S. a Hwang U.W.** (2007): The complete mitochondrial genome of the sea spider *Achelia bituberculata* (Pycnogonida, Ammotheidae): arthropod ground pattern of gene arrangement. *BMC Genomics* 8: 343.
- Pawlowski J., Bolivar I., Fahrni J.F., de Vargas C., Gouy M. a Zaninetti L.** (1997): Extreme differences in rates of molecular evolution of Foraminifera revealed by comparison of ribosomal DNA sequences and the fossil record. *Mol. Biol. Evol.* 14: 498-505

- Pichrtová M.** (2007): Vliv faktorů prostředí na morfologickou variabilitu křemičitých struktur chrysomonád (Synurophyceae). Bakalářská práce. PřF UK
- Pokorný J. a Hauser V.** (2002): The restoration of fish ponds in agricultural landscapes. *Ecological Engineering* 18, 555-574
- Prach K.** (2003): Ekologické funkce a hospodaření v říčních nivách. Botanický ústav AV ČR, Třeboň, str. 37-60
- Příkryl I.** (2000): Klíče středoevropských Cyclopidae (bez druhů podzemních vod).
- Rautio M. a Korhola A.** (2002a): Effect of ultraviolet radiation and dissolved organic carbon on the survival of subarctic zooplankton. *Polar Biology*
- Rautio M. a Korhola A.** (2002b): UV- induced pigmentation in subarctic Daphnia. *Limnology and Oceanography* 47 (1): 295-299
- Riessen H.P., Sommerville J.W., Chiappari C. a Gustafson D.** (1988): Chaoborus predation, prey vulnerability, and their effect in zooplankton communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45 (11): 1912-1920
- Røen U.** (1987): *Chydorus arcticus* n.sp., a new cladoceran crustacean (Chydoridae: Chydorinae) from the North Atlantic and Subarctic areas. *Hydrobiologia* 145: 125-130.
- Rohlf, F.J.** (2006): tpsDig, Version 2.10. – Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook, New York. (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- Rulík M. a Měkotová J.** (1995): Program sledování jarních periodických tůní v CHKO Litovelské Pomoraví. *Ochrana přírody* 50: 67-70
- Russo T., Costa C. a Cataudella S.** (2007): Correspondence between shape and feeding habit changes throughout ontogeny of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. *Journal of Fish Biology* 71 (3): 629-656
- Sacherová V. a Hebert P.D.N.** (2003): The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 629-643
- Sacherová V., Kršková R., Stuchlík E., Hořická Z., Hudec I. a Fott J.** (2006): Long-term change of the littoral Cladocera in the Tatra Mountain lakes through a major acidification event. 61/*Biologia Supplement* 18., in press.
- Shen X., Ren J., Cui Z., Sha Z., Wang B., Xiang J. a Liu B.** (2007): The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. *Gene* 403 (1-2): 98-109
- Schwenk K., Sand A., Boersma M., Brehm M., Mader E., Offerhaus D. a Spaak P.** (1998): Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera. *Aquatic Ecology* 32: 37-51

- Schwenk K., Bijl M. a Menken S.B.J.** (2001): Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia* 442: 67-73
- Schwenk K., Junttila P., Rautio M., Bastiansen F., Knapp J., Dove O., Billiones R. a Streit B.** (2004): Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (*Hyalodaphnia*) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnol. Oceanogr.* 49 (2): 532-539
- Smirnov N.N.** (1996): Cladocera: the Chydorinae and Syciinae (Chydoridae) of the World. SPB Academic Publishing, Amsterdam (publikace ze série určovacích klíčů: Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World; No. 5)
- Smith A.B., Lafay B. a Christen R.** (1992): Comparative variation of morphological and molecular evolution through geologic time: 28S ribosomal RNA versus morphology in echinoids. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* 338: 365-382
- Soucek D.J., Cherry D.S. a Trent G.C.** (2000): Relative acute toxicity of acid mine drainage water column and sediments to *Daphnia magna* in the Puckett's Creek Watershed, Virginia, USA
- Sovíková L.** (1996): Periodické tůně v CHKO Poodří. Sborník ze semináře „Ochrana biodiverzity drobných stojatých vod“ ZO ČSOP Vlašim
- Stuchlík E., Appleby P., Bitušík P., Curtis C., Fott J., Kopáček J., Pražáková M., Rose N., Strunecký O. a Wright R.F.** (2002): Reconstruction of long-term changes in lake water chemistry, zooplankton and benthos of a small, acidified high-mountain lake: magic modelling and paleolimnological analysis. *Water, Air, and Soil Pollution* (2): 127-138
- Šrámek-Hušek R.** (1953): Naši klanonožci. Nakladatelství Československé akademie věd. Praha
- Šrámek-Hušek R., Straškraba M., Brtek J.** (1962): Fauna ČSSR. Lupenonožci – Branchiopoda. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 385-399 s
- Tamura K., Dudley J., Nei M. a Kumar S.** (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
- Tollrian R. a Heibl C.** (2004): Phenotypic plasticity in pigmentation in *Daphnia* induced by UV radiation and fish kairomones. *Functional Ecology* 18 (4): 497-502
- Torres M.A.J., Demayo C.G. a Siar S.V.** (2008): Elliptic Fourier analysis of leaf outline differences between and among sixteen species of *Hoya*. *Philippine Agricultural Scientist* 91 (1): 18-28
- Umetsu K., Iwabuchi N., Yuasa I., Saitou N., Clark P.F., Boxshall G., Osawa M. a Igarashi K.** (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of a tadpole shrimp

- (*Triops cancriformis*) and analysis of museum samples. *Electrophoresis* 23 (24): 4080-4084.
- Valoušek, B.** (1951): Periodická sněžní tůň jako biotop. *Studie Moravskoslezské Akademie věd přírodních.* 23 (20): 411-436.
- Velemínská J., Katina S. a Šmahel Z. (2006):** Analýza tvaru obličejového skeletu u pacientů s celkovým jednostranným rozštěpem rtu a patra: metoda geometrické morfometrie. *Sborník HMC UK č. 5:* 59-65
- Vinebrooke R.D. a Leavitt P.R.** (1999): Differential responses of littoral communities to ultraviolet radiation in alpine lake. *Ecology* 80 (1): 223-237
- Vranovský M.** (1992): Zooplanktén jazier v Západných Tatrách a antropogénne vplyvy. *Zborník prác o Tatranskom národnom parku* 32: 105-128
- Wetzera R.** (2002): Mitochondrial Genes and Isopod Phylogeny (Peracarida: Isopoda). *Journal of Crustacean Biology* 22 (1): 1-14
- Wissel B. a Benndorf J.** (1998): Contrasting effects of the invertebrate predator *Chaoborus obscuripes* and planktivorous fish on plankton communities of a long term biomanipulation experiment. *Archiv für Hydrobiologie* 143 (ě): 129-146
- Wollman K., Deneke R., Nixdorf B. a Packroff G.** (2000): Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (2-4). *Hydrobiologia* 433: 3-14
- Zima J., Macholán M., Munclinger P. a Piálek P.** (2004): *Genetické metody v zoologii.* Nakladatelství Karolinum, Praha

**Citované internetové zdroje:**

- [1] Severočeské doly, a.s. [citováno 07/2008]; dostupné na adrese: [www.sdas.cz](http://www.sdas.cz)
- [2] Sokolovská uhelná [citováno 07/2008]; dostupné na adrese: [www.suas.cz](http://www.suas.cz)
- [3] Wetland Connections. [citováno 07/2008]; dostupné na adrese: <http://www.umaine.edu/wetlands/vernal.htm>
- [4] Biological Indicators of Watershed Health: Vernal Pools and other Seasonal Pools. [citováno 07/2008]; dostupné na adrese: [http://www.epa.gov/bioindicators/html/vernal\\_pools.html](http://www.epa.gov/bioindicators/html/vernal_pools.html)
- [5] Budování nádrží pro obojživelníky. [citováno 07/2008]; dostupné na adrese: <http://amphibia.webzdarma.cz/Budovani%20nadrzi.htm>
- [6] Mitochondrial DNA. [citováno 07/2008]; dostupné na adrese: [http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrial\\_dna](http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrial_dna)

## **PŘÍLOHY**

### **Seznam příloh:**

#### **Příloha 1:**

Seznam všech 62 odebíraných modelových lokalit s jejich identifikačními kódy a hodnoty měřených parametrů prostředí.

(zeleně – rybníky, červeně – vody na výsypkách, žlutě – tůně, modře – tatranská plesa)

#### **Příloha 2:**

Seznam všech 62 odebíraných modelových lokalit s jejich identifikačními kódy a druhovým složením organismů.

(zeleně – rybníky, červeně – vody na výsypkách, žlutě – tůně, modře – tatranská plesa)

#### **Příloha 3:**

Tabulka populací druhu *Chydorus sphaericus* použitých pro genetické a morfologické testování včetně uvedené četnosti jedinců;

(zeleně – rybníky, červeně – vody na výsypkách, žlutě – tůně, modře – tatranská plesa)

#### **Příloha 4:**

Analýza variance a post-hoc Fisher LSD test

**Příloha 1:** Seznam všech 62 odebíraných modelových lokalit s jejich identifikačními kódy a hodnoty měřených parametrů prostředí. (zeleně – rybníky, červeně – vody na výsypkách, žlutě – tůň, modře – tatranská plesa)

Č.VZ.	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU	TEPLOTA (°C)	pH	VODIVOST (μS/ccm)	VODIVOST (μS/cm)	DO (%)	DO (mg/l)	chl a (mg/l)
1	Žabinec	ŽA	13.9.2006							
2	Velký Pálenec	VP	8.9.2006							
3	Starý Pálenec	SP	6.9.2006							
4	Žoldánka	ŽO	11.9.2006							
5	Hadí rybník	HR	8.9.2006							
6	Vitanovy	VT	8.9.2006							
7	Smyslov-velký	SV	8.9.2006							
8	Smyslov-malý	SM	8.9.2006							
9	Rybník u Čertovky	CE	14.7.2007	19,20	8,48		588	85,0	7,92	132,32
10	Rybník Petrovičky	PE	14.7.2007	23,37	8,26		291	72,0	6,15	231,64
11	Němčický rybník	NR	14.7.2007	21,30	9,29		278	96,0	8,50	139,96
12	Letiny I	LT1	14.7.2007	15,47	7,89		277	84,7	8,38	10,75
13	Letiny II	LT2	14.7.2007	20,32	7,53		274	56,7	5,08	6,06
14	Letiny III	LT3	14.7.2007	20,49	7,82		321	52,0	4,73	6,58
15	Nový rybník-Točnick	TO	14.7.2007	19,23	8,17		418	45,8	4,22	83,29
16	Vitanovy	VT	15.7.2007	23,98	8,06		339	62,5	5,26	124,97
17	Hadí rybník	HR	15.7.2007	22,06	8,53		279	50,8	4,44	29,32
18	Malá Kuš	MK	15.7.2007	24,20	8,32		334	78,7	6,55	54,43
19	Paseka I	PS1	15.7.2007	24,50	9,38		288	104,8	8,98	122,11
20	Paseka II	PS2	15.7.2007	23,52	11,30		384	87,0	7,50	136,22
21	Velká Kuš	VK	15.7.2007	23,70	12,19		393	71,5	6,10	73,10
22	Velká Lípa	VL	15.7.2007	23,94	11,95		362	73,5	6,19	123,98
23	Popílkoviště Vřesová	PV	11.10.2006	10,45	5,37	1555	1123	67,3	7,45	
24	Boží Požehnaní	BP	11.10.2006	12,74	6,44	1552	1189	58,5	6,15	
25	Žluté jezírko	ZJ	11.10.2006	11,31	7,45	615	455	96,3	10,51	
26	Přikrylovo červené	PC	11.10.2006	12,32	8,05	7770	5889	113,7	11,80	
27	Milena	ML	11.10.2006	12,60	8,79	5381	4102	110,5	11,42	

Č.VZ.	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU	TEPLOTA (°C)	pH	VODIVOST (μS/ccm)	VODIVOST (μS/cm)	DO (%)	DO (mg/l)	chl a (mg/l)
28	Jaroslav	JR	11.10.2006	13,72	8,04	6710	5255	121,8	12,30	
29	Karasí	KR	11.10.2006	11,92	6,90	162	121	76,5	8,25	
30	Tůň u Rudy I	TR1	23.8.2007	14,36	8,16		180	37,2	3,75	56,68
31	Tůň u Rudy II	TR2	23.8.2007	17,55	7,84		243	30,9	2,93	29,31
32	Kokořínsko 07	07 KOK	8.11.2006	4,97	6,85	157	97		6,31	
33	Kokořínsko 23	23 KOK	9.11.2006	6,25	7,19	516	331		7,20	
34	Kokořínsko 25	25 KOK	9.11.2006	5,96	7,11	444	283		5,08	
35	Kokořínsko 31	31 KOK	10.11.2006	5,70	7,72	484	305		15,60	
36	Kokořínsko 32	32 KOK	10.11.2006	6,01	7,34	916	584		5,60	
37	Kokořínsko 39	39 KOK	9.11.2006	7,89	6,90	1589	1070		11,20	
38	Czarny Staw Gasienicowy	GA-2	09/2007	8,8	6,78	15,0				2,53
39	Nižné Wahlenbergovo pl.	FU-4	09/2007	4,8	6,38	14,2				1,78
40	Vyšné Terianské pl.	NE-1	09/2007	4,5	5,43	10,4				5,26
41	Zelené javorové pl.	JA-5	09/2007	7,5	6,51	12,9				
42	Vyšné Jamnické pl.	JM-5	09/2007	5,4	5,89	12,7				0,62
43	Litvorové pl.	BV-3	09/2007	5,4	7,01	23,0				0,89
44	Slavkovské pleso	SL-2	25.9.2004	6,00	5,08	9,4				7,10
45	Starolesnianské pleso	VS-15	23.9.2004	4,30	5,04	8,3				4,83
46	Długi Staw Gasienicowy	GA-4	28.9.2004	6,20	6,10	14,2				1,13
47	Vyšné Furkotské pleso	FU-7	26.9.2004	4,10	6,37	17,7				1,01
48	Batizovské pleso	BA-1	25.9.2004	3,00	6,33	16,3				0,61
49	Zelené krivánské pleso	VA-1	26.9.2004	5,30	6,60	21,8				1,15
50	Capie	MY-2	26.9.2004	5,00	6,36	15,0				2,97
51	Czarny Staw pod Rysami	MO-1	09/2007	6,5	7,15	27,3				0,70
52	Vyšné sesterské pl.	MY-1	09/2007	8,0	5,35	8,3				0,41
53	Vyšné Satanie pliesko	ME-4	09/2007	8,7	5,09	7,4				1,73
54	Dolné Roháčské pl.	RO-4	09/2007	9,0	6,74	20,2				0,68
55	Horné Roháčské pl.	RO-1	09/2007	6,5	6,40	13,4				1,43
56	Velké Hincovo pl.	ME-1	09/2007	6,5	6,89	22,2				1,08
57	Nižné Kozie pl.	MY-5	09/2007	4,0	6,83	17,9				0,09



Č.VZ.	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU	TEPLOTA (°C)	pH	VODIVOST (μS/ccm)	VODIVOST (μS/cm)	DO (%)	DO (mg/l)	chl a (mg/l)
58	Morskie Oko	MO-2	09/2007	10,2	7,13	23,8				1,20
59	Vyšné Wahlenbergovo pl.	FU-1	09/2007	4,4	6,54	12,7				0,32
60	Vyšné Račkové pl.	RA-1	09/2007	4,0	7,09	31,5				0,80
61	Nižné Žabie Bielovodské	BV-23	09/2007							1,01
62	Okrúhlé pl.	MY-1	09/2007	2,0	6,42	12,3				0,50









**Příloha 3:**

Tabulka populací druhu *Chydorus sphaericus* použitých pro genetické a morfologické testování včetně uvedené četnosti jedinců;

zeleně – rybníky,

červeně – vody na výsypkách,

žlutě – tůně,

modře – tatranská plesa

(četnost jedinců: 1 = malé množství, 2 = střední množství, 3 = velké množství)

ČÍSLO	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU	ČETNOST	GENETIKA	MORFOMETRIE
1	Žabinec	ŽA	13.9.2006	1	✓	
2	Velký Pálenec	VP	8.9.2006	3	✓	
3	Starý Pálenec	SP	6.9.2006	3	✓	
4	Hadí rybník	HR	8.9.2006	3	✓	
5	Vitanovy	VT	8.9.2006	3	✓	
6	Smyslov-velký	SV	8.9.2006	3	✓	
7	Smyslov-malý	SM	8.9.2006	3	✓	
8	Rybník u Čertovky	CE	14.7.2007	2	✓	✓
9	Rybník Petrovičky	PE	14.7.2007	3	✓	✓
10	Němčický rybník	NR	14.7.2007	3	✓	✓
11	Nový rybník - Točník	TO	14.7.2007	3	✓	✓
12	Vitanovy	VT	15.7.2007	1	✓	
13	Malá Kuš	MK	15.7.2007	1	✓	
14	Paseka I	PS1	15.7.2007	1	✓	
15	Paseka II	PS2	15.7.2007	2	✓	✓
16	Velká Kuš	VK	15.7.2007	3	✓	✓
17	Velká Lípa	VL	15.7.2007	3	✓	✓
18	Popálkoviště Vřesová	PV	11.10.2006	1	✓	✓
19	Boží Požehnaní	BP	11.10.2006	1	✓	✓
20	Žluté jezírko	ZJ	11.10.2006	3	✓	✓
21	Karasí	KR	11.10.2006	1	✓	✓
22	Tůň u Rudy I	TR1	23.8.2007	2	✓	
23	Tůň u Rudy II	TR2	23.8.2007	3	✓	✓
24	Kokořínsko 07	07 KOK	8.11.2006	2	✓	✓
25	Kokořínsko 23	23 KOK	9.11.2006	2	✓	✓
26	Kokořínsko 25	25 KOK	9.11.2006	2	✓	✓
27	Kokořínsko 31	31 KOK	10.11.2006	3	✓	✓
28	Kokořínsko 32	32 KOK	10.11.2006	3	✓	✓
29	Kokořínsko 39	39 KOK	9.11.2006	3	✓	✓
30	Slavkovské pleso	SL-2	25.9.2004	2	✓	✓
31	Starolesnianské pleso	VS-15	23.9.2004	3	✓	✓
32	Długi Staw Gasienicowy	GA-4	28.9.2004	1	✓	
33	Vyšné Furkotské pleso	FU-7	26.9.2004	3	✓	✓
34	Batizovské pleso	BA-1	25.9.2004	1	✓	
35	Zelené krivánské pleso	VA-1	26.9.2004	3	✓	
36	Capie	MY-2	26.9.2004	1	✓	
37	Czarny Staw Gasienicowy	GA-2	09/2007	2	✓	✓
38	Nižné Wahlenbergovo pl.	FU-4	09/2007	3	✓	✓
39	Vyšné Terianské pl.	NE-1	09/2007	3	✓	✓
40	Zelené javorové pl.	JA-5	09/2007	3	✓	✓

ČÍSLO	LOKALITA	KÓD	DATUM ODBĚRU	ČETNOST	GENETIKA	MORFOMETRIE
41	Vyšné Jamnické pl.	JM-5	09/2007	2	✓	
42	Litvorové pl.	BV-3	09/2007	1	✓	
43	Czarny Staw pod Rysami	MO-1	09/2007	1	✓	
44	Vyšné sesterské pl.	MY-1	09/2007	1	✓	
45	Vyšné Satanie pliesko	ME-4	09/2007	1	✓	
46	Dolné Roháčské pl.	RO-4	09/2007	1	✓	
47	Horné Roháčské pl.	RO-1	09/2007	1	✓	
48	Vyšné Račkové pl.	RA-1	09/2007	1	✓	

**Příloha 4:**

Analýza variance a post-hoc Fisher LSD test

ANOVA: F(3, 353)=124,00, p=0,0000						
	typ lokality	delka prumer	delka std. error	delka -95%	delka +95%	N
1	TUN	419,7267	3,855371	412,1443	427,3091	96
2	DOLY	399,0109	4,960070	389,2559	408,7659	58
3	RYB	350,6780	4,073358	342,6669	358,6891	86
4	TATRY	452,5846	3,492278	445,7163	459,4529	117

ANOVA: F(3, 353)=114,52, p=0,0000						
	typ lokality	vyska průměr	vyska std. error	vyska -95%	vyska +95%	N
1	TUN	357,3637	3,295460	350,8825	363,8450	96
2	DOLY	340,7757	4,239724	332,4374	349,1140	58
3	RYB	295,2320	3,481789	288,3843	302,0796	86
4	TATRY	378,3794	2,985099	372,5086	384,2502	117

ANOVA: F(3, 353)=136,35, p=0,0000						
	typ lokality	plocha průměr	plocha std. error	plocha -95%	plocha +95%	N
1	TUN	205,7762	1,785976	202,2637	209,2887	96
2	DOLY	196,2582	2,297721	191,7392	200,7771	58
3	RYB	171,8308	1,886957	168,1197	175,5419	86
4	TATRY	221,3810	1,617776	218,1993	224,5627	117



LSD test  
 variable: délka  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 1426,9, df = 353,00

	{1}	{2}	{3}	{4}
1 TUN		0,001075	0,000000	0,000000
2 DOLY	0,001075		0,000000	0,000000
3 RYB	0,000000	0,000000		0,000000
4 TATRY	0,000000	0,000000	0,000000	

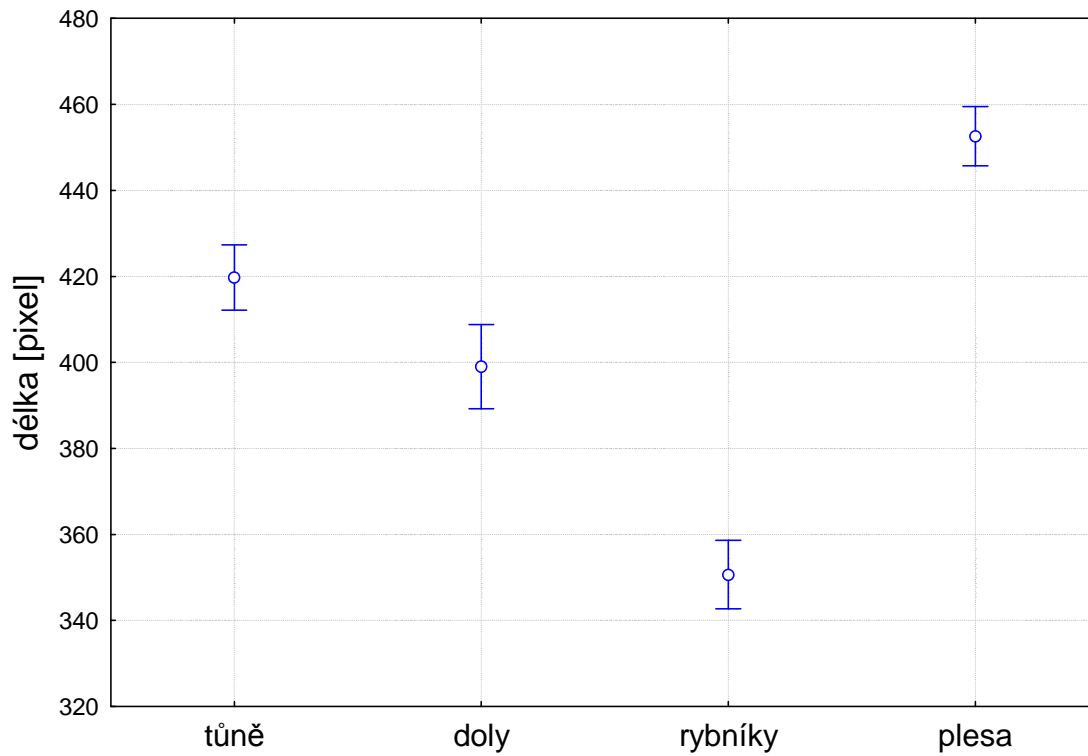
LSD test  
 variable: výška  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 1042,6, df = 353,00

	{1}	{2}	{3}	{4}
1 TUN		0,002167	0,000000	0,000003
2 DOLY	0,002167		0,000000	0,000000
3 RYB	0,000000	0,000000		0,000000
4 TATRY	0,000003	0,000000	0,000000	

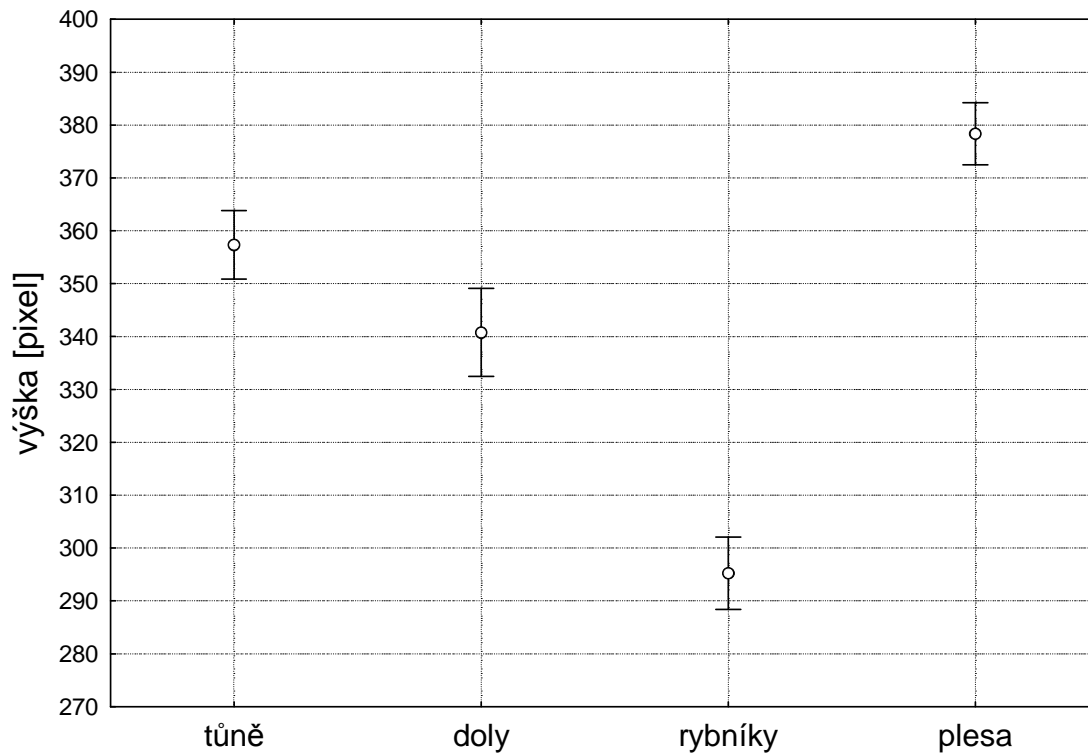
LSD test  
 variable: plocha  
 Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 306,21, df = 353,00

	{1}	{2}	{3}	{4}
1 TUN		0,001179	0,000000	0,000000
2 DOLY	0,001179		0,000000	0,000000
3 RYB	0,000000	0,000000		0,000000
4 TATRY	0,000000	0,000000	0,000000	

ANOVA:  $F(3, 353)=124,00$ ,  $p=0,0000$   
vertikální ohraničení: 0,95 konfidenční interval



ANOVA:  $F(3, 353)=114,52$ ,  $p=0,0000$   
vertikální ohraničení: 0,95 konfidenční interval



ANOVA:  $F(3, 353)=136,35$ ,  $p=0,0000$   
vertikální ohraničení: 0,95 konfidenční interval

