

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie



Diplomová práce

**Detailní taxonomická a klonální struktura druhového komplexu
Daphnia longispina na podélném gradientu přehradní nádrže Želivka**

Detailed taxonomic and clonal structure of the *Daphnia*
longispina species complex on the longitudinal gradient of the Želivka reservoir

Bc. Jakub Stodola

Vedoucí práce: doc. RNDr. Adam Petrusek, Ph.D.

Praha, 2013

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Adamu Petruskovi, Ph.D. za cenné rady, pomoc a především trpělivost při zpracování této práce.

Prohlášení:

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

V Praze,

Podpis

Abstrakt

Korytovité přehradní nádrže jsou charakteristické výskytem specifických horizontálních environmentálních gradientů a umožňují tím výskyt několika druhů perlooček komplexu *Daphnia longispina* v jedné nádrži. V důsledku preference rozdílných podmínek se vyskytují jednotlivé druhy na rozdílných lokalitách. Mým cílem bylo zanalyzovat pomocí deseti mikrosatelitových markerů detailní taxonomickou a klonální strukturu těchto perlooček na podélném gradientu přehradní nádrže Želivka a porovnat ji mezi dvěma sezónami. Zároveň mi byly poskytnuty vzorky nově objevené kryptické mitochondriální linie právě ze Želivky. Byla potvrzena nenáhodnost výskytu jednotlivých druhů i jejich hybridů v přehradní nádrži. Zároveň se potvrdilo, že taxonomické složení nádrže je ve dvou po sobě následujících sezónách v prostoru relativně stálé. Distribuce jednotlivých klonů se naopak ukázala jako značně heterogenní, a to jak v čase, tak v prostoru. Klonální diverzita rodičovských druhů byla prokazatelně vyšší než u jejich hybridů. To by mohlo znamenat, že mezi rodičovskými genomy existují reprodukční bariéry. Bylo nalezeno i několik klonů, které se vyskytovaly opakovaně na podobných lokalitách, což naznačuje, že jsou některé klony schopné přezimovat u dna nádrží a další sezónu se znovu vyskytují na podobné lokalitě.

Abstract

Canyon shaped reservoirs are characteristic by specific environmental horizontal gradients, so they enable existence of several species of the *Daphnia longispina* complex in one water body. Due to preference of distinct environmental conditions *Daphnia* species occur in the different localities. The aim of my thesis was to analyze detail taxonomical and clonal structure of *Daphnia longispina* group by ten microsatellite markers on longitudinal gradient and compare it between two consecutive seasons. Simultaneously I received newly discovered divergent mitochondrial lineage from Želivka reservoir. It was confirmed, that the distribution of species and their hybrids in water reservoir was non-accidental and the taxonomic spatial distribution is in two consecutive seasons relatively constant. On the contrary the spatial and temporal distribution of clones was very heterogeneous. Clonal diversity in the interspecific

hybrids was lower than in the coexisting parental species. This finding supports the hypothesis, that there exist reproductive barriers between parental genomes. Most of the clones were substantively variable, but several clones that occurred in both seasons in similar localities were found. It is possible that some clones are able of overwintering in hypolimnion and in the spring recolonized similar localities.

Klíčová slova: mezidruhová hybridizace, perloočky, environmentální gradienty, mikrosatelity, klonální diverzita

Key words: interspecific hybridization, cladocerans, environmental gradients, microsatellites, clonal diversity

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Přehradní nádrže	6
1.2 Gradienty v korytovitých přehradních nádržích	8
1.3 Perloočky rodu Daphnia	11
1.4 Mezdruhová hybridizace	15
1.5 Cíle práce	19
2. Materiál a metodika	21
2.1 Lokalita	21
2.2 Odběr vzorků	22
2.3 Příprava DNA	24
2.4 Mikrosatelitová analýza	25
2.5 Vyhodnocení dat	27
3. Výsledky	29
3.1 Taxonomické složení	29
3.2 Klonální struktura	32
4. Diskuse	35
Závěr	43
Seznam citované literatury	44
Přílohy	50

1 Úvod

Environmentální gradienty v korytovitých přehradních nádržích mohou vytvářet pro planktonní živočichy značně rozdílné podmínky uvnitř nádrže. Jedná se o specifické prostředí, kdy v jedné nádrži můžeme nalézt oblasti s velkým množstvím potravy a s velkým predančním tlakem, a zároveň nacházíme oblasti, kde je potravy velmi málo a je velmi malý predanční tlak. Distribuce perlooček rodu *Daphnia* je v těchto podmínkách obvykle heterogenní, jednotlivé druhy preferují různé oblasti. V nádržích tak můžeme nalézt druhy preferující jak oligotrofní vody, tak eutrofní vody. V důsledku gradientů a rozdílné preference prostředí jednotlivými druhy se zde mohou vytvářet charakteristické hybridní zóny.

1.1 Přehradní nádrže

Přehradní nádrže se na Zemi budují již značnou řadu let. Nádrže byly primárně budovány pro zadržení vody, a to jak pitné, tak pro zemědělské závlahy. Následně se začaly budovat pro chov ryb, jako zdroj energie a v neposlední řadě i kvůli rekreaci (Straškraba a Tundisi, 1999). Ve střední Evropě je nejstarší nádrž Jordán, který se nachází v Čechách ve městě Tábor. Historické literární prameny udávají jeho vznik do roku 1492 (Broža a kol., 2005).

Přehradní nádrže se na první pohled mohou jevit velmi podobné jezerům, mají mnoho společných, ale i řadu rozdílných rysů. Údolní korytovité nádrže vznikají přehrazením řeky. V nádrži tak můžeme najít charakteristický gradient hloubky, který sleduje původní sklon řeky (Straškraba, 1998). V přítoku je tedy hloubka nejmenší a směrem ke hrázi narůstá. U jezer bývá největší hloubka většinou v oblasti jeho středu. Odtok z nádrží bývá často ode dna nádrží, u jezer bývá naopak povrchový. U nádrží bývá odtok ještě mnohdy ovlivněn vodními elektrárnami, které jsou různě využívány v průběhu dne.

Další rozdílností je přítok. Přehrady mívají obvykle jeden hlavní přítok, který do nádrže přináší značné množství materiálu. Z biologického hlediska jsou významné živiny ovlivňující primární produkci (především sloučeniny dusíku a fosforu), dále bývá přítokem přinášeno množství nerozpuštěných částic a mnohé další. V přítoku do nádrže proto bývá velké množství živin, ale i částic způsobujících zákal (Straškraba, 1998). V přítoku dochází k výraznému zpomalení toku, což má za následek zvýšení sedimentace v horní části nádrže a směrem ke hrázi sedimentace ubývá. Voda při zpomalení totiž ztratí unášecí schopnost a velké částice klesají z vodního sloupce ke dnu (Sloff, 1997). V nádržích také nalézáme jeden převládající směr proudění vody, a to od přítoku ke hrázi. U většiny jezer bývá distribuce vody ovlivňována spíše větrem (Straškraba, 1998; Hejzlar a Vyhnálek, 1998).

S průtokem vody v nádrži a gradientem hloubky je spjat další faktor, a to doba zdržení. Doba zdržení závisí na množství přitékající vody a objemu nádrže. Čím je doba zdržení větší, tím spíše se bude moci vyvinout teplotní stratifikace nádrže. Jako minimální doba zdržení pro vytvoření teplotní stratifikace se považuje 10 dní (Straškraba, 1998). Představuje to dobu, která je potřebná pro uklidnění vodní masy. Doba zdržení je u nádrží mnohem kratší než u většiny jezer (Straškraba, 1998). Doba zdržení také podstatně ovlivňuje kvalitu vody v podélném profilu. Voda v přítoku obsahuje velké množství unášeného materiálu, který se zpomalením proudu začne klesat ke dnu. To, kolik se ho dostane z vodního sloupce do sedimentů, závisí na velikosti částic, míchání a na době zdržení. Doba zdržení ale také ovlivňuje to, kolik času mají primární producenti na zpracování živin. Čím delší bude doba zdržení, tím spíše bude docházet k jejich vyčerpání. Má-li tedy nádrž velkou dobu zdržení, bude se u hráze nacházet voda s podstatně méně živinami, menším zákalem, a tedy i větší průhledností než voda v přítoku (Thornton a kol., 1990, podle Straškraba, 1998). V neposlední řadě se nádrže od jezer liší i velikostí povodí. Velikost povodí u přehradních nádrží bývá až řádově větší než u jezer (Thornton a kol., 1990, podle Straškraba, 1998).

Jak je tedy vidět, přehradní nádrže vytvářejí poměrně nový typ prostředí, který se značně liší od jezer. Vyskytují se v nich jedinečné environmentální gradienty, které se jinak buď vůbec neobjevovaly, nebo byly velmi vzácné. V důsledku toho můžeme nacházet nové typy prostředí a nové gradienty.

1.2 Gradienty v korytovitých přehradních nádržích

V přehradních nádržích se vyskytuje mnoho environmentálních gradientů, některé se vyskytují i v jezerech, jiné jsou unikátní pro přehrady. Takový unikátní gradient nádrží je například gradient živin a gradient zákalu, které jsou nejsilnější v přítocích a směrem ke hrázi slábnou. Některé gradienty dokážou vytvořit v jednotlivých částech nádrže značně rozdílné podmínky, a tak se v jedné nádrži může vyskytovat mnoho druhů, které by se jinak pospolu v jezeře vyskytly jen výjimečně. To je například již výše zmíněný gradient živin, kdy v přítoku může být velké množství potravy a u hráze již nikoliv. Můžeme tak nalézt v přítoku druhy preferující eutrofní vody a u hráze zase druhy preferující spíše oligotrofní prostředí (Sed'a a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a). Pro zpřehlednění rozdělím environmentální gradienty na vertikální a horizontální.

Vertikální gradienty se vyskytují mnohem častěji než horizontální gradienty a můžeme je nalézt i mimo přehradní nádrže. Mezi nejčastější vertikální gradienty patří gradient teploty, světla a kyslíku. Gradient teploty vzniká u nádrží, které jsou dostatečně hluboké a mají určitou dobu zdržení vody. Pokud by byly příliš mělké, mohlo by docházet k míchání vody v celém objemu a teplotní gradient by se nevytvořil (Straškraba a Tundisi, 1999). Při vytváření teplotního vertikálního gradientu záleží v našich podmínkách ještě na roční době (Straškraba, 1998).

Podobný průběh jako gradient teploty má v letním období v našich nádržích i gradient kyslíku. V Čechách se často vyskytují eutrofní nádrže, a tomu odpovídá i jejich charakteristická letní distribuce kyslíku. Ta se řídí podle klinográdní křivky, kdy se nejvíce kyslíku vyskytuje u hladiny a směrem ke dnu ho ubývá (Lampert a Sommer, 2007). Do vody se dostává výměnou s atmosférickým kyslíkem na hladině a díky autotrofům. Do hloubky se pak dostává pomocí jarního a podzimního míchání (Lampert a Sommer, 2007).

Poslední významný vertikální gradient představuje gradient světla. Nejvíce světla se v nádržích i jezerech vyskytuje u hladiny a směrem ke dnu ho ubývá. Záleží především na množství částic ve vodním sloupci. Vodní prostředí ovlivňují především dvě složky světla. Jednak je to viditelné spektrum světla, které ovlivňuje orientaci organismů a především

produkcí fytoplanktonu, a dále je to infračervená složka světla, která způsobuje ohřívání vody. Ve stojatých vodách tak rozlišujeme dvě zóny. V první z nich je dostatek světla a nazývá se eufotickou zónou. Druhá z nich, ve které je světla nedostatek a produkce je menší než respirace, se nazývá afotická zóna (Lampert a Sommer, 2007).

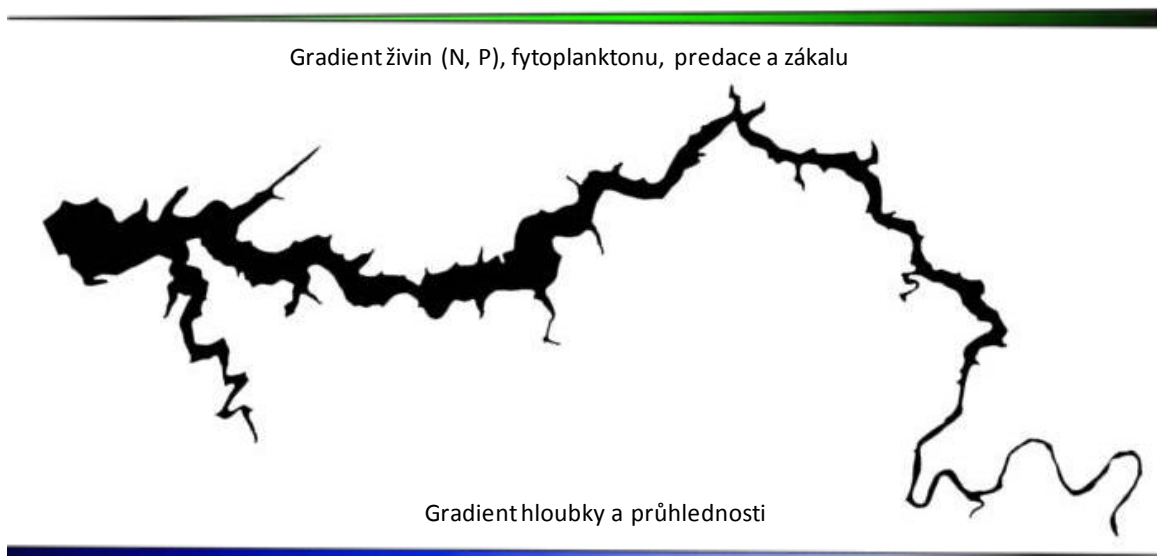
Tyto vertikální abiotické gradienty mohou značně ovlivňovat distribuci organismů. Teplejší vrstvu vody mohou například preferovat některé ryby, například kaprovité (Prchalová a kol., 2009). Gradient teploty nepřímo ovlivňuje viskozitu vody a ta vzplývání fytoplanktonu a dalších organismů. Gradient kyslíku rovněž ovlivňuje mnoho organismů, většina se bude vyhýbat oblastem s nízkou koncentrací kyslíku, případně až místům s anoxií. Na druhou stranu jsou i organismy, kterým dočasně anoxické prostředí nevadí. To je známé například pro některé ryby, jako je blatňák americký (Rahel a Nutzman, 1994) nebo pro larvy rodu *Chaoborus* (Diptera), které využívají hypoxických vrstev jako úkryt před predátory (Stratton a Kesler, 2007). Poslední ze jmenovaných gradientů, gradient světla, ovlivňuje nejen produkci fytoplanktonu, ale i orientaci organismů a výskyt predátorů a jejich kořisti. Některé jezerní perloočky jsou známé diurnální migrací sloužící k úniku před predátory (Longhi a Beisner, 2009; Lampert, 1989; Gido a kol., 2002).

Pro údolní přehradní nádrže jsou však specifické horizontální gradienty (obr. 1). Některé horizontální abiotické gradienty, především gradient mezi litorálem a pelagiálem, se v jezerech vyskytují také, ale nejsou zdaleka tak výrazné jako v nádržích. Jedním z nejtypičtějším horizontálních gradientů je gradient hloubky (Straškraba, 1998). Dalším charakteristickým znakem nádrží je přítok, který přináší velké množství materiálu, ať už živin, či jen nerozpuštěných anorganických částic, a podporuje tak vznik typických nádržových gradientů. Živiny i zákal jsou dalšími významnými gradienty charakteristickými právě pro přehrady.

Gradient hloubky je v údolních přehradních nádržích jasně patrný. V přítoku je hloubka nejmenší, u hráze naopak největší (Straškraba, 1998). Je to tím, že nádrže postavené přehrazením řeky kopírují její původní tok, který byl po gravitačním spádu. Gradient hloubky přímo ovlivňuje mnoho dalších gradientů a faktorů. S narůstající hloubkou ubývá světla v nádrži. Pokud se tedy v přítoku na dně vyskytují fototrofní organismy, brzy se může hloubka

zvětšit natolik, že světla bude na dně nedostatek (Caputo a kol., 2008). S narůstající hloubkou se zvětšuje i velikost vodního sloupce a s ním klesá teplota u dna, v eutrofních nádržích během letní stratifikace zpravidla i množství kyslíku. V neposlední řadě gradient hloubky sledují i ryby, jejichž největší množství nalézáme v horních částech nádrže, kde je malá hloubka (Prchalová a kol., 2008).

Většina přehradních nádrží má zpravidla jeden hlavní přítok. S ním se do nádrže dostávají i živiny včetně sloučenin fosforu a dusíku. Od přítoku směrem ke hrázi pak živin ubývá a jejich úbytek tak představuje gradient (Hejzlar a Vyhnálek, 1998; Caputo a kol., 2008). Tento gradient živin nejvíce ovlivňuje bakterioplankton a fytoplankton, který má své největší hustoty v horní části nádrže (Gasol a kol., 2002; Caputon a kol., 2008). Bakterioplankton a fytoplankton následně ovlivňuje výskyt jednotlivých druhů perlooček, pro které je potravou.



Obrázek 1: Schéma přehradní nádrže Želivka. Horní zelený klín představuje gradient živin, predace, zákalu a fytoplanktonu. V přítoku nacházíme nejvíce živin, včetně fosforu a dusíku, nejvíce fytoplanktonu a rovněž největší zákal a predaci. Od přítoku směrem ke hrázi tyto gradienty slábnou. Naopak spodní modrý klín představuje gradienty hloubky a průhlednosti. Hloubka i průhlednost od přítoku směrem ke hrázi vzrůstá. Graf byl inspirován podle článku (Petrušek a kol., 2008a).

S živinami se do nádrže dostávají ale i anorganické částice, které způsobují zákal a po zpomalení toku i sedimentaci. A právě sedimentace je dalším významným horizontálním gradientem. Největší je v přítocích a v horních oblastech nádrže, kde se bude hromadit největší množství sedimentujícího materiálu (Sloff, 1997). Množství sedimentů může rovněž významně ovlivňovat biotu v nádrži. Například se jedná o „banky“ dormantních stadií různých organismů, která se ukládají na dno. Pokud jsou tato dormantní stadia zanesena sedimenty, nebudou moci přirozeně pokračovat ve svém vývoji, pokud nedojde k narušení sedimentu. Toto může nastat například u dormantních stadií perlooček v efiipiích (Vaníčková a kol., 2010).

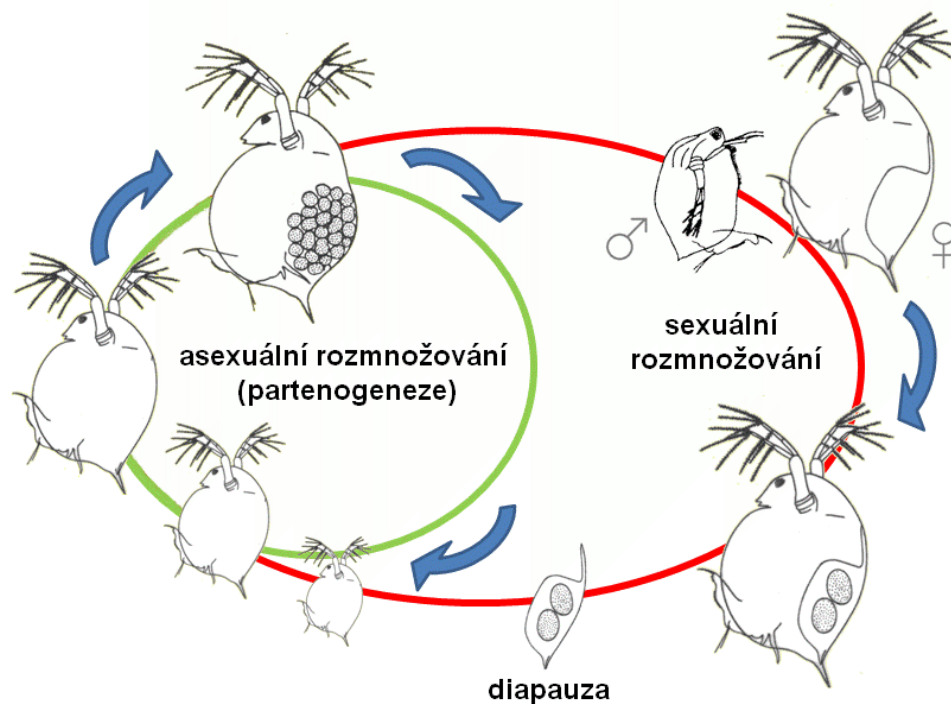
V přehradních nádržích existuje samozřejmě mnohem více horizontálních gradientů, například gradient zákalu, gradient pH, bakterioplanktonu, nicméně pro perloočky v našich podmínkách nejsou zřejmě tolik podstatné. Detailněji jsem se gradientům v korytovitých přehradních nádržích věnoval ve své bakalářské práci (Stodola, 2010).

1.3 Perloočky rodu *Daphnia*

Perloočky rodu *Daphnia* (Crustacea, Cladocera) jsou všudypřítomní obyvatelé pevninských vod na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy (Adamowicz a kol., 2009). Jsou objektem mnoha biologických disciplín, jako jsou limnologie, obecná ekologie, ekotoxikologie, populační a evoluční genetika atd. Perloočky mají mnoho předpokladů pro to, aby byly ideálním modelovým organismem pro ekologický výzkum (Sed'a a Petrusek, 2011; Colbourne a kol., 2005). Mezi nejvýznamnější jistě patří jejich reprodukce. Mají přímý vývoj, jejich generační doba je krátká, velké populace mohou vzniknout po krátkém čase a ty mohou i díky klonální reprodukci rychle reagovat na environmentální změny. Poměrně snadno se chovají. Jsou průhledné, takže funkce jejich orgánů jsou viditelné zvenčí. Snůška vajíček je v jejich vaječné komůrce, což umožňuje jednoduché počítání potomstva. Jsou poměrně malé (v řádech milimetrů), takže se dají pozorovat okem a přitom se stále dá s jednotlivci bez problémů manipulovat. Většinou se rozmnožují cyklickou partenogenezí (Hebert, 1987; Hobaek a Larsson, 1990; Sed'a a Petrusek, 2011). Partenogenetické množení jim umožňuje

v dobrých podmínkách rychlé rozmnožování. Pokud nastanou horší podmínky (způsobené například nedostatkem potravy), začnou se množit pohlavně a produkovat dormantní stadia (obr. 2). Perloočky jsou významným článkem potravního řetězce pevninských stojatých vod, konzumují zejména fytoplankton (tj. primární producenty) a samy jsou konzumovány planktonožravými predátory. V mnoha jezerech a nádržích jsou početně velmi významné a mohou představovat klíčový druh. Toto centrální postavení v potravní nabídce z nich dělá vhodný objekt pro studium adaptací a mnoha interakcí uvnitř potravního řetězce (Lampert, 2006).

Po většinu roku se perloočky rozmnožují nepohlavně. V určité fázi roku však mohou začít produkovat pohlavní jedince, a to samečky a pohlavní samice. K tomu dochází jen velmi



Obr. 2: Cyklická partenogeneze u perlooček rodu *Daphnia* (autorka schématu Katleen Van Der Gucht; schéma upraveno podle Petruseka a kol. (2008a) a Decaesteckera a kol. (2009). Cyklická partenogeneze se u perlooček skládá ze dvou cyklů, nepohlavního a pohlavního. Nepohlavní rozmnožování (zeleně) probíhá převážnou část roku, samice se množí partenogeneticky. K pohlavnímu rozmnožování (červeně) dochází v období zhoršených podmínek, kdy se rodí i samci a v populaci se vyskytnou efipialní samice. Jejich výsledkem jsou dvě dormantní vajíčka (embrya ve stadiu gastruly), uložená v chitinózní schránce zvané efipium. Z té se líhne nepohlavně se rozmnožující generace samiček.

krátce - v řádu týdnů (Macháček a kol., 2012). Nástup pohlavního rozmnožování je obvykle u perlooček vyvolán vnějšími faktory, jako jsou změna fotoperiody, dostupnost potravy, teplota či výskyt predátorů (Hobaek a Larsson, 1990; Sed'a a Petrusek, 2011; Lampert, 2006). Po spáření se samci efipialní samice vyprodukují oplodněná dormantní vajíčka (embrya ve stadiu gastruly), která jsou po dvou uložena v chitinózní schránce zvané efipium. V této schránce jsou schopny přežít období nepříznivých podmínek, a to po dobu i několika desítek, výjimečně až sto let (Cáceres, 1998; Brendonck a De Meester, 2003). Z těchto vajíček se za příznivých podmínek vylíhnou samice, které se množí asexuálně.

Pokud však ke zhoršení podmínek vůbec nedojde, nebo jsou podmínky dostatečné pro přežití jedinců, mohou asexuálně se množící jedinci přežít poměrně dlouhou dobu, aniž by museli tvořit efipia. Jsou známé i populace perlooček, které nevyužívají dormantních stadií a dlouhodobě přežívají i období nepříznivých podmínek jako dospělé pohlavní samice. Jedná se například o perloočky *D. galeata* a *D. pulicaria* v tatranských jezerech, které přezimují pod ledem (Hamrová a kol., 2011; Slusarczyk, 2009).

Pokud k pohlavní produkci samečků a pohlavních samic dojde u různých blízce příbuzných druhů ve stejný okamžik, je možné, že z důvodu nedostatečných izolačních bariér může dojít ke křížení. Jakmile nastanou příhodné podmínky, mohou se vylíhnout hybridy, kteří se dále množí nepohlavně, a mohou dosáhnout takového počtu, že se v dané oblasti stanou dominantními nad rodičovskými druhy (Schwenk a Spaak, 1995).

Jedny z nejčastěji se vyskytujících perlooček ve střední Evropě jsou perloočky komplexu *Daphnia longispina*. Rod *Daphnia* je navíc často nejhojnějším planktonním herbivorem ve sladkovodních nádržích (Macháček a Sed'a, 2006). Mezi ně patří *D. cucullata* Sars, *D. galeata* Sars a *D. longispina* (známá také jako *D. hyalina*, více v práci Petrusek a kol., 2008b). Jednotlivé druhy jsou si poměrně podobné, navíc mohou vlivem několika faktorů měnit tvar těla, což stěžuje jejich rychlé a snadné určování (Dlouhá a kol., 2010). Největší změny můžeme sledovat při výskytu různých kairomonů pocházejících od predátorů perlooček. Kairomony jsou chemické látky, které prokazují přítomnost dravce a jeho kořist tak může na jeho výskyt reagovat. Při jejich výskytu mohou perloočky významně změnit tvar nebo velikost svého těla a velikost snůšky (Weber a Veselá, 2002; De Meester a Weider, 1999).

Kairomony ale mohou ovlivňovat například i jejich distribuci. Největší predanční tlak je totiž v horní oblasti nádrže. Vysvětlení, proč se v horní oblasti nádrže vyskytuje nejvíce ryb, jsou minimálně dvě. Může to být dáno množstvím potravy pro ryby, tedy hlavně zooplanktonu. Alternativní vysvětlení je, že přehradní nádrže jsou postavené na řekách a vyskytují se v nich říční typy ryb, které hledají podobné podmínky, jaké jsou v řece (Prchalová a kol., 2009).

Na distribuci jednotlivých druhů perlooček v přehradních nádržích působí mnohem více faktorů než jen rybí predace. Je to například množství potravy. Té je v přehradních korytovitých nádržích s jedním dominantním přítokem nejvíce právě v přítocích do nádrže. V přítocích je tedy nejvíce potravy a také největší predace. To favorizuje menší druhy, jako je druh *Daphnia cucullata*, která odolává predaci lépe než zbylé druhy perlooček (Gliwicz, 1990; Sedá a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a). Naopak v oblasti hráze může být málo potravy, a proto se zde vyskytují druhy, které mají účinnější filtrační systém a dokážou zde přežít. Z druhového komplexu *D. longispina* je to právě *Daphnia longispina* (v úzkém smyslu), která se zde vyskytuje. Mezi těmito extrémy (prostorově i ekologicky) se vyskytuje *Daphnia galeata* (Gliwicz, 1990; Petrusek a kol., 2008a). Také je pravděpodobné, že výskyt jednotlivých druhů záleží na intenzitě gradientu, respektive zda dochází k dostatečnému rozrůznění podmínek v nádrži (Ruthová, 2008). Jsou však známy i přehradní nádrže, ve kterých se i přes prokazatelné environmentální gradienty vyskytuje jen jeden druh perlooček (Petrusek a kol., 2013). I další faktory by ale mohly ovlivňovat distribuci perlooček v přehradních nádržích, například gradient parazitace (Wolinska a kol., 2011).

V přehradních nádržích se vyskytuje několik skupin mikroparazitů napadajících perloočky. Jen u několika byla však nalezena rozdílná horizontální distribuce. Jedná se především o oomycety a prvky rodu *Caullerya* (Wolinska a kol., 2011; Duffy a Hall, 2008). Ve studii Wolinské a kol. (2011), která byla provedena na několika českých nádržích, byly oomycety nejméně hojné v horní části nádrže s vysokou turbiditou. S ubývajícím zákalem a snižujícím se množstvím chlorofylu přibývalo oomycetů, což v nádržích zpravidla představuje směr od přítoku ke hrázi. Naopak prvek *Caullerya mesnili* tvořil přesně obrácený gradient své populační hustoty. Nejvíce se ho vyskytovalo v prostředí, kde bylo velké množství zooplanktonu, tedy s přibývajícím hustotou hostitele narůstala i hustota parazita. Nejhojnější byl v přítocích, kde bylo nejvíce zooplanktonu, a dále v nádrži ho ubývalo (Wolinska a kol.,

2011). Zároveň se ukázalo, že různé klony perlooček jsou v nádržích široce rozšířenými mikroparazity různě napadány (Yin a kol., 2012b). Přes všechna tato zjištění zatím ale není jasné, nakolik paraziti dokážou ovlivnit distribuci jednotlivých taxonů perlooček.

Výskyt jednotlivých druhů v přehradních nádržích tedy není náhodný. Jejich ekologické nároky, které shrnul Gliwicz (1990) můžou predikovat, jak budou perloočky v přehradních nádržích rozmístěné. To ostatně demonstrují klíčové práce věnující se tomuto tématu (Seďa a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a), vypracované na českých nádržích. Přehradní nádrže tak představují relativně nový typ prostředí, ve kterém sice nejsou pevné bariéry, ale zato tu jsou environmentálními gradienty, které vytváří v jednotlivých částech přehradních nádrží značně rozdílné podmínky. Ty ovlivňují nejen distribuci jednotlivých druhů perlooček a jejich hybridů (Petrusek a kol., 2008a), ale i jejich vnitrodruhovou strukturu (Yin a kol., 2012a; Petrusek a kol., 2013). Mezi preferovanými oblastmi rodičovských druhů vznikají i místa překryvu dvou druhů. Tyto oblasti jsou zajímavé proto, že zde může pravděpodobně docházet k hybridizaci.

1.4 Mezidruhová hybridizace

Již dlouhou dobu přitahuje mezidruhová hybridizace pozornost mnoha evolučních biologů. Mezidruhoví hybridi mají nové genomy, které jsou vystaveny přirozenému výběru, a tím poskytují klíč k rozluštění příčiny adaptace a speciace (Schwenk a kol., 2008). Jednu z možných definic hybridizace můžeme definovat jako mezidruhové křížení jedinců ze dvou populací nebo skupin populací, které jsou rozeznatelné na základě jednoho nebo více dědičných znaků (Harrison, 1990, podle Howard, 1993). Definice je však mnohem více a každá chápe hybridizaci trochu odlišně.

O hybridizaci se nejprve uvažovalo jako o něčem výjimečném. Hledaly se případy, kdy k hybridizaci došlo, a snažil se vytvořit obecný rámec, jak k hybridizaci dochází. Později, když se začaly používat molekulární markery, se zjistilo, že k hybridizaci dochází poměrně často (Schwenk a kol., 2008). Rovněž se rozvinula diskuse o evoluční užitečnosti či naopak

škodlivosti hybridizace. První pohled na hybridizaci zastávali především botanici. Ti vyzdvihovali evoluční potenciál hybridních genotypů, možnost vzniku nových adaptivních vlastností a jejich možnost obsadit nová prostředí. Naopak většina zoologů zastávala názor, že hybridizace má maladaptivní účinky, protože jedinci produkují méně plodné, nebo úplně sterilní potomstvo (Arnold, 1997).

Předpokládalo se, že častěji dochází k hybridizaci mezi rostlinami než mezi živočichy. Odhadovalo se, že až mezi 25% rostlinnými druhy dochází k hybridizaci a u živočišných druhů se odhadovalo kolem 10% druhů (Mallet, 2005; Barton, 2001). Jsou však i autoři, kteří předpokládají míru hybridizace u některých rostlin až kolem 70% (Stace, 1987; podle Schwenk a Spaak, 1995).

V dnešní době se studium mezidruhové hybridizace rozvíjí značným tempem. Přispěly k tomu především nové genetické a ekologické metody, dostupnost řady nových jaderných markerů, mikrosatelitová DNA, metoda AFLP a další (Schwenk a kol., 2008).

Aby k hybridizaci mezi druhy vůbec došlo, musí být splněno několik podmínek. Prvním z nich je samozřejmě kontakt izolovaných druhů v čase a prostoru. Zároveň musí být životní a rozmnožovací cyklus obou druhů sladěn. V neposlední řadě záleží na tom, jak účinně mají druhy vyvinuty reprodukční bariéry (Schwenk a kol., 2000; Hobaek a Larsson, 2004).

Samotná hybridizace může vést k mnoha událostem. Je to například nárůst genetické diverzity nebo může být zdrojem nové adaptace. Velmi často mezidruhová hybridizace nevede k plodnosti. Pomocí rekombinace genetického materiálu může hybridní genotyp obsadit nové prostředí (Barton, 2001) a začít hybridní speciace. Hybridizace může mít mnoho důsledků. Jedním z nich může být zánik jednoho nebo obou původních druhů (Levin a kol., 1996), nebo může dojít ke koexistenci rodičovských druhů a hybridů (Moore, 1977). Většinou se hybridizace jeví jako méně životaschopná, avšak za určitých podmínek, daných většinou prostředím, mohou být hybridizované formy životaschopnější než jejich rodičovské linie (Barton, 2001; Arnold a kol., 2001; Arnold, 1992; Moore, 1977).

K hybridizaci může docházet na rozhraní dvou rozdílných prostředí. Tuto oblast pak nazýváme hybridní zónou. Evoluční hypotézy nabízejí několik možných scénářů vycházejících z hybridních zón mezi druhy. Základní teorie jsou tři. Jedná se o teorii „adaptivní speciace“, teorii „omezené hybridní převahy“ a teorii „dynamické rovnováhy“ (Arnold, 1992). Teorie adaptivní speciace předpokládá, že úroveň reprodukční izolace mezi hybridizujícími taxony bude vzrůstat či klesat v závislosti na efektivitě přírodní selekce proti hybridním typům. Teorie omezené hybridní převahy zas předpokládá, že hybridní zóny jsou oblastí s ekologickými přechody, ve kterých jsou hybridi úspěšnější než rodičovské druhy. V důsledku toho, že hybridní zóny mohou být relativně stálé, mohou rekombinantní jedinci vytlačit rodičovské druhy v tomto unikátním prostředí. Třetí teorie dynamické rovnováhy předpokládá, že hybridní zóny jsou udržovány pomocí rovnováhy mezi šířením hybridů a jejich menší životaschopností (Arnold, 1992; Barton, 1979). Nutno však dodat, že většina definic hybridních zón vznikla na příkladech z terestrického prostředí.

Hybridní zóny jsou v současné době mnohem lépe prozkoumány v terestrickém prostředí než ve vodním. Terestrické habitaty často vykazují gradienty v ekologických parametrech, jako jsou teplota, humidita, vegetační struktura. Hybridy tam nacházejí příznivé podmínky, především v přechodném prostředí, či omezenou konkurenci ze strany rodičovských druhů, mohou se vyskytovat jak v sympatrii, tak parapatii s rodičovskými druhy. Oproti tomu sladkovodní jezera a tůň se na první pohled zdají být mnohem více homogenní. Rozdílnost v podmínkách je spíše spojená s časem, kdy se podmínky během roku značně mění. Tomu odpovídá i model dočasné převahy hybridů („*temporal hybrid superiority model*“), navržený pro hybridizující perloočky rodu *Daphnia* v jezerech, který předpokládá, že hybridy mohou mít převahu nad rodičovskými druhy v časově omezených obdobích (Spaak a Hoekstra, 1995; Schwenk a Spaak, 1995).

To je oproti ostatním modelům značný rozdíl. Většina modelů totiž předpokládá při dominanci hybridů částečné či úplné nahrazení rodičovských druhů. U modelu dočasné převahy hybridů však může dojít k sezónní dominanci hybridů a současné koexistenci s jedním či dokonce s oběma rodičovskými druhy. Pravděpodobně k tomu dochází v důsledku měnící se fitness klonálně se množících jedinců. Selektivní síly v jezerech mírného pásma se mohou během roku podstatně měnit. Teploty se mnohdy mění od 0°C po 25°C, a

to s sebou přináší i drastickou změnu v potravní nabídce a predčním tlaku. Zřejmě proto jsou určité změny v životním cyklu hybridů perlooček po část roku výhodné a po zbývající nikoliv (Spaak a Hoekstra, 1995). Sezónní změny teplot a predace můžeme nalézt i v přehradních nádržích, a tak je pravděpodobné, že model dočasné převahy hybridů by mohl platit i pro přehradní nádrže.

V jezerech a rybnících dochází poměrně často k hybridizaci perlooček rodu *Daphnia*. Hybridizace perlooček je známa již relativně dlouho (Hebert, 1985; Weider, 1992; Schwenk a Spaak, 1995), výskyt prostorově omezených hybridních zón v přehradních nádržích byl dokumentován poměrně nedávno (Petrusek a kol., 2008a). V českých korytovitých nádržích, v rámci komplexu *Daphnia longispina*, dochází k hybridizaci mezi *Daphnia cucullata* a *Daphnia galeata*, *Daphnia galeata* a *Daphnia longispina*. Mezi *Daphnia longispina* a *Daphnia cucullata* se však v nádržích hybridy nenašli (Sedá a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a; Yin a kol., 2012; Petrusek a kol., 2013). O výskytu těchto hybridů ale víme z mnohých evropských jezer (Schwenk a Spaak, 1995; Yin a kol., 2010). Tato jezera však pravděpodobně nemají rozvinuté horizontální gradienty v pelagickém prostředí. Jedno z možných vysvětlení jejich nepřítomnosti v korytovitých přehradních nádržích je, že jednotlivé druhy perlooček většinou preferují rozdílné podmínky, a tak se v přehradních nádržích vyskytují v rozdílných oblastech (Petrusek a kol., 2008a). *Daphnia cucullata* se vyskytuje v eutrofních jezerech, *Daphnia galeata* v mesotrofních až eutrofních jezerech a *Daphnia longispina* preferuje spíše mezo až oligotrofní jezera (Gliwicz, 1990; Schwenk a Spaak, 1995).

V přehradních nádržích můžeme v důsledku působení mnoha gradientů nalézt všechny tři druhy v jedné nádrži. Eutrofním jezerům v nádržích nejvíce odpovídá oblast přítoku. Zde můžeme nejčastěji nalézt perloočku *Daphnia cucullata*. Naopak pro *Daphnia longispina* je nejvhodnější oblast v okolí hráze. Mezi nimi, často i v celé délce nádrže, jsou pak vhodné podmínky pro výskyt *Daphnia galeata* (Gliwicz, 1990; Sedá a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a; Petrusek a kol., 2013). Ne vždy však najdeme v českých přehradních nádržích všechny tři druhy a občas je možné nalézt i odlišnou distribuci, než která byla popsána výše (Sedá a kol., 2007b; Sedá a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a). Tam, kde se překrývají výskyty dvou rodičovských druhů, vzniká oblast, kde může docházet k hybridizaci.

To, že environmentální gradienty mohou ovlivnit planktonní biotu, je známé. Nejsnáze je můžeme nalézt ve vertikálním směru u stratifikovaných vod. Často můžeme nalézt v jezerech vertikální migraci zooplanktonu (Gliwicz, 1986). Přehradní nádrže svou specifičností umožňují vznik výrazných horizontálních gradientů. Ty ovlivňují přímo či nepřímo celý potravní řetězec v nádrži, a to od fytoplanktonu (Hejzlar a Vyhnálek, 1998), přes perloočky (Petrušek a kol., 2008a) až po ryby (Prchalová a kol., 2009; Vašek a kol., 2004). Nenáhodný výskyt perlooček v nádržích je prokázán mnoha pracemi (Seďa a kol., 2007a; Petrušek a kol., 2008a; Yin a kol., 2012a). Navíc se ukazuje, že environmentální gradienty ovlivňují nejenom samotné druhy a mezidruhové hybridy, ale i jednotlivé klony perlooček v rámci jednoho druhu (Yin a kol., 2012a; Petrušek a kol., 2013).

Korytovité přehradní nádrže by mohly skrývat další zajímavé objevy. Nedávno se ukázalo, že mnohé evropské populace perlooček jsou pravděpodobně mnohem diverzifikovanější, než se myslelo. Nejen v přehradních nádržích se díky přesnějším genetickým metodám podařilo objevit další, dosud neznámé, linie perlooček komplexu *D. longispina*. Na základě analýzy mitochondriální DNA byly objeveny linie, které by mohly představovat kryptické druhy (Petrušek a kol., 2012). V přehradní nádrži Želivka byla takováto linie rovněž nalezena. Vzorky DNA této linie mi byly poskytnuty od Anne Thielsch k porovnání s mými vzorky.

Výskyt hybridních zón v terestrickém prostředí je poměrně častý, ve vodním prostředí se o těchto zónách dosud moc nevědělo. S narůstajícím počtem prací o hybridizujících druzích se však objevují i náznaky, že hybridní zóny existují i ve zdánlivě homogenním vodním prostředí. Pomineme-li perloočky v přehradních nádržích, podobným příkladem ve větším prostorovém měřítku je i výskyt hybridizujících klanonožců v severní části Atlantiku (Parent a kol., 2012).

1.5 Cíle práce

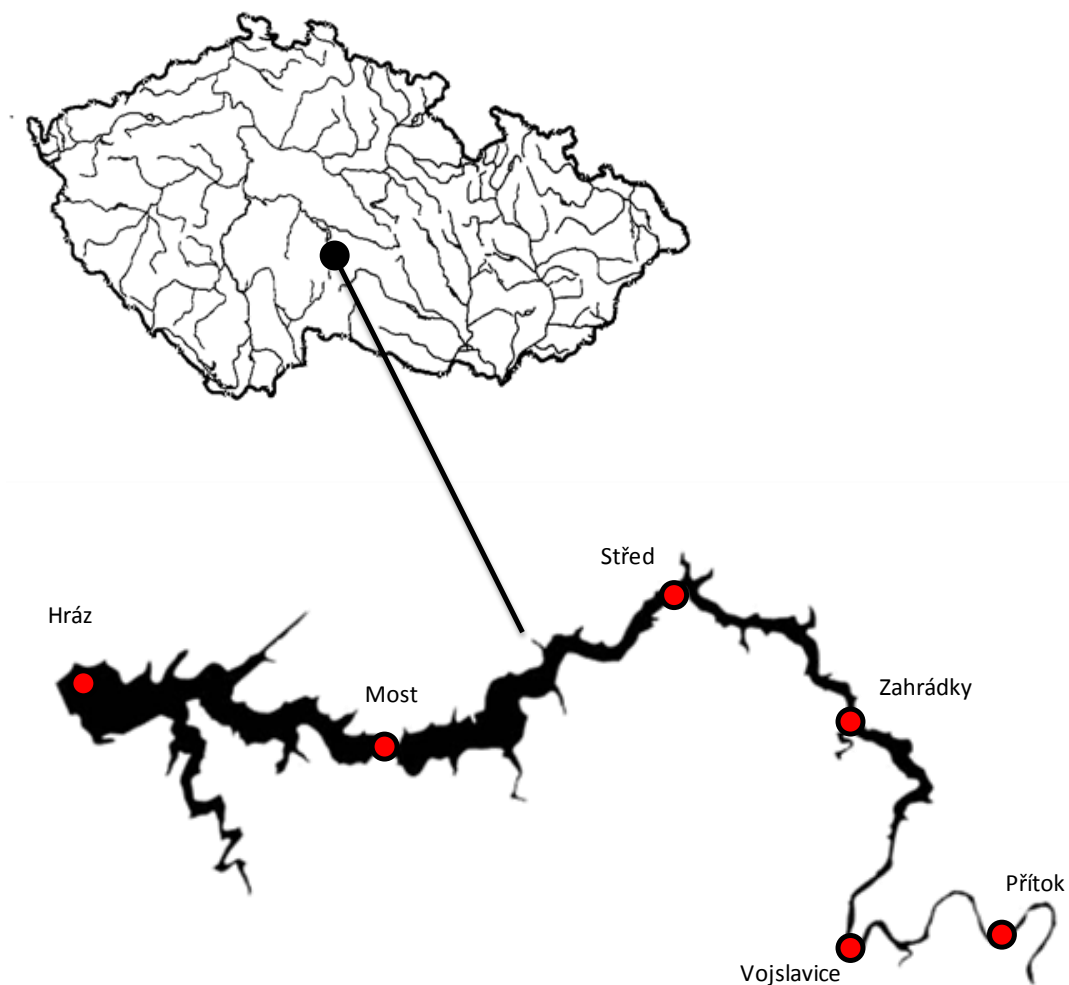
Cílem mé práce bylo nejprve detailně zanalyzovat populační strukturu perlooček druhového komplexu *Daphnia longispina* na podrobném podélném gradientu přehradní

nádrže Želivka ze vzorků odebraných v letech 2009 a 2010. Vyhodnocování bylo zaměřeno na taxonomické složení nejen samotných rodičovských druhů a jejich hybridů, ale i na klonální diverzitu vztahenou k environmentálním gradientům v přehradních nádržích. Zároveň byla porovnávána struktura a míra podobnosti jednotlivých vzorků mezi lokalitami a mezi sezónami 2009 a 2010. Dále jsem se ve své práci snažil nalézt odpověď, zda jednotlivé klony perlooček vykazují preferenci k určité lokalitě a zda se tyto klony na daných lokalitách objevují i v následující sezóně. V neposlední řadě jsem také porovnával klonální DNA získanou od Anne Thielsch s mými vzorky.

2 Materiál a metodika

2.1 Lokalita

Vzorky zooplanktonu byly odebírány v letních měsících v letech 2009 a 2010 z korytovité přehradní nádrže Želivka (oficiální název nádrže je Švihov, běžně se však používá název Želivka; obr. 3). Nádrž je protáhlá, kaňonovitého tvaru s jedním hlavním přítokem. Nachází se ve středních Čechách (od 49°43'N, 15°5'E do 49°34'N, 15°14') na řece Želivce, její hráz je 4 kilometry od soutoku s řekou Sázavou. Želivka byla napuštěna v roce 1975 a byla postavena jako zdroj pitné vody pro Prahu a další středočeská města. Rozlohou 1602 ha je největší vodárenskou nádrží a je čtvrtou největší nádrží v České republice. Maximální hloubka u hráze



Obr. 3: Schéma jednotlivých odběrných bodů na přehradní nádrži Želivka.

je 49 metrů, vzdálenost od přítoku ke hrázi (měřeno v původním korytě řeky) činí při plném stavu nádrže 39 km a maximální výška hladiny se nachází v nadmořské výšce 379 m.n.m. Objem nádrže činí 309 milionů metrů krychlových a při průměrném ročním průtoku $19 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ je teoretická doba zdržení nádrže 188dní (Broža a kol., 2005; Sed'a a kol., 2007a; www.pvl.cz).

2.2 Odběr vzorků

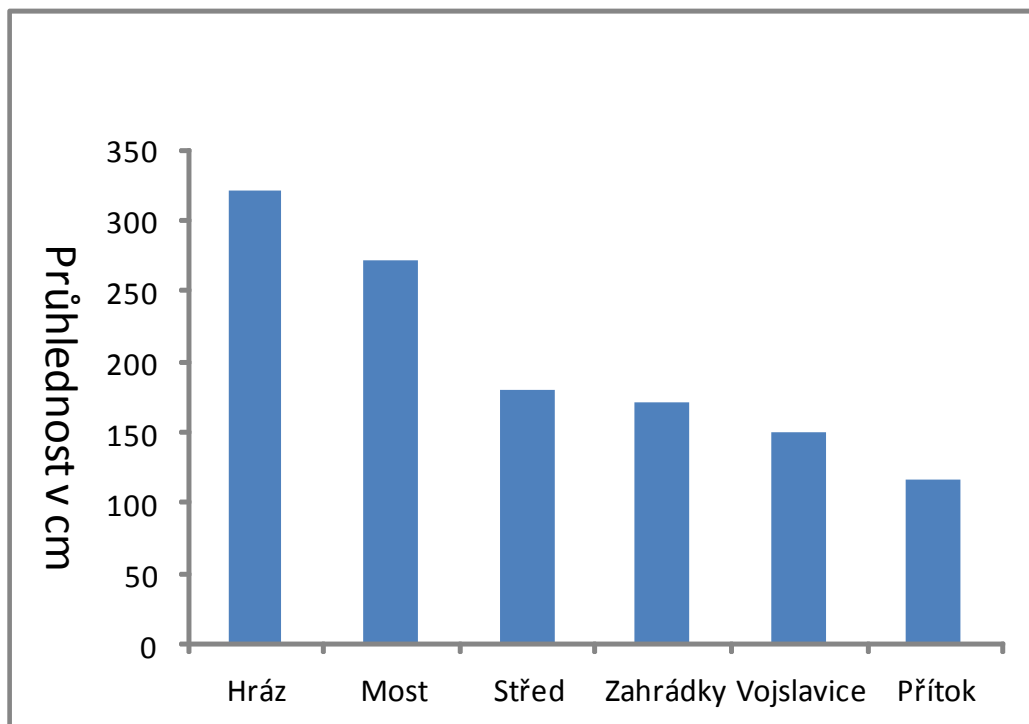
Vzorky byly odebírány ze šesti míst nádrže a to tak, aby byl pokryt její podélný gradient. Jednalo se o stanoviště Přítok, Vojslavice, Zahrádky, Střed, Most a Hráz (obr. 3). Na těchto místech byly vzorky odebírány na nejhlubším místě nádrže (nad původním korytem řeky), obvykle na místech, kde jsou fixně umístěny bóje využívané pracovníky Povodí Vltavy. Odběrné stanoviště Přítok se v jednotlivých letech drobně lišilo (tab. 1). Záleželo především na stavu napuštění přehrad. Konkrétní místo bylo voleno tak, aby maximální hloubka nádrže byla cca 4 metry. Největší vzdálenost mezi odběrnými body byla 6,7 kilometru (vzdušnou čarou), a to mezi stanovištěm Hráz a Most. Vzdálenosti mezi dalšími odběrnými body směrem k přítoku se zmenšovaly.

Lokalita:	Hráz	Most	Střed	Zahrádky	Vojslavice	Přítok
2010	49°43'N 15°5'E	49°40'N 15°9'E	49°40'N 15°14'E	49°37'N 15°15"E	49°36'N 15°12'E	49°35"N 15°14"E
2009	-//-	-//-	-//-	-//-	-//-	49°35"N 15°14"E
datum odběru	31.7.2010	2.8.2010	1.8.2010	1.8.2010	1.8.2010	2.8.2010
hloubka	49	36	27	18	10	4
průhlednost	320	270	180	170	150	115
datum odběru	5.8.2009	6.8.2009	4.8.2009	6.8.2009	4.8.2009	3.8.2009
hloubka	48	35	25	18	10	5
průhlednost	310	310	220	250	185	110

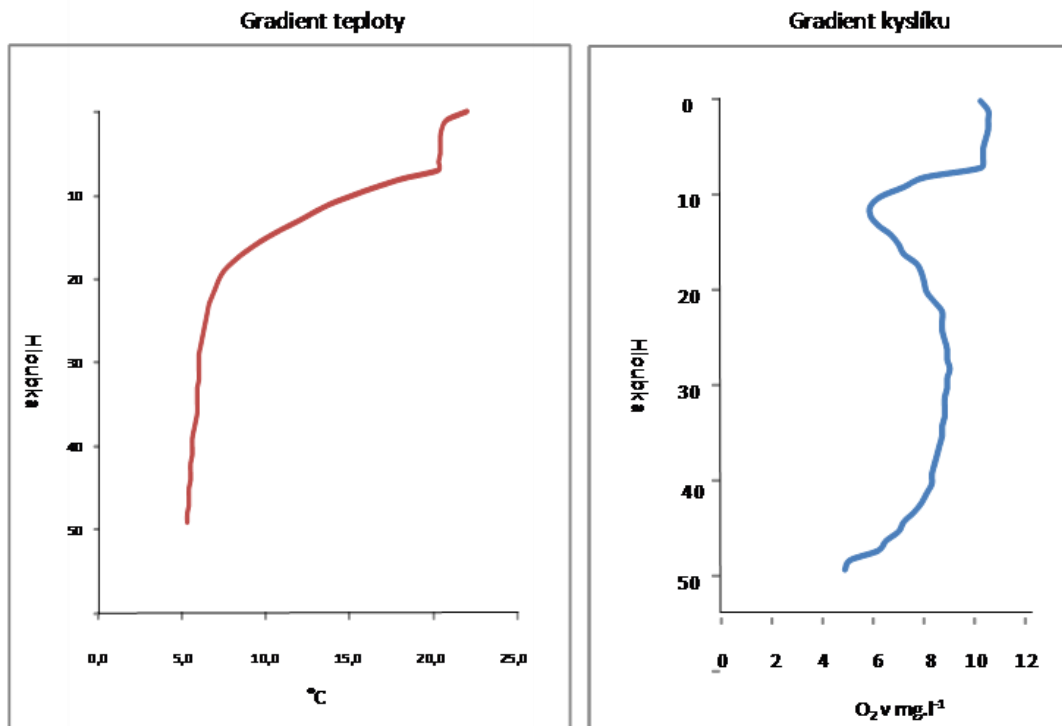
Tabulka 1: Detaily jednotlivých odběrů

Na stanovištích Most a Hráz byly v roce 2009 odebírány vzorky i podle vertikálního gradientu – epilimnion, metalimnion a hypolimnion. Ten byl určen pomocí sond, kterými jsme měřili teplotu a množství rozpuštěného kyslíku. V roce 2010 byly vzorky takto odebrány pouze z oblasti hráze. Vzorky se odebíraly skrz celý vodní sloupec planktonními sítěmi s Apsteinovým nástavcem o průměru 310 mm a velikostí ok 200 μm , 240 mm a velikostí ok 140 μm , u hráze pak sítí o průměru 400 mm a velikostí ok 175 μm . Jednotlivé sítě s rozdílnou velikostí ok byly voleny podle aktuálního množství fytoplanktonu. Vzorky byly z jednotlivých vodních vrstev (epilimnion, metalimnion a hypolimnion) odebírány pomocí stahovací sítě, která umožňuje odebrání vzorků z jednotlivých hloubek, aniž by došlo ke kontaminaci z jiné hloubky. Následně byl materiál ze sítě vložen do 50ml PE lahviček a zakonzervován 96% etanolem. Pokud bylo nasbíraného materiálu větší množství, provedla se fixace etanolem opakovaně. Zároveň s odebíráním vzorků byla sbírána data o teplotě vody ve vertikálním profilu, množství rozpuštěného kyslíku, průhlednosti vody (Obr. 4 a 5, měřeno Secchiho deskou či planktonní sítí).

Průhlednost



Obr. 4: Průhlednost na jednotlivých odběrných stanovištích v roce 2010



Obr. 5: Vertikální gradienty teploty a kyslíku z lokality Hráz v roce 2010

Na konci roku 2012 mi byly rovněž dodány dva vzorky klonu do té doby neznámé mitochondriální linie komplexu *D. longispina* (Petrušek a kol., 2012), kterou objevila Anne Thielsch z týmu Klause Schwenka z Universität Koblenz - Landau (SRN). Vzorky byly původně odebrány ze Želivky z oblasti hráze v roce 2010 na přelomu července a srpna a následně z nich byly založeny klonální kultury, které byly uchovávány v Landau. Dodané vzorky byly zpracovány spolu s ostatními vzorky ze Želivky z vlastních odběrů.

2.3 Příprava DNA

Z každého vzorku bylo na Petriho misce pod stereomikroskopem (zvětšení 4 – 10x) náhodně vybráno 48 samiček. Pokud se jednalo o efipialní samici (pouze 1 případ), bylo nejprve efipium odstraněno (embrya v efipiu by obsahovala i samčí DNA). Vzorky byly přes kapku destilované vody (kvůli odstranění etanolu) vloženy do PCR destiček o 96 jamkách s roztokem pufru H3 a proteinázy K o objemu 50-100 μ l (Schwenk a kol., 1998). Po dobu vybírání byly vzorky v proteináze chlazeny ledem.

Izolační roztok obsahoval 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.05 M KCl, 0.005% Tween 20, 0.005% NP-40 Nonidet a 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinázy K. Vzorky byly inkubovány ve vodní lázni po dobu 4 – 16 hodin při teplotě 56°C. Na závěr byly vzorky zahřáty na 96°C po dobu 10 minut. Protokol byl převzat z práce Brede a kol. (2006) a upraven podle Thielsch a kol. (2009). DNA izoláty byly uchovávány v mrazáku při teplotě -20°C.

2.4 Mikrosatelitová analýza

Pro charakterizaci populační struktury (včetně určení taxonů) byla použita metoda mikrosatelitové analýzy. Dříve se pro určení taxonů komplexu *Daphnila longispina* nejvíce používala alozymová elektroforéza (Petrusek a kol., 2008a; Sed'a a kol., 2007a; Spaak, 1996). Druhově specifické alely na některých lokusech jsou vhodné pro určování rodičů a kříženců v rámci hybridizujících populací (Dlouhá a kol., 2010) tato metoda byla i relativně nedávno stále používána i pro studium vnitropopulační variability (Zeis a kol., 2010; Sed'a a kol., 2007b; Petrusek a kol., 2013). Alozymová metoda má však díky relativně nízké variabilitě značná omezení při určování multilokusových genotypů. Je pravděpodobné, že v mnoha případech multilokusový genotyp definovaný pomocí alozymů představuje skupinu geneticky podobných klonů (Thielsch a kol., 2009). Proto byla pro tuto práci zvolena metoda mikrosatelitových markerů. V porovnání s ostatními dosud používanými metodami se jeví mikrosatelitové markery jako jedny z nejpřesnějších (Dlouhá a kol., 2010).

Mikrosatelitové markery, známé taky jako krátké tandemové repetice, jsou polymorfní DNA úseky skládající se z opakujících se sekvencí nukleotidů. Opakující se sekvence mohou být dlouhé od dvou do sedmi párů bazí. Počet, kolikrát jsou jednotky v daném mikrosatelitovém lokusu opakovány, je značně proměnlivý. To je vlastnost, která je činí užitečnými jako genetické markery. Většina využívaných mikrosatelitů se vyskytuje v nekódující oblasti genomu, a tak by rozdíly v počtu opakování neměly mít významný vliv na funkci okolních genů. V typické mikrosatelitové analýze jsou mikrosatelitové lokusy amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) používající fluorescenčně

označené přímé a neoznačené zpětné primery. Délky amplifikovaných mikrosatelitů jsou následně porovnány s určitým velikostním standardem (GeneMapper, 2005).

Některé primery určené pro evropské druhy perlooček byly původně vyvinuty pro jiné taxony či regiony (například pro *Daphnia pulicaria* či severoamerické *Daphnia galeata mendotae*) a na evropských populacích komplexu *Daphnia longispina* byly až následně odzkoušeny či pro ně upraveny, některé byly pro ně nově navrženy (Brede a kol., 2006). Deset mikrosatelitových lokusů vhodných pro multiplexing pro zjištění detailní genetické struktury populace *Daphnia longispina* v českých nádržích bylo vybráno na základě zkušeností Nory Brede (osobní sdělení od Adama Petruska).

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v PCR destičkách o objemu jednotlivých zkumavek 200 μ l. Fragmenty označené fluorescenčně značenými primery byly amplifikovány pomocí Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen) pro 10 mikrosatelitových lokusů. Každý vzorek v multiplex PCR reakci využívající Type-it Microsatellite PCR kit obsahoval 11 μ l: 1 μ l izolátu DNA, 5,5 μ l Type-it Multiplex PCR Master Mix, 1,6 μ l vody a různé množství každého primeru v závislosti na konkrétním lokusu (viz. tabulka 2 níže). Reakce probíhaly v termocykleru iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD). Cyklus pro reakci začínal denaturací po dobu 15-ti minut při 95°C, následně 30 cyklů při teplotě 94°C po dobu 30 sekund (denaturace), 54°C po 1,5 minuty (nasedání primeru) a následně zahřátí na 72°C po jednu minutu (navázání primeru). Posledním krokem bylo 30 minut při teplotě 60°C, následovalo již jen zchlazení na 4°C.

SwiD18	Dpu512	SwiD2	Dgm109	SwiD1	Dp281	Dp196	SwiD10	SwiD12	SwiD14
0,4 μ M	0,3 μ M	0,3 μ M	0,3 μ M	0,3 μ M	0,05 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,3 μ M	0,3 μ M

Tab. 2: Množství jednotlivých primerů

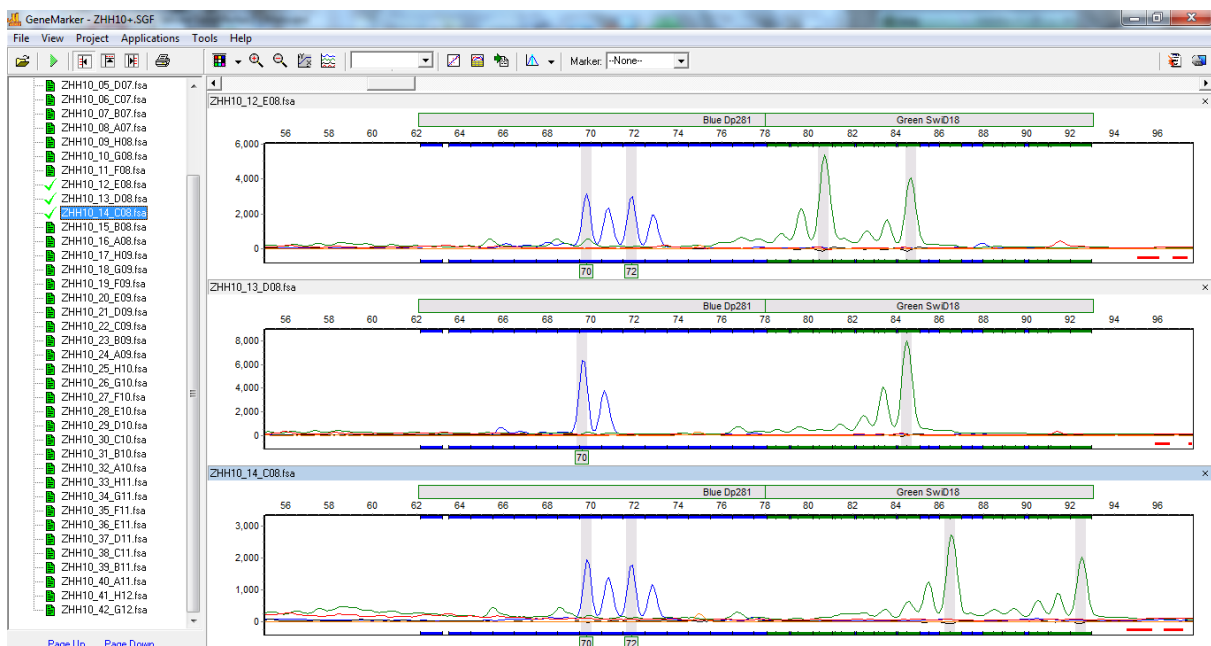
Z každého vzorku bylo odebráno 0,1 μ l a přidalo se 8,8 μ l formamidu a 0,2 μ l velikostního standardu pro fragmentační analýzu (GeneScan 500LIZ Applied Biosystems), poté byly vzorky vystaveny teplotě 96°C po dobu 3 minut. Fragmentační analýza byla provedena v sekvenačním centru PŘF UK na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Dodané vzorky klonů od Anne Thielsch byly zpracovány s ostatními vzorky z vlastních odběrů.

2.5 Vyhodnocení dat

Celkem bylo vyhodnoceno 855 jedinců pomocí programu GeneMarker V2.2.0 (Obr. 6). Během vyhodnocování jsem zjistil, že lokus SwiD 10 není pro populaci perlooček ze Želivky zcela vhodný a pro pozdější vyhodnocení dat nebyl použit. U tohoto lokusu docházelo k získání příliš mnoho informací. Ve výsledku bylo použito 754 jedinců, kterým nechyběly žádné informace o lokusech, nebo chyběly informace o jednom (87 jedinců) či maximálně dvou (26 jedinců) lokusech.

Pro vizualizaci genetické struktury populace perlooček v nádrži byla použita faktoriální korespondenční analýza za použití programu GENETIX 4.0.5.2 (Belkhir a kol., 2004). Byla zkoumána podobnost multilokusových genotypů charakterizována pomocí alel na devíti mikrosatelitových lokusech. Pomocí tohoto programu byl každý odlišný multilokusový



Obr. 6: Vyhodnocení vzorků pomocí GeneMarker V2.2.0

genotyp (MLG) zobrazen jako samostatný jedinec.

Protože žádný z použitých mikrosatelitových lokusů nebyl fixován pro druhově specifické alely, použil jsem program NewHybrid 1.1 (Anderson a Thompson, 2002), který spočetl posteriorní pravděpodobnost, že daní jedinci náleží k jednomu z rodičovských druhů či hybridů. Tento program je však navržen pro práci pouze se dvěma rodičovskými druhy, a proto bylo nejprve nutno rozdělit jedince do jednotlivých skupin. K tomu byl použit program Genetix. Na základě výsledků z vizualizace faktoriální korespondenční analýzy (Genetix) byly populace rozděleny do několika skupin a následně po dvou zpracovány programem NewHybrid (Dlouhá a kol., 2010). Ten umožňuje použít genetická data k identifikaci hybridů. Nevyžaduje znalost frekvence rodičovských alel, je aplikovatelný nejen na lokusy s fixovanými rozdíly mezi druhy, ale i na lokusy bez fixovaných rozdílů. Bez dřívější znalosti druhově specifických alel můžeme rozdělit jedince ve smíšené populaci do druhů či taxonů. Je zde použit pravděpodobnostní model, ve kterém rodičovské druhy a různé třídy kříženců (F1 hybridy, F2 hybridy a zpětní kříženci) tvoří směs, ze které je vzorek vybírán. Původ taxonů byl zkoumán ve třech testech. Nejprve byla zkoumána skupina tvořená rodičovskými druhy *D. galeata*, *D. longispina* a jejich rekombinantními genotypy, poté obdobné kombinace pro rodičovské druhy *D. cucullata* a *D. galeata* a naposledy kombinace *D. longispina* a *D. cucullata*. Analýza v programu NewHybrids probíhala po minimálně 10^6 iterací, které probíhaly po zahřívací („burn in“) fázi o 10^6 iteracích.

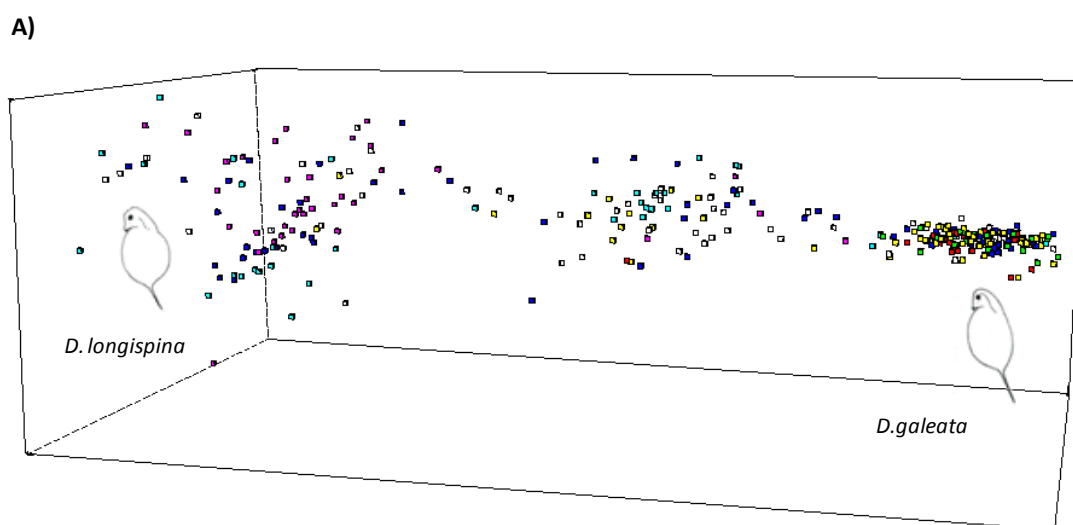
Následně bylo prováděno porovnání klonální diversity mezi hybridy a jejich rodičovskými druhy. Klonální diverzita MLG/N (počet multilokusových genotypů dělená velikostí vzorku) byla vypočtena pro každou populaci. K tomu byly použity programy MS Excel a GenAlEx 6.5 (Peakall a Smouse, 2012). Následně došlo k porovnání jednotlivých populací v rámci lokalit i sezón a rovněž byla porovnána klonální diverzita a struktura.

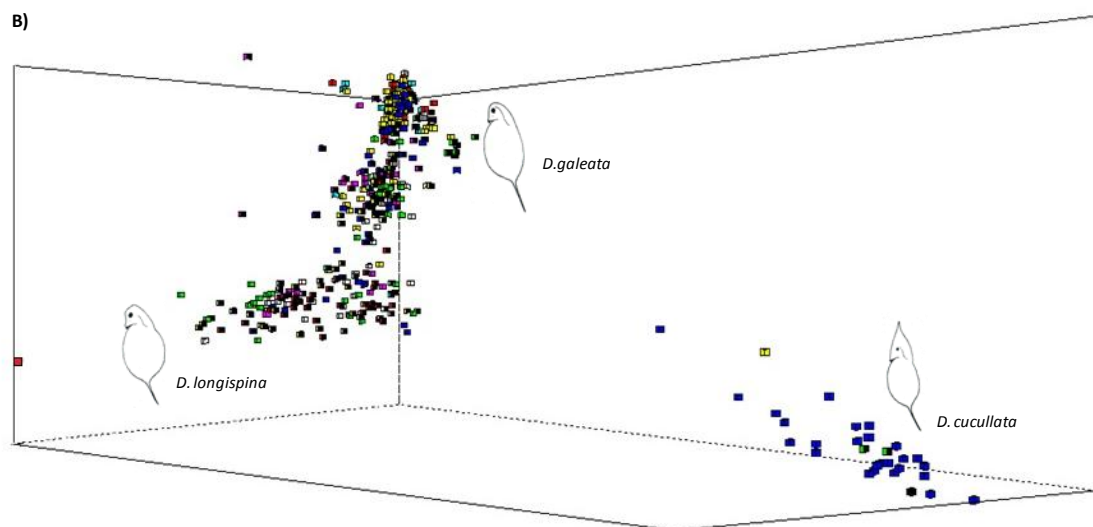
3 Výsledky

Pomocí mikrosatelitových markerů bylo ogenotypováno 857 jedinců. Celkem bylo pomocí GeneMarkeru úspěšně vyhodnoceno 754 jedinců, z toho bylo 408 jedinců z roku 2009 a 346 jedinců z roku 2010. K tomu byli zpracováni ještě 2 jedinci laboratorního klonu získané od Anne Thielsch, které byly odebrány ze Želivky z oblasti hráze na konci července v roce 2010.

3.1 Taxonomické složení

Data získaná pomocí programu GeneMarker byla rozdělena jednotlivé roky a následně zpracována faktoriální korespondenční analýzou v programu Genetix. Na základě vizualizace faktoriální korespondenční analýzou byli jedinci rozděleni do několika základních skupin (obr. 7). Následně byly tyto skupiny dat vkládány po dvou do programu NewHybrids (tento program je navržen pro práci pouze se dvěma rodičovskými druhy, a proto bylo nejprve nutno rozdělit jedince do jednotlivých skupin). Na základě posteriorní pravděpodobnosti spočtené tímto programem bylo určeno do taxonu 726 jedinců s pravděpodobností





Obr. 7: Výsledky faktoriální korespondenční analýzy (Genetix) založené na devíti mikrosatelitových markrech. V analýze **A**) je zobrazeno 408 jedinců za rok 2009 rozdělených do 3 skupin, a to *D. galeata*, *D. longispina* a hybridi *D. galeata* x *D. longispina*. V analýze **B**) je zobrazeno 346 jedinců za rok 2010 a jsou zde vidět rodičovské druhy *D. longispina*, *D. galeata*, *D. cucullata* a hybridi *D. galeata* x *D. longispina*.

minimálně 95% (viz tabulka 3), což představuje 96% jedinců.

Ve zkoumaném období byly nalezeny všechny tři očekávané rodičovské druhy (*Daphnia longispina*, *D. galeata* a *D. cucullata*). Poslední zmíněný druh byl však nalezen pouze v roce 2010. Zároveň byli nalezeni F1 hybridi *D. galeata* a *D. longispina*. F1 Hybridy *D. longispina* a *D. cucullata* a F1 hybridy *D. galeata* a *D. cucullata* nebyli programem NewHybrids nalezeni. Rovněž nebyli tímto programem téměř žádní jedinci (až na jednu jedinou výjimku) určeni jako zpětní kříženci.

Nejběžnějším rodičovským druhem komplexu *Daphnia longispina* byla *D. galeata*, která tvořila kolem poloviny všech vzorků po oba dva roky. V roce 2009 byla druhým nejběžnějším druhem *D. longispina*, kdežto v roce 2010 to byli F1 hybridy *D. galeata* a *D. longispina*. Jejich výskyt byl zhruba poloviční než u rodičovského druhu *D. galeata* (tab. 3). V roce 2009 byli nejméně zastoupeni F1 hybridy (*Daphnia cucullata* nebyla objevena vůbec). V roce 2010 byla

nejmenším počtem zastoupena *D. cucullata*, a to pouze 9% ze všech analyzovaných jedinců tohoto roku.

Výskyt taxonu	<i>D. galeata</i>	<i>D. longispina</i>	<i>D. cucullata</i>	F1 <i>D. galeata</i> x <i>longispina</i>
rok 2009	198 (52%)	114 (30%)	0	68 (18%)
rok 2010	151 (43%)	68 (20%)	30 (9%)	97 (28%)

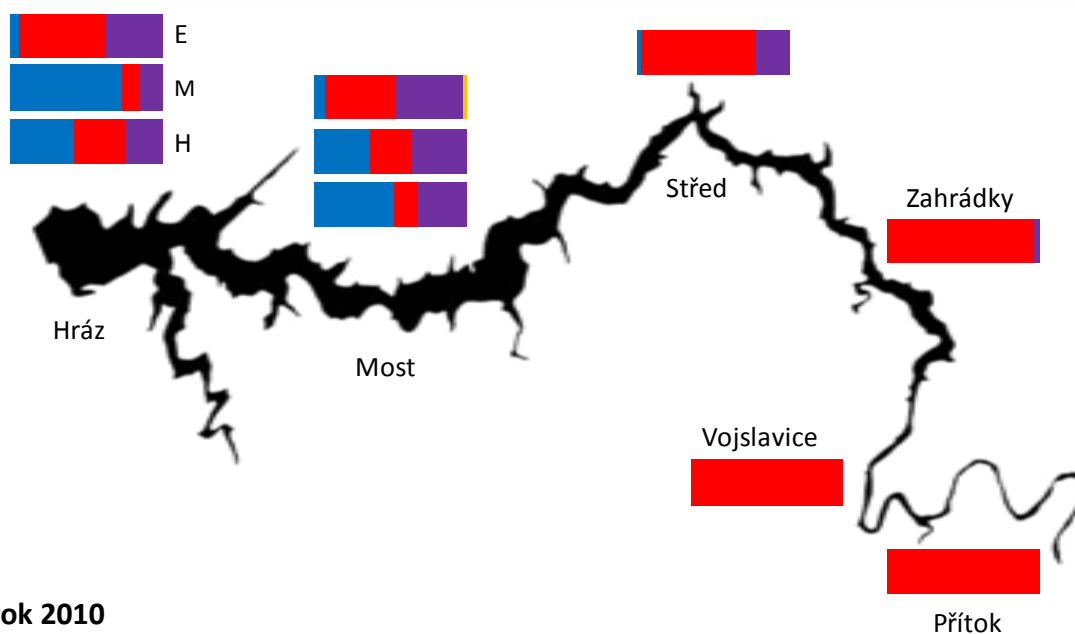
Tab. 3: Procentuální zastoupení jedinců v jednotlivých taxonech na základě rozdělení podle posteriorní pravděpodobnosti z programu NewHybrids.

Získané informace o jednotlivých taxonech byly vztaženy k lokalitě, kde byly jednotlivé vzorky odebrány. Distribuce perlooček v přehradní nádrži Želivka nebyla náhodná, jednotlivé druhy preferovaly rozdílné oblasti nádrže, a to podle předpokládaného výskytu environmentálních gradientů. Navíc se ukázalo, že v meziročním porovnání je taxonomická struktura nádrže poměrně stálá (až na výskyt perlooček *D. cucullata*). Perloočky *D. cucullata* se vyskytovaly především v horní části nádrže v oblasti přítoku. Jejich největší výskyt byl zaznamenán na lokalitě Přítok a dále směrem ke hrázi jich rychle ubývalo. Jejich nejnížší zaznamenaná přítomnost byla na lokalitě Zahrádky (11 km od přítoku). Perloočky *D. galeata* dominovaly jak oblasti přítoku, tak v oblasti středu. Jejich největší výskyt byl v roce 2009 v oblasti přítoku, naopak v roce 2010 dominovaly až mezi touto oblastí a oblastí středu nádrže. Perloočky *D. longispina* měly největší výskyt v oblasti hráze kolem metalimnia (obr. 8). Mezidruhovní hybridy *D. galeata* a *D. longispina* preferovaly střední a spodní část nádrže. Jednalo se tedy o lokality mezi preferovanými oblastmi rodičovských druhů. Přesné počty jednotlivých druhů v jednotlivých sezónách jsou v příloze č. 1.

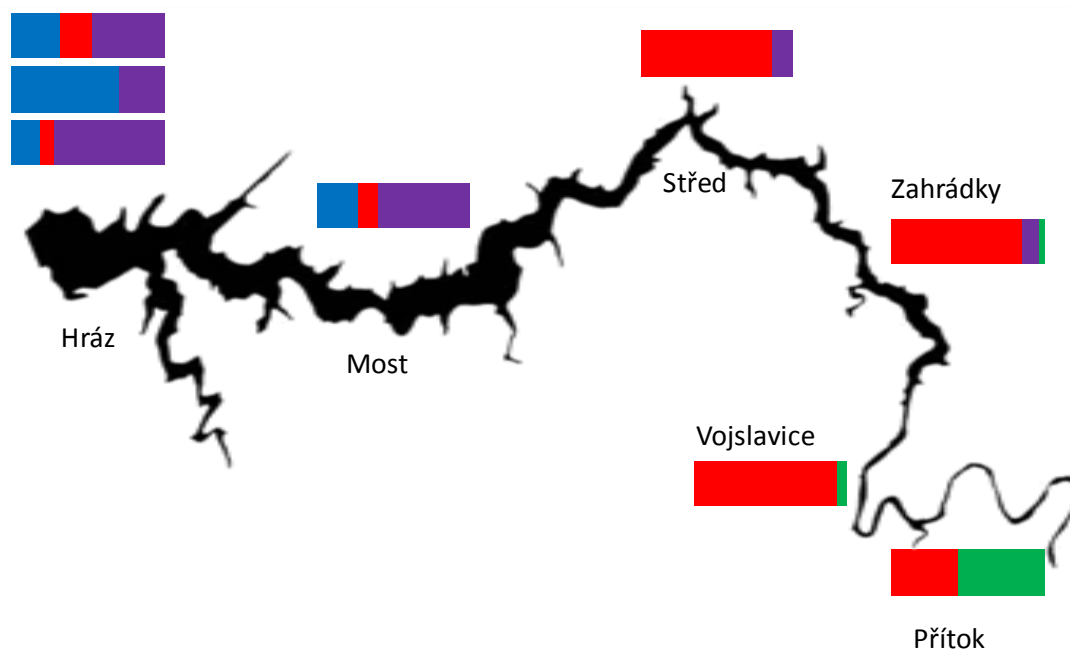
Během vyhodnocování se ukázalo, že perloočky *Daphnia longispina* jsou podle faktoriální korespondenční analýzy mnohem diversifikovanější než ostatní druhy. Rozdíl v kompaktnosti jednotlivých druhů byl tak markantní, že prvotní úvahy byly, že se jedná o dva samostatné taxony. Jednou z hypotéz bylo i to, že by se mohlo jednat o divergentní linii nalezenou Anne Thielsch a případně její hybridy s *D. longispina*. Perloočky z „oblaku *longispina*“ byly proto podrobeny dalšímu zkoumání. Jednalo se především o samostatné analýzy v programech Genetix a NewHybrids. Pomocí těchto programů se však ukázalo, že jde pouze o značnou heterogenitu *Daphnia longispina*.

Meziroční porovnání výskytu jednotlivých druhů perlooček

A) rok 2009



B) rok 2010



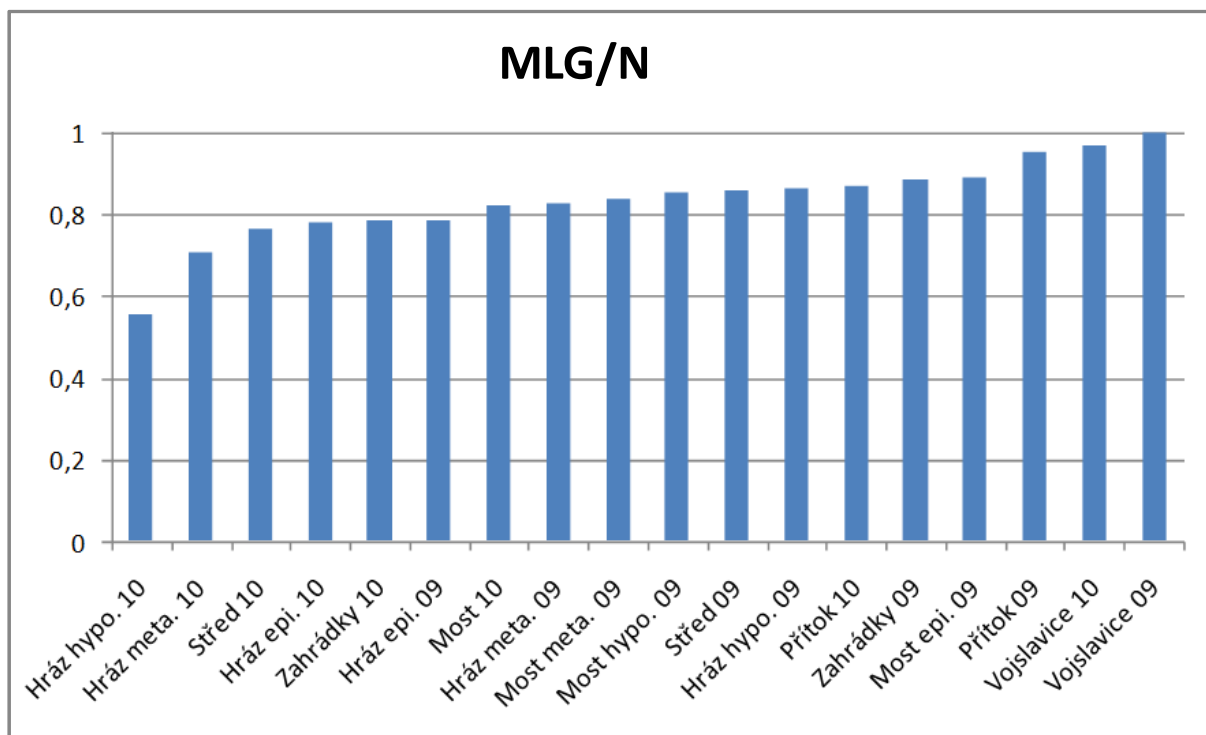
■ *D. cucullata*
 ■ *D. galeata*
 ■ *D. longispina*
 ■ *D. galeata* x *D. longispina*
 ■ Zpětný kříženec s *D. galeata*

Obr. 8: Na schématu **A)** v přítoku je vidět dominantní výskyt perlooček *D. galeata*, v oblasti středu se objevují hybridy *D. galeata* a *D. longispina* a nejbliže hrázi se vyskytují i perloočky *D. longispina*. Na vertikálním gradientu na lokalitách Hráz a Most je vidět, že v oblasti epilimnia (E) je značné množství *D. galeata* a hybridů. Až v oblasti metalimnia (M) a hypolimnia (H) dominují v oblasti hráze perloočky *D. longispina*. Na schématu **B)** je oproti roku 2009 vidět v oblasti přítoku výskyt perlooček *D. cucullata*, kterých od přítoku směrem ke hrázi rychle ubývá. Distribuce ostatních druhů je velmi podobná roku 2009.

3.2 Klonální struktura

Jedním z nových pozorování na přehradní nádrži Želivka bylo i srovnání klonální diverzity v čase a prostoru. To bylo provedeno pomocí programů MS Excel a GenAlEx. Celkem bylo objeveno 552 genotypů, z čehož se vyskytovalo 475 unikátních genotypů a 74 se objevilo vícekrát. Poměrně často se shodné genotypy nacházely na dvou a více lokalitách (ve 40 případech). Dva genotypy hybridů *D. galeata* a *D. longispina* se vyskytovaly v roce 2010 téměř v celé nádrži, byly objeveny na čtyřech ze šesti odběrných lokalit (nebyly nalezeny jen na nejvýše položených stanovištích Vojslavice a Přítok). V roce 2009 nebyl ani jeden z těchto genotypů objeven. Přitom bylo objeveno 15 genotypů, které se vyskytovaly v obou letech. Vyskytovaly se jak na stejné lokalitě, tak ve třech případech byly nalezeny pouze na různých lokalitách. V polovině případů byly klony v roce 2010 početnější, než v roce 2009 (z 15 genotypů, které se opakovaly). Obecně se však nedá říci, že se nejpočetnější klony vyskytovaly i v následujícím roce.

Největší multilokusová bohatost (MLG/N) se u mých vzorků vyskytovala na lokalitách Vojslavice a Přítok. Jednalo se tedy o stanoviště nejbližší přítoku do nádrže. Na dalších lokalitách směrem ke hrázi byla již MLG bohatost různá (tab. 4) a nedá se tedy říci, že by



Tab. 4: Multilokusová bohatost na jednotlivých lokalitách v jednotlivých sezónách

odpovídala nějakému převládajícímu trendu. Průměrná klonální diverzita v přehradní nádrži Želivka byla 0.735 (MLG všech jedinců dělený počtem jedinců). Průměrná klonální diverzita perlooček *D. galeata* a *D. longispina* byla podobná celkové MLG bohatosti celé populace. Naopak perloočky *D. cucullata* vykazovaly mnohem větší MLG/N, a to 0.965. V analyzovaném vzorku byl nalezen pouze jediný klon *D. cucullata*, který se vyskytoval v celé populaci jen dvakrát. Naopak hybridy perlooček *D. galeata* a *D. longispina* měli v roce 2010 velmi nízkou klonální diverzitu, MLG/N byla pouhých 0.448 (více v tabulce č. 5). Největší množství opakovaně nalezených klonů (111) za obě dvě sezóny se vyskytovalo u perlooček *D. galeata*,

A)

B)

2009	MLG	N	MLG/N	2010	MLG	N	MLG/N
<i>D. longispina</i>	81	111	0.730	<i>D. long.</i>	49	66	0.742
<i>D. galeata</i>	165	206	0.801	<i>D. gal.</i>	115	152	0.757
F1 hybridy	55	78	0.705	F1 hybridy	44	98	0.449
<i>D. cucullata</i>	N/A	N/A	N/A	<i>D. cuc.</i>	28	29	0.656

Tab. 5: Porovnání jednotlivých multilokusových genotypů (MLG) dělených počtem jedinců (N) pro jednotlivé roky 2009 (A) a rok 2010 (B).

následovali hybridy *D. galeata* a *D. longispina* (100), výrazně méně bylo klonů u perlooček *D. longispina* (71) a jen jediný klon byl opakovaně nalezen u *D. cucullata*. Tabulku s opakovaným výskytem jednotlivých klonů je možné nalézt v příloze (č. 2).

Samotné klony od Anne Thielsch, které měly divergentní mitochondriální DNA, se ve vizualizaci z faktoriální korespondenční analýzy vyčlenily a nespádaly do žádné skupiny (možno vidět na obrázku č. 7 B, kde jsou znázorněny jako jeden osamocený červený bod v levém dolním rohu). Nejbližší měly k perloočkám *Daphnia longispina*. Při porovnání jednotlivých alel klonů a ostatních jedinců se ukázalo, že tyto klony mají dvě jedinečné alely (SwiD 1, 128 137 a SwiD 14, 181 181), které se u ostatních jedinců nevyskytovaly. Zbylé alely se v mých výsledcích běžně vyskytovaly.

Diskuse

Má práce byla zaměřena na detailní taxonomické složení perlooček komplexu *Daphnia longispina* v korytovité přehradní nádrži Želivka. V průběhu mé práce byla na Želivce objevena pravděpodobně kryptická mitochondriální linie perlooček (Petrušek a kol., 2013). Vzorky této linie jsem se svými měl možnost porovnat. Oproti dřívějším pracím zaměřeným na české přehradní nádrže (Petrušek a kol., 2008a; Sed'a a kol., 2007a) bylo zvoleno mnohem detailnější prostorové vzorkování a rovněž byla zvolena odlišná metoda pro charakterizaci populační struktury. Původní alozymová metoda má díky relativně nízké variabilitě značná omezení při určování multilokusových genotypů. Je pravděpodobné, že v mnoha případech multilokusový genotyp definovaný pomocí alozymů představuje skupinu geneticky podobných klonů (Thielsch a kol., 2009). Proto byla pro tuto práci zvolena metoda mikrosatelitových markerů. Díky ní bylo možné sledovat změny v taxonomickém a klonálním složení populace perlooček a zároveň sledovat množství vyskytujících se klonů. V porovnání s ostatními dosud používanými metodami se jeví mikrosatelitové markery jako jedny z nejpresnějších (Dlouhá a kol., 2010).

Korytovité přehradní nádrže představují díky svým specifickým vlastnostem zajímavý modelový systém vhodný pro pozorování prostorové distribuce druhů. Environmentální gradienty ovlivňují výskyt jednotlivých druhů perlooček komplexu *Daphnia longispina* v korytovitých přehradních nádržích, jejich mezidruhových hybridů a zřejmě ovlivňují i jejich vnitropopulační dynamiku. Je to umožněno především v důsledku výskytu několika relativně stálých podélných environmentálních gradientů, které mohou vytvářet na podélné ose nádrže značně rozdílné podmínky prostředí. Ty umožňují výskyt více příbuzných druhů perlooček komplexu *Daphnia longispina* na více lokalitách v jednom vodním prostředí a umožňují tak i snadnější vznik jejich hybridů (Sed'a a kol., 2007a; Petrušek a kol., 2008a).

V mé práci se potvrdilo, že prostorová distribuce jednotlivých taxonů v nádrži není náhodná a sleduje obecný trend pozorovaný v nádržích. Nemusí jít však jen o různé taxony. Na přehradní nádrži Římov je několikrát zdokumentován výskyt pouze perlooček *D. galeata*,

kde jednotlivé klony preferují rozdílné části nádrže (Sedá a kol., 2007b; Petrusek a kol., 2013). V roce 2009 byly na nádrži Želivka nalezeny tři taxony perlooček (*D. longispina*, *D. galeata* a jejich hybridy *D. longispina* a *D. galeata*) a v roce 2010 byly nalezeny čtyři taxony (oproti předchozímu roku se navíc vyskytovaly perloočky *D. cucullata*). Jednotlivé taxony měly po oba dva roky v přehradní nádrži podobné lokality výskytu. V přítoku byly v roce 2010 nalezeny perloočky *D. cucullata* a *D. galeata*, kterých od přítoku směrem ke hrázi ubývalo. Naopak hybridy perlooček *D. galeata* a *D. longispina* a samotné perloočky *D. longispina* se vyskytovaly až blíže ke hrázi. Nejvyšší lokalitou, kde se hybridy *D. galeata* a *D. longispina* vyskytli, byla po oba dva roky lokalita Zahrádky, která se nachází až nad středem nádrže. Samotný rodičovský druh *D. longispina* se v obou letech vyskytoval pod touto lokalitou. Dominantní výskyt tohoto druhu byl až na lokalitách Hráz a Most, a to především v oblasti metalimnia. Výskyt rodičovských druhů se až na perloočky *D. cucullata*, které se jeden rok vůbec nevyskytovaly, ukázal jako poměrně stálý.

Tento nenáhodný výskyt perlooček komplexu *Daphnia longispina* můžeme pozorovat na mnoha českých nádržích (Sedá a kol., 2007a; Petrusek a kol., 2008a; Ruthová, 2008; Horová, 2009). V naprosté většině nádrží nalézáme druh *D. galeata* který se vyskytuje na většině lokalit nádrží. Na lokalitách v přítoku se mnohdy vyskytuje *D. cucullata* a na opačném konci nádrží *D. longispina*. Ne vždy se musí vyskytnout. To, zda se opravdu vyskytují, zřejmě záleží na intenzitě gradientu, zda dochází k dostatečnému rozrůznění podmínek v jednotlivých částech nádrže (Ruthová, 2008). Je známo i několik nádrží, kde tento model distribuce druhů neplatil. Jednalo se například o nádrže Seč, kde u hráze byl zaznamenán výskyt *D. cucullata* (Sedá a kol., 2007b), a nádrž Žlutice, kde byl naopak nalezen druh *D. longispina* v přítoku (Horová, 2009).

Důvodů, proč se *D. cucullata* vyskytuje v přítocích jen občas, může být několik. Jednou z možností je, že většina perlooček v přítoku se na jaře objevuje líhnutím z efipií. Těch se v přítocích vyskytuje podstatně méně než například u hráze (Vaníčková a kol., 2010). Zároveň je oblast přítoku pro uchování efipií méně stabilní v podmínkách než například v oblasti hráze. Oblast přítoku může totiž být ovlivněna určitými vlivy, které mohou poškodit vaječnou banku nacházející se na dně. Jedním z těchto vlivů může být kolísající výška hladiny, kterou mohou způsobovat například déletrvající sucha. *D. cucullata* navíc v práci Horové (2009)

vykazovala poměrně značnou sezónnost. Vyskytovala se především v letních vzorcích a s nastupujícím obdobím horších podmínek mizela. V podzimních vzorcích již nebyla mnohdy vůbec zaznamenána. To by mohlo nasvědčovat tomu, že jarní populace těchto perlooček opravdu pochází z efipií, a ne z přezimujících jedinců. Perloočky *D. galeata* a *D. longispina* mají rovněž účinnější filtrační systém než *D. cucullata*, a tak je možné, že v období podzimního míchání jsou tyto perloočky konkurenčně vyloučeny (dochází ke změně potravní nabídky a obecně je potravy pro perloočky méně). Přezimovat by jich ve vodním sloupci mohlo výrazně méně než konkurenčních druhů (Gliwicz, 1990; Horová 2009). V práci Horové (2009) se ukázalo, že podobný podzimní úbytek, jako měly perloočky *D. cucullata*, byl zaznamenán i u jejich hybridů s *D. galeata*. Zároveň je také možné, že v době jarního líhnutí se již v oblasti přítoku vyskytují perloočky *D. galeata*, které se do přítoku mohly dostat ze střední části nádrže. Navíc jsou účinnějšími filtrátory, takže mohou vyvíjet značný kompetiční tlak na *D. cucullata*.

Dále byli v Želivce po oba dva roky nalezeni hybridi *D. galeata* a *D. longispina*. Vyskytovali se především ve střední a spodní části nádrže, tedy mezi oblastí s dominantním výskytem perlooček *D. galeata* a v oblasti výskytu perlooček *D. longispina*. Tento výskyt hybridů podporuje domněnku, že přítomnost podélných environmentálních gradientů v přehradní korytovité nádrži pravděpodobně mohla zlepšit podmínky pro výskyt hybridů. Mezidruhová hybridi většinou dokážou využít výhodných vlastností jednotlivých rodičovských druhů a mohou je nejlépe uplatnit v podmínkách, které už nejsou plně optimální pro rodičovský druh. Může také docházet k rozdílné preferenci hloubek mezi rodičovskými druhy a jejich hybridy (Spaak a Hoekstra, 1995; Schwenk a Spaak, 1995). Zpravidla je tedy můžeme v přehradních nádržích najít na překryvu dvou oblastí dominantního výskytu jednotlivých rodičovských druhů (Petrušek a kol., 2008a; Sedá a kol., 2007a).

Hybridy perlooček *D. cucullata* a *D. galeata* nebyli ani jeden rok nalezeni. Důvodů, proč tomu tak bylo, může být více. Jedním z možných vysvětlení by mohla být malá úspěšnost při křížení rodičovských druhů. To se ukázalo při laboratorním experimentálním křížením *D. galeata* a *D. cucullata*, při kterém se zjistilo, že úspěšnost křížení je nízká (Schwenk a kol., 2001). Další možností je, že přežívání hybridů *D. galeata* a *D. cucullata* v období zhoršených podmínek je podstatně menší než u hybridů *D. galeata* a *D. longispina*. Ve spodní části

nádrže je totiž možné, že hybridní perloočky v zimním období přezimují poblíž dna, což v přítoku s nedostatečnou hloubkou nemusí být možné (Sedá a Macháček, 1998). Každý rok by se zpět do vodního sloupce (po skončení nepříznivých podmínek) mohly dostat pouze z vaječné banky (efipia, která přezimují na dně nádrže), či novou hybridizační událostí.

V práci Horové (2009), která byla vypracována na základě dat z devíti českých korytovitých nádrží, se rovněž ukázalo, že hybridi *D. galeata* a *D. cucullata* se často vůbec v nádržích nevyskytují, nebo se vyskytují mnohem méně, než *D. galeata* a *D. longispina*. Nicméně to uspokojivě nevysvětluje fakt, proč se hybridi *D. galeata* a *D. cucullata* na některých jiných českých nádržích vyskytují, a na Želivce ne. Hybridi *D. galeata* a *D. cucullata* v nádrži Želivka nebyli nalezeni ani v dřívějších studiích na přehradní nádrži Želivka (Petrušek a kol., 2008a; Sedá a kol., 2007a). Stejně jako hybridi *D. galeata* a *D. cucullata* nebyli v těchto pracích nalezeni ani hybridi *D. longispina* a *D. cucullata*. U nich je to ale pravděpodobně z jiného důvodu. Rodičovské druhy totiž preferují odlišné environmentální podmínky, a tak se vyskytují na opačných koncích nádrže. Vzniká tak ekologicky podmíněná prostorová bariéra, v jejímž důsledku nedochází ke kontaktu rodičovských druhů, a tak je i nepravděpodobné, že by mohlo dojít k hybridizaci (Petrušek a kol., 2008a).

Jak jsem již jednou zmínil, dominantní výskyt větších druhů perlooček v oblasti hráze je pravděpodobně dán jejich vyšší filtrační účinností a nižším selekčním predančním tlakem ze strany ryb (Gliwicz, 1986; Gliwicz 1990, Gliwicz 2003; Prchalová a kol., 2008; Vašek a kol., 2004). Malé druhy jako *D. cucullata* a jejich hybridy jsou proto v oblastech dolní části nádrže zřejmě kompetičně vyloučeny. Zajímavé je ale to, že velké perloočky jako *D. longispina* a jejich hybridy jsou v důsledku selektivního predančního tlaku znevýhodněny nejen v oblasti přítoku. Na vertikálním profilu z let 2009 a 2010 z oblasti hráze a z roku 2009 z oblasti mostu (obr. 7) je vidět že v epilimniu dominuje především menší druh *D. galeata* a až v metalimniu se nachází maximum výskytu *D. longispina*, což by mohlo ukazovat na přítomný selekční predanční tlak ze strany ryb (Prchalová a kol., 2009). Podobný výskyt byl již zaznamenán i v ostatních pracích věnujících se struktuře populací přehradních perlooček (Petrušek a kol., 2008a; Sedá a kol., 2007a; Ruthová, 2008; Horová, 2009).

Výskyt F2 hybridů a zpětných kříženců v porovnání s pracemi Ruthové (2008) a Yina a kol. (2012a), které využívaly v přehradních nádržích (Vír, Vranov, Stanovice) mikrosatelitových markerů, a proto jsou jejich výsledky srovnatelné, byl naprosto zanedbatelný. V mé práci se podařilo identifikovat pouze jednoho zpětného křížence. Při snížení kritéria pro určení taxonu, respektive hybridní kategorie, na základě posteriorní pravděpodobnosti z programu NewHybrids z 95% na 80% byl určen ještě jeden potenciální zpětný kříženec. V obou případech se jednalo o zpětného křížence rodičovského druhu *D. galeata* a křížence *D. galeata* x *D. longispina* v roce 2009 na lokalitách Střed a Most epilimnion. Oproti tomu v obou zmiňovaných pracích bylo nalezeno více zpětných kříženců i F2 hybridů (zpětní kříženci v práci Yina a kol. (2012a) představovali 3.1 % a v práci Ruthové (2008) na nádrži Vranov představovali zpětní kříženci na lokalitě hráz - epilimnion až 19 %). Možný výskyt F2 hybridů a zpětných kříženců je zřejmě ovlivněn dalšími faktory. Již několikrát se ukázalo, že ve stejných environmentálních podmínkách ve stejném vodním útvaru v následujících sezónách nemusí být stejný výskyt taxonů. Ve stejných podmínkách byla zaznamenána koexistence několika taxonů i dominance jednoho jediného (Yin a kol., 2010, Spaak, 1996). Je tedy pravděpodobné, že výskyt zmiňovaných F2 hybridů a zpětných kříženců je podmíněn i konkrétní lokalitou a konkrétní genetickou strukturou potenciálních rodičovských populací.

Díky použité metodě mikrosatelitových markerů bylo možné sledovat změny nejen v taxonomickém složení perlooček komplexu *Daphnia longispina*, ale i v klonálním složení a diverzitě na velmi podrobném prostorovém měřítku. Největší MLG bohatost se u mých vzorků vyskytovala po oba dva roky na lokalitách Vojslavice a Přítok, tedy u dvou nejvýše položených odběrných lokalit. Na dalších lokalitách byla MLG bohatost různá. Největší multilokusovou bohatost vztahenou k počtu jedinců jednoho taxonu měly perloočky *D. cucullata*, které měly MLG/N 0.965, což značně převyšuje průměrnou bohatost všech druhů po oba dva roky (MLG/N 0.735 - vypočteno jako průměr všech taxonů za oba dva roky). Průměrná bohatost perlooček *D. cucullata* byla vyšší oproti ostatním druhům i v porovnání s pracemi Ruthové (2008) a Yina a kol. (2012a). Naopak nejmenší genotypickou bohatost měli hybridní *D. galeata* a *D. longispina* v roce 2010, a to pouhých 0.448.

Vysoká genotypická bohatost perlooček *D. cucullata* naznačuje možnost, že tyto perloočky přežívají období nepříznivých podmínek především ve formě efiptií (Vaníčková a

kol., 2010). Pokud by tyto perloočky preferovaly větší (či dominantní) podíl dormantních, a tudíž sexuálním rozmnožováním vzniklých stadií na obnovení populace, vysvětlovalo by to do značné míry jejich vysokou genotypickou bohatost. Nasvědčuje tomu i fakt, že tyto perloočky se v práci Horové (2009) v podzimních vzorcích příliš nevyskytovaly. Vykazovaly tak sezónní dynamiku, kdy jejich častější výskyt byl zaznamenán v letních měsících oproti podzimu. Naopak hybridy *D. galeata* a *D. longispina* pravděpodobně mohou přečkávat nepříznivé podmínky v hlubších částech přehradní nádrže. Mohla by tomu nasvědčovat i jejich nízká genotypická bohatost.

Při porovnání klonální diverzity pomocí multilokusových genotypů (MLG) se ukázalo, že průměrná genotypická bohatost celé populace je 0.735. V porovnání s prací Ruthové (2008) je tato bohatost nepatrně menší. Největší podíl na tomto rozdílu v mé práci mají hybridy perlooček *D. galeata* a *D. longispina* z roku 2010, jejichž genotypická bohatost je oproti rodičovským druhům podstatně menší. Podobný rozdíl v bohatosti MLG mezi rodičovskými druhy a jejich hybridy se vyskytuje i v práci Yina a kol. (2012a, 2010), kde rovněž hybridy mají menší klonální diverzitu než rodičovské druhy vyskytující se na stejném místě. Je to pravděpodobně zapříčiněno tím, že úspěšnost líhnutí hybridů je podstatně menší než rodičovských druhů. Už samotná hybridizace je pravděpodobně méně úspěšná než sexuální rozmnožování rodičovských druhů (Schwenk a spol., 2001). V práci Keller a kol. (2007) bylo nalezeno značné množství prázdných efipií, které přisuzovali právě hybridům. Podíl sexuálně vzniklých hybridů bude pravděpodobně oproti rodičovským druhům tedy menší.

Jedním z nových pozorování bylo i srovnání klonální diverzity v čase a prostoru. Naprostá většina genotypů se vyskytovala pouze jednou na jedné lokalitě po jednu sezónu. Bylo ale objeveno i několik klonů, které se vyskytovaly nejenom na více lokalitách, ale vyskytovaly se i po obě dvě sezóny. Dokonce byly objeveny dva genotypy, které se vyskytovaly téměř v celé nádrži. Zajímavé bylo, že v roce 2009 nebyl ani jeden z těchto genotypů objeven. Důvodů, proč tomu tak bylo, může být několik. Pravděpodobně se v roce 2009 jednalo o poměrně vzácné klony, u kterých se nepodařilo ani poměrně hustým vzorkováním zachytit jejich lokalitu výskytu, případně byla jejich početnost natolik nízká, že byly pod limitem detekce. Ačkoliv tyto klony nebyly v roce 2009 zaznamenány, je pravděpodobné, že se již v tomto roce

vyskytovaly a oproti ostatním klonům měly zřejmě určité výhody a dokázaly se po přezimování oproti ostatním značně rozšířit.

Na Římovské přehradě byly ve studii Sedi a kol. (2007b) nalezeny dvě odlišné linie perlooček *D. galeata*. Jedna z nich se v období letní stratifikace vyskytovala v poměrně nepříznivých podmínkách hypolimnia, kdežto většina perlooček preferovala epilimnion. Perloočky z oblasti hypolimnia byly však lépe adaptovány na období nepříznivých podmínek a měly tak větší šanci na přežití, než letní úspěšnější linie. Na jaře pak mohly snáze znovuosídlit nádrž, než druhá linie. V práci Yina a kol. (2012a) můžeme podobně jako u mých výsledků nalézt klony, které se vyskytují opakovaně či na většině lokalit.

V roce 2009 bylo zaznamenáno několik klonů, které byly velmi početné, ale v další sezóně nebyly vůbec zaznamenány. Obecně se tedy nedá říci, že nejpočetnější klony jednoho roku se budou s jistotou vyskytovat i v následujících letech. Je to možná proto, že tento nejúspěšnější klon byl nejlépe přizpůsoben aktuálním podmínkám v nádrži, což v mém případě představovalo období letní stratifikace. Naopak méně úspěšné klony mohly být úspěšnější v podmínkách s nedostatkem potravy, které se vyskytují především v zimním období (Seda a kol., 2007b; Yin a kol., 2010). Takových se v mých vzorcích vyskytovalo hned několik. Podobný úbytek dominantních klonů byl zaznamenán i v práci Yin a kol. (2012a), avšak jeho pozorování zahrnovalo pouze jednu sezónu. Existence klonů, které jsou v době letní stratifikace vzácné a jsou přizpůsobeny horším podmínkám, se zřejmě ukázala už ve studii Sedi a kol. (2007b), kde byly objeveny klony *D. galeata*, které se nevyskytovaly typicky v epilimniu, ale naopak hlouběji v nádrži. Tyto klony by tak mohly lépe přežít období zhoršených podmínek s nedostatkem potravy. Úspěšnost těchto klonů by pak mohla být v následujícím období podstatně větší, protože by jich už na začátku sezóny bylo více než těch, které se líhnou z efiipií, a dále by se pak rozmnožovaly partenogeneticky.

Se svými genotypy jsem rovněž porovnával dva stejné klony s divergentní mitochondriální DNA. Tyto klony se totiž výrazně lišily svou mitochondriální DNA od zbylých perlooček nalezených v Želivce. Jedním z možných vysvětlení, proč se tyto klony od ostatních lišily právě na základě mitochondriální DNA, byla i možnost, že by se jednalo o kryptické druhy. Ve

střední a severovýchodní Evropě bylo totiž objeveno několik případů, které této hypotéze nasvědčují (Petrušek a kol., 2012).

Klony (ačkoliv byly odebrané ze stejné nádrže ve stejný rok) se od mých vzorků opravdu lišily. Na rozdíl od jmenované studie jsem však neměl údaje o mitochondriální DNA mých vzorků. Dovezené klony obsahovaly dvě unikátní alely, které se v mých vzorcích nevyskytovaly. Samotné klony byly pomocí NewHybrids spolehlivě určeny jako *D. longispina*. Jedním z možných vysvětlení, proč klony od Anne Thielsch nebyly v mých vzorcích objeveny, je ten, že se jednalo o málo zastoupený klon v přehradní nádrži. Při odběru většího množství perlooček a jejich následném transportu do Německa (vzorky byly transportovány živé), mohlo dojít během cesty rovněž k určité selekci. Během transportu totiž nemohly být technicky zajištěny identické podmínky, jako se vyskytují v přehradní nádrži, a tak se mohly vyselektovat klony, které transport zvládly oproti některým jiným klonům lépe. Pravděpodobnost nalezení nového „vzácného“ klonu pak mohla značně vzrůst.

Ukázalo se tedy, že v přehradních nádržích korytovitého tvaru můžeme nalézt mnoho environmentálních gradientů, které významně ovlivňují distribuci zooplanktonu a perlooček komplexu *Daphnia longispina*. Jako nejvýznamnější se ukazují již zmiňované gradienty rybí predace a množství potravy. Nejvíce planktivorních ryb nacházíme v oblasti přítoku, kde se rovněž vyskytuje největší množství potravy (Prchalová a kol., 2009; Vašek a kol., 2004). Je zde proto značný selekční tlak na velikost perlooček. Proto se právě v přítoku vyskytovaly perloočky *D. cucullata*, které nejlépe ze jmenovaných odolávají rybí predaci (Spaak a Boersma, 2006). Naopak na opačném konci přehradní nádrže nacházíme oblasti s daleko menším predačním tlakem, ale také daleko menším množstvím potravy. Výskyt jednotlivých druhů perlooček je ovlivněn environmentálními gradienty a samotný výskyt odpovídá ekologickým nárokům nejenom jednotlivých druhů, jejich hybridů (Gliwicz 1990), ale i jednotlivých klonů těchto perlooček (Yin a kol., 2012a; Petrušek a kol., 2013). Podobná distribuce perlooček byla nalezena i v několika dalších pracích například Petruska a kol. (2008a), Sedi a kol. (2007a) a Ruthové (2008).

Závěr

V mé práci se potvrdil nenáhodný výskyt jednotlivých druhů perlooček komplexu *Daphnia longispina*, které preferovaly v přehradní nádrži rozdílné oblasti. V přítokové oblasti byly v roce 2010 nalezeny perloočky *D. cucullata*, kterých od přítoku rychle ubývalo, a naopak přibývalo perlooček *D. galeata*, kterých se vyskytovalo nejvíce kolem středu nádrže. V roce 2010 byly tyto perloočky dominantním druhem i v přítoku. Perloočky *D. longispina* preferovaly spíše hlubší oblasti nádrže a vyskytovaly se až v okolí hráze v hlubších vrstvách metalimnia. Hybridi perlooček *D. galeata* a *D. longispina* preferovali oblast mezi dominantním výskytem svých rodičovských druhů. Výskyt jednotlivých taxonů byl v meziročním porovnání relativně stálý, ale *D. cucullata* v roce 2009 v přehradní nádrži Želivka nebyla vůbec zaznamenána. Environmentální gradienty ale zřejmě ovlivňují nejenom samotné druhy a jejich hybridy, ale i klonální strukturu v nádržích. Klonální diverzita mezidruhových hybridů byla podstatně menší, než jejich rodičovských druhů. To by mohlo znamenat, že existují reprodukční bariéry mezi rodičovskými genomy. Distribuce jednotlivých klonů se ukázala jako značně heterogenní, a to jak v prostorovém, tak časovém měřítku. Naprostá většina analyzovaných klonů byla unikátní a vyskytovala se jen v jednom exempláři na jedné lokalitě. Bylo ale objeveno i několik klonů, které měly opakovaný výskyt, a to buď na více lokalitách, nebo i mezi jednotlivými sezónami. Výskyt stejných klonů mezi jednotlivými sezónami by mohl naznačovat, že tyto klony jsou schopné přežít období horších podmínek v hypolimniu nádrže a na jaře se snáze vyskytnou na lokalitách, kde se vyskytovaly předchozí sezónu. Překvapivě nejčastěji se vyskytující klony byly objeveny pouze v jednom roce. Tyto klony byly většinou nalezeny na většině odběrných stanovišť. Je však možné, že v prvním roce se vyskytovaly na jiných lokalitách nebo jich bylo tak málo, že byly pod detekčním limitem. Nově objevená divergentní mitochondriální linie nebyla mezi mnou analyzovanými jedinci vůbec nalezena.

Seznam citované literatury

- Adamowicz, S. J., Petrusek, A., Colbourne, J. K., Hebert, P. D. N. a Witt, J. D. S. (2009). The scale of divergence: a phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus. *Molecular Phylogenetics and evolution*, 50, 423–36
- Anderson, E. C. a Thompson, E. a. (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160, 1217–29.
- Arnold, M. (1992). Natural Hybridization as an Evolutionary Process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23, 237–261
- Arnold, M. L. (1997). Natural hybridization: Definitions and history. In: Natural Hybridization and Evolution. *Oxford University Press*, 3-11
- Arnold, M. L., Kentner, E. K., Johnston, J. A., Cornman, S. a Bouck, A. C. (2001). Natural Hybridisation and Fitness. *Taxon*, 50, 93
- Barton, N. H. (1979). The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, 43, 341–359
- Barton, N. H. (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10, 551–568
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. a Bonhomme F. (1996-2004), GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Brede, N., Thielsch, a., Sandrock, C., Spaak, P., Keller, B., Streit, B., & Schwenk, K. (2006). Microsatellite markers for European Daphnia. *Molecular Ecology Notes*, 6, 536–539.
- Brendonck, L. a De Meester, L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491, 65–84
- Broža, V., Satrapa, L., Sakař, K., Bláha, J., Báča, V., Vít, P., Maníček, J., Bíza, P., Jílek, M. a Vinklát, P. D. (2005): Přehrady Čech, Moravy a Slezska. *Knihy 555*, 256 s.
- Caputo, L., Naselli-Flores, L., Ordonez, J. a Armengol, J. (2008). Phytoplankton distribution along trophic gradients within and among reservoirs in Catalonia (Spain). *Freshwater Biology*, 53, 2543-2556
- Cáceres, C. E. (1998). Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of Daphnia diapausing eggs. *Ecology*, 79, 1699–1710
- Colbourne, J. K., Singan, V. R. a Gilbert, D. G. (2005). wFleaBase: the Daphnia genome database. *BMC Bioinformatics*, 6, 45
- Decaestecker, E., De Meester, L. a Mergeay, J. (2009). Cyclical Parthenogenesis in Daphnia: Sexual Versus Asexual Reproduction. In: Schön, I., Martens, K. a Dijk, P. (ed.): Lost sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis. *Springer*, 295-316
- De Meester, L. a Weider, L. (1999). Depth selection behavior, fish kairomones, and the life-histories of Daphnia hyalina X galeata hybrid clones. *Limnology and Oceanography*, 44, 1248–1258

- Dlouhá, Š., Thielsch, A., Kraus, R. H. S., Seda, J., Schwenk, K. a Petrusek, A. (2010). Identifying hybridizing taxa within the *Daphnia longispina* species complex: a comparison of genetic methods and phenotypic approaches. *Hydrobiologia*, 643, 107–122
- Duffy, M. a Hall, S. R. (2008). Selective predation and rapid evolution can jointly dampen effects of virulent parasites on *Daphnia* populations. *The American Naturalist*, 171, 499–510
- Gasol, J. M., Comerma, M., Garcia, J. C., Armengol, J., Casamayor, E. O., Kojecka, P. a Šimek, K. (2002). A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography*, 47, 62-77
- GeneMapper (2005).
http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/Information_Sheets/Genotype/GeneMapper_Microsatellite_Guide.PDF
- Gido, K. B., Hargrave, C. W., Matthews, W. J., Schnell, G. D., Pogue, D. W. a Sewell, G. W. (2002). Structure of littoral-zone fish communities in relation to habitat, physical, and chemical gradients in a southern reservoir. *Environmental Biology of Fishes*, 63, 253-263
- Gliwicz, Z. M. (1986). Predation and the evolution of vertical migration in zooplankton. *Nature*, 320, 746-748
- Gliwicz, Z. M. (1990). Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature*, 638, 638 - 640
- Gliwicz, Z.M. (2003). Between hazards of starvation and risk of predation : the ecology of offshore animals. *International Ecology Institute*, 379
- Hamrová, E., Mergeay, J. a Petrusek, A. (2011). Strong differences in the clonal variation of two *Daphnia* species from mountain lakes affected by overwintering strategy. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 231
- *Harrison, R. G. (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Survey of Evolutionary Biology*, 7, 69-128.
- Hebert, P. D. N. (1985). Interspecific Hybridization Between Cyclic Parthenogens. *Evolution*, 39, 216–220
- Hebert, P. D. N. (1987). Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately. *Experientia Supplementum*, 55, 175-95
- Hejzlar, J. a Vyhnálek, V. (1998). Longitudinal heterogeneity of phosphorus and phytoplankton concentrations in deep-valley reservoirs. *International Review of Hydrobiology* 83, 139-146
- Hobaek, A. a Larsson, P. (1990). Sex Determination in *Daphnia Magna*. *Ecology*, 71, 2255
- Horová, B. (2009). Sezónní dynamika výskytu druhů a hybridů komplexu *Daphnia longispina* v korytovitých nádržích. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 45 s.
- Howard, J. D. (1986). A Zone of Overlap and Hybridization Between Two Ground Cricket Species. *Evolution*, 40, 34–43
- Keller, B., Wolinska, J., Tellenbach, C. a Spaak, P. (2007). Reproductive isolation keeps hybridizing *Daphnia* species distinct. *Limnology and Oceanography*, 52, 984–991

- Lampert, W. (1989). The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton. *Functional Ecology* 3, 21-27
- Lampert, W. (2006). Daphnia: Model Herbivore , Predator and Prey. *Polish Journal of Ecology*, 54, 607–620.
- Lampert, W. a Sommer, U. (2007). Limnoecology: The ecology of lakes and streams. *Oxford University Press*. 324
- Levin, D., Francisco-Ortega, J. a Jansen, R. K. (1996). Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species. *Conservation Biology*, 10, 10–16
- Longhi, M. L. a Beisner, B. E. (2009). Environmental factors controlling the vertical distribution of phytoplankton in lakes. *Journal of Plankton Research*, 31, 1195-1207
- Macháček, J. a Sed'a, J. (2006). Life history response of Daphnia galeata to heterogeneous conditions within a reservoir as determined in a cross-designed laboratory experiment. *Aquatic Ecology*, 41, 55–66
- Macháček, J., Vaníčková, I., Seda, J., Cordellier, M. a Schwenk, K. (2012). Sexual reproduction of Daphnia in a deep temperate reservoir: the phenology and genetics of male formation. *Hydrobiologia*, 715, 113-123
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–37
- Moore, W. S. (1977). An Evaluation of Narrow Hybrid Zones in Vertebrates. *The Quarterly Review of Biology*, 52, 263–277
- Parent, G. J., Plourde, S. a Turgeon, J. (2012). Natural hybridization between Calanus finmarchicus and C. glacialis (Copepoda) in the Arctic and Northwest Atlantic. *Limnology and Oceanography*, 57, 1057–1066
- Peakall, R. a Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539
- Petrusek, A., Sed'a, J., Macháček, J., Ruthová, S. a Smilauer, P. (2008a). Daphnia hybridization along ecological gradients in pelagic environments: the potential for the presence of hybrid zones in plankton. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 363, 2931-2941
- Petrusek, A., Hobaek, A., Nilssen, J. P., Skage, M., Černý, M., Brede, N. a Schwenk, K. (2008b). A taxonomic reappraisal of the European Daphnia longispina complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta*, 37, 507–519
- Petrusek, A., Thielsch, A. a Schwenk, K. (2012). Mitochondrial sequence variation suggests extensive cryptic diversity within the Western Palaearctic Daphnia longispina complex. *Limnology and Oceanography*, 57, 1838–1845
- Petrusek, A., Seda, J., Macháček, J., Říha, M., Prchalová, M. a Schwenk, K. (2013). Intraspecific spatial genetic differentiation of a Daphnia species within a long narrow reservoir. *Hydrobiologia*, 715, 169–180
- Povodí Vltavy, <http://www.pvl.cz/files/download/vodohospodarske-informace/vodni-dila-a-nadrze/svihov.pdf>

- Prchalová, M., Kubečka, J., Vašek, M., Peterka, J., Sed'a, J., Jůza, T., Říha, M., Jarolím, O., Tušer, M., Kratochvíl, M., Čech, M., Draštík, V., Frouzová, J. a Hohausová, E. (2008). Distribution patterns of fishes in a canyon-shaped reservoir. *Journal of Fish Biology*, 73, 54-78
- Prchalová, M., Kubečka, J., Čech, M., Frouzová, J., Draštík, V., Hohausová, E., Jůza, T., Kratochvíl, M., Matěna, J., Peterka, J., Říha, M., Tušer, M. a Vašek, M. (2009). The effect of depth, distance from dam and habitat on spatial distribution of fish in an artificial reservoir. *Ecology of Freshwater Fish*, 18, 247-260
- Rahel, F. J. a Nutzman, J. W. (1994). Foraging in a lethal environment - fish predation in hypoxic waters of a stratified lake. *Ecology*, 75, 1246-1253
- Ruthová, Š. (2008). Daphnia hybridization in canyon-shaped reservoirs. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 60 s.
- Schwenk, K. a Spaak, P. (1995). Evolutionary and ecological consequences of interspecific hybridization in cladocerans. *Experientia*, 51, 465-481
- 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., Posada, D. a Hebert, P. D. (2000). Molecular systematics of European Hyalodaphnia: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 267, 1833-42
- Schwenk, K., Bijl, M. a Menken, S. B. J. (2001). Experimental interspecific hybridization in Daphnia. *Hydrobiologia*, 442, 67-73
- Schwenk, K., Brede, N. a Streit, B. (2008). Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363, 2805-11
- Sed'a, J. a Macháček, J. (1998). The effect of flow-through regimes on zooplankton densities in a canyon-shaped dam reservoir. *International Review of Hydrobiology*, 83, 477 - 484
- Sed'a, J., Petrusek, A., Macháček, J. a Smilauer, P. (2007a). Spatial distribution of the Daphnia longispina species complex and other planktonic crustaceans in the heterogeneous environment of canyon-shaped reservoirs. *Journal of Plankton Research* 29, 619-628
- Sed'a, J., Kolarova, K., Petrusek, A. a Machacek, J. (2007b). Daphnia galeata in the deep hypolimnion: spatial differentiation of a "typical epilimnetic" species. *Hydrobiologia*, 594, 47-57
- Sed'a, J. a Petrusek, A. (2011). Daphnia as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks. *Journal of Limnology*, 70, 337-344
- Sloff, C.J (1997). Modelling reservoir sedimentation processes for sediment management studies. Proc. conf: "Hydropower into the next century", *Aqua Media Int*, 513-52
- Slusarczyk, M. (2009). Extended lifespan traded for diapause in Daphnia. *Freshwater Biology*, 54, 2252-2262
- Spaak, P. a Hoekstra, R. O. B. (1995). Life History Variation and the Coexistence of a Daphnia Hybrid With Its Parental Species. *Ecology*, 76, 553-564

- Spaak, P. (1996). Temporal changes in the genetic structure of the *Daphnia* species complex in Tjeukemeer, with evidence for backcrossing. *Heredity*, 76, 539–548.
- Spaak, P. a Boersma, M. (2006). Predator mediated coexistence of hybrid and parental *Daphnia* taxa. *Archiv für Hydrobiologie*, 167, 55–76
- *Stace, C. A. (1987). Hybridization and the plant species. In: Differentiation Patterns in Higher Plants, *Academic Press*, 115-127
- Stodola, J. (2010). Environmentální gradienty v korytovitých přehradních nádržích, Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 33 s.
- Straškraba, M. (1998). Limnological differences between deep valley reservoirs and deep lakes. *International Review of Hydrobiology*, 83, 1-12
- Straškraba, M. a Tundisi, J. G. (1999). Reservoir Ecosystem Functioning: Theory and Application. *Theoretical Reservoir Ecology and Its Applications*, 565-597
- Stratton, M. A. a Kesler, D. H. (2007). The Role of Light and Oxygen in *Chaoborus punctipennis* (Insecta: Diptera) Diel Vertical Migration. *Journal of Freshwater Ecology*, 22, 101–106
- Thielsch, A., Brede, N., Petrušek, A., de Meester, L. a Schwenk, K. (2009). Contribution of cyclic parthenogenesis and colonization history to population structure in *Daphnia*. *Molecular Ecology*, 18, 1616–28.
- *Thornton, K.W., Kimmel, B.L. a Payne, F.E. (1990). Reservoir limnology: Ecological Perspectives. *Wiley*, 246
- Vaničková, I., Sedá, J. a Petrušek, A. (2010). The stabilizing effect of resting egg banks of the *Daphnia longispina* species complex for longitudinal taxon heterogeneity in long and narrow reservoirs. *Hydrobiologia*, 643, 85-95
- Vašek, M., Kubečka, J., Peterka, J., Čech, M., Draščík, V., Hladík, M., Prchalová, M. a Frouzová, J. (2004). Longitudinal and Vertical Spatial Gradients in the Distribution of Fish within a Canyon-shaped Reservoir. *International Review of Hydrobiology*, 89, 352–362.
- Weber, A. a Vesela, S. (2002). Optimising survival under predation: chemical cues modify curvature in *Daphnia galeata*. *Aquatic Ecology*, 36, 519–527
- Weider, L. J. (1992). Spatial and temporal heterogeneity of *Daphnia* intra- and interspecific comparisons in Lake Constance ; *Limnology and Oceanography*, 37, 1327–1334
- Wolinska, J., Seda, J., Koerner, H., Smilauer, P. a Petrušek, A. (2011). Spatial variation of *Daphnia* parasite load within individual water bodies. *Journal of Plankton Research*, 33, 1284–1294
- Yin, M., Wolinska, J. a Gießler, S. (2010). Clonal diversity, clonal persistence and rapid taxon replacement in natural populations of species and hybrids of the *Daphnia longispina* complex. *Molecular Ecology*, 19, 4168–4178
- Yin, M., Petrušek, A., Seda, J. a Wolinska, J. (2012a). Fine-scale temporal and spatial variation of taxon and clonal structure in the *Daphnia longispina* hybrid complex in heterogeneous environments. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 12
- Yin, M., Petrušek, A., Seda, J. a Wolinska, J. (2012b). Fine-scale genetic analysis of *Daphnia* host populations infected by two virulent parasites - strong fluctuations in clonal

structure at small temporal and spatial scales. *International Journal for Parasitology*, 42, 115–21

Zeis, B., Horn, W., Gigengack, U., Koch, M. a Paul, R. J. (2010). A major shift in *Daphnia* genetic structure after the first ice-free winter in a German reservoir. *Freshwater Biology*, 55, 2296–2304

* Jedná se o sekundární citaci

Přílohy

Příloha č. 1

Lokalita

2009	<i>D. longispina</i>	<i>D. galeata</i>	F1 hybridy	<i>D. cuculata</i>	Zpětní kříženci
Hráz epi.	3	29	19	0	0
Hráz meta.	33	5	7	0	0
Hráz hypo.	15	12	9	0	0
Most epi.	3	20	20	0	1
Most meta.	36	3	4	0	0
Most hypo	24	7	15	0	0
Střed	1	31	9	0	0
Zahrádky	0	25	1	0	0
Vojslavice	0	27	0	0	0
Přítok	0	41	0	0	0

2010	<i>D. longispina</i>	<i>D. galeata</i>	F1 hybridy	<i>D. cuculata</i>	Zpětní kříženci
Hráz epi.	14	9	21	0	0
Hráz meta.	34	0	14	0	0
Hráz hypo.	6	3	24	0	0
Most	12	6	27	0	0
Střed	0	37	6	0	0
Zahrádky	0	42	5	2	0
Vojslavice	0	30	0	2	0
Přítok	0	20	0	26	0

Počet jedinců na dané lokalitě

Počet jedinců daného taxonu vyskytující se v jednotlivých sezónách na jednotlivých stanovištích.

Příloha č. 2

	2009										2010							
	HE	HM	HH	ME	MM	MH	S	Z	V	P	HE	HM	HH	M	S	Z	V	P
<i>long</i>																		
AAAA	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
GGG	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
HHH	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
JJJ	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-
KKK	0	3	2	0	-	-	-	-	-	-	4	3	1	1	-	-	-	-
LLL	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
MMM	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
NNN	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
OOO	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
PPP	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
QQQ	0	5	-	0	-	-	-	-	-	-	1	0	-	1	-	-	-	-
SSS	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
TTT	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
UUU	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
VVV	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
WWW	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
XXX	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
YYY	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
ZZZ	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>gal</i>																		
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4
AA	1	-	1	-	-	-	3	3	-	-	0	-	-	0	0	0	-	-
B	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BB	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
C	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	0
DD	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	1	-	-	-	6	-	-	-
E	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
EE	0	-	-	1	-	-	0	-	-	-	1	-	-	0	1	-	-	-
F	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
FF	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
G	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
GG	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
H	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	0
II	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-
J	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-
L	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-
M	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
N	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	0	-	0
O	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
P	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-

Q	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	1	1	-	
R	-	-	-	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-	-	0	1	-	
S	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	1	1	-	-	
T	-	-	-	1	-	-	2	0	-	-	-	-	0	2	1	-	-	
U	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	2	1	-	
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	
W	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	0	-	0	0	-	-	
X	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	0	0	
Y	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	
Z	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	3	2	
F1																		
AAA	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	
BBB	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	
CCC	-	-	-	0	0	0	0	0	-	-	-	-	3	2	1	1	-	
DDD	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	
EEE	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	
FFF	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	
JJ	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	
KK	0	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4	-	-	1	-	-	-	
LL	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	
MM	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	
NN	0	0	-	0	-	-	0	0	-	-	3	6	-	1	1	1	-	
OO	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	9	7	-	-	-	
QQ	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	
RR	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	3	4	1	-	-	-	
SS	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	
TT	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	
UU	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	
VV	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	
WW	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	
XX	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	
YY	-	-	-	-	2	1	1	1	-	-	-	-	-	0	0	0	-	
ZZ	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	
cuc																		
HH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	2	

Výskyt jednotlivých klonů na jednotlivých odběrných lokalitách. Kódy v druhé horní lince označují jednotlivé odběrné lokality v jednotlivých rocích. Jsou řazeny zleva od hráze doprava po přítok. Kód HE – Hráz epilimnion, HM – Hráz metalimnion, HH – Hypolimnion, ME – Most epilimnion, MM – Most metalimnion, MH – Most hypolimnion, M – celá lokalita Most v roce 2010, S – Střed, Z – Zahrádky, V – Vojslavice, P – Přítok. V prvním levém sloupci jsou jednotlivé kódy klonů, které se vyskytovaly víckrát. Dále v tomto sloupci jsou barevně odděleny populace s označením *long* pro *D. longispina*, *gal* pro *D. galeata*, F1 pro hybridy *D. galeata* a *D. longispina* a na závěr označení *cuc* pro *D. cuculata*. Symbol 0 označuje lokalitu, kde daný klon byl v minulém / následujícím roce nalezen, - označuje lokalitu, kde klon nebyl ani v jedné sezóně nalezen, číselný údaj označuje počet klonů, které se vyskytovaly na dané lokalitě v daný rok.