

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie**



Diplomová práce

**Mikroparaziti a plodnost perlooček rodu
Daphnia na gradientech v korytovitých přehradních
nádržích**

**Microparasites and fecundity of *Daphnia* at
environmental gradients of canyon-shaped
reservoirs**

Bc. Jana Hubová

Prohlášení:

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

V Praze, 19. 1. 2015

Poděkování:

Na prvním místě bych velmi chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce za dlouholeté vedení během mého studia, za všechny nové znalosti, dovednosti, rady, nervy, příležitosti a pracovní nabídky, které naše spolupráce přinesla. Dále bych chtěla poděkovat odborníkům na perloočky vzatých: RNDr. J. Fottovi a prof. J. Vávrovi za cenné rady a nápady při práci s perloočkami a parazity a za jejich čas, který mi vždy ochotně věnovali. Bez našeho katedrového mága Petra Juračky si zdárný konec své práce ani neokážu představit. Statistické „know how“ by mi zabralo ještě další čtyři roky života. Na mé práci měla značný podíl i Jessica Richardson, které vděčím za hodiny strávené společně v kavárnách nad přepisem dat s několikahodinovou anglickou konverzací v číslech od 0 do 30.

Poděkování si jistě zaslouží i má rodina, která se za ty roky naučila bezpečně rozeznat dafnii Julču, od jakéhokoliv jiného „vodního marasu“ a za to, že mě dokázali v tom mém „nesmyslu“ podporovat a vždy správně vystresovat. Dále jsem vděčná své asistentce, která za mě musela několikrát zvládat vedení malých divochů, taktéž vedení ze ZŠ Jana Masaryka za toleranci a podporu během studia. V neposlední řadě si poděkování zaslouží kamarádi, za předstírané chápavé výrazy nad mou prací, a spolubydlící za pravidelný přísun kávy, energy drinků a sushi, bez kterých bych poslední dva týdny nepřežila.

Foto: dafnie Julča

ABSTRAKT

Původním cílem mé diplomové práce bylo vyšetření fixovaných vzorků perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* z přehradních nádrží Vír a Vranov na přítomnost 4 skupin mikroparazitů: mikrosporidií, oomycetů, prvoka *Caullerya mesnili* a kvasinky *Metschnikowia bicuspidata*, u opakovaných odběrů pak zjištění vlivu parazitů na plodnost perlooček a určení jejich časové a prostorové distribuce v rámci nádrže. Z celkového počtu 4452 vyšetřených samiček perlooček bylo ale nakaženo pouze 56 jedinců. Tento počet nebyl dostačující pro plánované analýzy. Při vyšetřování perlooček jsem také zaznamenávala jejich počet vajíček ve snůšce. Ve výsledkové části diplomové práce se proto zabývám alternativní problematikou – vlivem environmentálních faktorů na plodnost perlooček. Obě zmíněné údolní přehradní nádrže mají charakteristický kaňonovitý profil, který umožňuje vytváření environmentálních gradientů na horizontální a vertikální ose nádrže. Výsledky potvrzují, že vybrané faktory (identita nádrže, sezona a poloha v rámci nádrže resp. potravní nabídka) mají signifikantní vliv na plodnost perlooček.

Během své práce jsem se potýkala s řadou potíží spojených s určováním mikroparazitů u fixovaných vzorků perlooček. Problematikou fixace zooplanktonu se zabývá přílohová část mé diplomové práce, ve které uvádím: ne/výhody fixačních činidel, detailnější popis zdravých a infikovaných perlooček a metodická doporučení pro práci s fixovanými vzorky perlooček za účelem práce s mikroparazity, zejména rozpoznání mikrosporidiální infekce od artefaktů fixace.

Klíčová slova: *Daphnia longispina* komplex, plodnost, mikroparaziti, environmentální gradienty, korytovité přehradní nádrže, fixace zooplanktonu, mikrosporidie.

ABSTRACT

The original aim of my diploma thesis was examination of fixed samples of cladocerans from the *Daphnia longispina* species complex from reservoirs Vír and Vranov for the presence of 4 groups of microparasites: microsporidia, oomycetes, the protozoan *Caullerya mesnili*, and the yeast *Metschnikowia bicuspidata*. The next aim was to determine the effect of parasites on *Daphnia* fecundity, and determination of their spatial and temporal distribution within reservoirs. From the total number 4452 of examined *Daphnia* females, however, only 56 individuals were infected. This number was not sufficient for the planned analyses. As I recorded for all examined individuals the clutch size, I thus dealt to a large extent with an alternative issue: the temporal and spatial variation of, and the influence of environmental factors on *Daphnia* fecundity. Both studied reservoirs are characteristic by canyon-shaped profile that allows formation of environmental gradients on the horizontal as well as vertical axis. The results confirm that reservoir identity, season, and location within the reservoir (or gradient of food supply) have all significant effects on fecundity.

During my work I have encountered difficulties associated with determining microparasites from fixed zooplankton samples. The appendix section of my thesis thus deals also with the issue of fixation of zooplankton, and in particular recognizing microsporidia infection from fixation artifacts. I discuss (dis)advantages of various fixing agents, provide a detailed description of healthy and infected water fleas, and summarize methodological recommendations for working with fixed samples in order to study microparasites.

Key words: *Daphnia longispina* complex, *Daphnia* fecundity, microparasites, environmental gradients, canyon-shaped reservoirs, fixation of zooplankton, microsporidia.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
1 ÚVOD	7
1.1 Cíle práce	9
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Údolní přehradní nádrže	10
2.1.1 Historie, účel výstavby	10
2.1.2 Environmentální gradienty	11
2.1.2.1 Vertikální gradienty	11
2.1.2.2 Horizontální gradienty	15
2.2 Perloočky rodu <i>Daphnia</i> jako modelový organismus	16
2.2.1 Rozmnožování perlooček	17
2.3 Heterogenní distribuce perlooček v rámci jednoho vodního útvaru	19
2.4 Mikroparaziti perlooček rodu <i>Daphnia</i>	22
2.4.1 Studované skupiny mikroparazitů	23
2.4.1.1 Mikrosporidie	23
2.4.1.2 Oomycety	24
2.4.1.3 Kvasinka <i>Metschnikowia bicuspidata</i>	25
2.4.1.4 Prvok <i>Caullerya mesnili</i>	26
2.4.2 Koevoluce v systému perloočka-parazit	27
2.4.3 Vztah parazity k plodnosti a přežívání perlooček	27
2.4.4 Vliv environmentálních faktorů a sezonní dynamika napadení parazity	28
2.4.5 Heterogenní prostorová distribuce mikroparazitů	29
3 METODIKA PRÁCE	32
3.1 Zkoumané přehradní nádrže	32
3.2 Terénní odběry vzorků	34
3.3 Laboratorní určování mikroparazitů	36
3.3.1 Postup při určování mikroparazitů	37
3.3.2 Úskalí a doporučení při určování mikroparazitů	39
3.3.2.1 Prvok <i>Caullerya mesnili</i>	39
3.3.2.2 Oomycety (napadající oblast hlavy perloočky)	39
3.3.2.3 Oomycety (napadající oblast snůšky perloočky)	40
3.3.2.4 Kvasinka <i>Metschnikowia bicuspidata</i>	40
3.3.2.5 Mikrosporidie	41

3.3.3	Fotografování perlooček	41
3.4	Vyhodnocování dat	42
4	VÝSLEDKY PRÁCE	45
5	DISKUZE	54
6	ZÁVĚR	66
7	SEZNAM LITERATURY	67
	PŘÍLOHA I Problémy s určováním mikrosporidiální infekce perlooček rodu <i>Daphnia</i> u fix vzorků...72	
	PŘÍLOHA II Seznam vzorků a naměřené charakteristiky vody..... 92	
	PŘÍLOHA III Vývoj teplotní stratifikace..... 93	
	PŘÍLOHA IV Množství chlorofylu a a celkového fosforu..... 94	
	PŘÍLOHA V Plodnost perlooček na vertikální profilu..... 95	
	PŘÍLOHA VI Výskyt mikroparazitů na přehradní nádrži Želivka..... 96	

1 ÚVOD

Údolní přehradní nádrže představují důležitou zásobárnu stojaté sladké vody v naší krajině. Od jezer se liší řadou morfologických a limnologických vlastností, které jsou dány umělým přehrazením přirozeného říčního toku v dlouhém kaňonovitém údolí. V těchto typech nádrží lze snadno rozdělit zdánlivě homogenní trojrozměrný prostor na vertikální a horizontální složku (Straškraba 1998). Hluboký sloupec vodní masy umožňuje vznik gradientů na vertikální ose nádrže podobně jako v jezerech. Vertikální gradienty ve stratifikovaném vodním sloupci zahrnují: změnu teploty, obsah plynů, živin a intenzitu světla. Horizontální gradienty jsou vyvinuty od přítokové oblasti k hrázi. Přítok je hlavním zdrojem živin pro primární producenty a ovlivňuje změnu v biomase fytoplanktonu, zooplanktonu a následně další členy trofické kaskády (Straškraba 1998; Lampert & Sommer 2007; Prchalová et al. 2008). Environmentální gradienty v přehradních nádržích mohou tedy vodní prostor rozdělit na místa s rozdílnými abiotickými a biotickými vlastnostmi, což následně může ovlivnit distribuci zooplanktonního společenstva (Sed'a et al. 2007a).

Významnou složku zooplanktonu stojatých vod tvoří perloočky rodu *Daphnia*. Řadu evropských nádrží obývá několik druhů perlooček z komplexu *Daphnia longispina*: *Daphnia longispina* (O. F. Müller) (ve starší literatuře uváděny také pod názvem *D. hyalina*/ *D. rosea*, více v práci Petrušek et al. 2008b), *Daphnia galeata* Sars a *Daphnia cucullata* Sars (Benzie 2005; Petrušek et al. 2008b; Sed'a et al. 2007a). Tyto druhy vytváří mezidruhové hybridy, kteří mohou být v určitých oblastech nádrže úspěšnější než jejich rodičovské druhy. Gradienty prostředí v nádrži mohou vést k heterogenní distribuci jednotlivých druhů perlooček v rámci jednoho vodního útvaru, a případně ke vzniku hybridních zón. Dlouhodobou koexistenci rodičovských druhů perlooček a jejich hybridů umožňuje právě heterogenita prostředí způsobená environmentálními gradienty (Petrušek et al. 2008b; Sed'a et al. 2007a).

Koexistenci několika druhů perlooček také podporuje selektivní predační tlak ze strany ryb, které upřednostňují větší kořist (Spaak & Hoekstra 1997). Další potenciační faktor, který může mít silný vliv na populaci perlooček, je parazitismus. Paraziti perlooček jsou schopni s časovým zpožděním sledovat nejčastější hostitelské genotypy. Tyto genotypy mohou být následně silně infikovány a vzácné genotypy perlooček (v daném místě nádrže) mohou převládnout (Wolinska & Spaak 2009). Nedávná studie také ukázala, že i jednotlivé skupiny parazitů perlooček mohou vykazovat v rámci jednoho vodního útvaru heterogenní distribuci a tím mohou vytvářet oblasti s rozdílnou infekcí (Wolinska et al. 2011a).

Environmentální gradienty, predace a parazitismus nemají vliv pouze na výsledek mezidruhové kompetice a heterogenní distribuci jednotlivých druhů v rámci jednoho vodního útvaru, ale tyto faktory také významně ovlivňují plodnost perlooček.

Řada studií se věnuje vlivu různých faktorů prostředí na plodnost perlooček: na počet vajíček v jedné snůšce, velikost jednotlivých vajíček, velikost perlooček, při které má samička první snůšku a další životní strategie, mezi kterými perloočky musí v danou dobu volit, aby optimalizovaly alokaci svých zdrojů a maximalizovaly svou reprodukční rychlost (Black 1993; Macháček & Sed'a 2007; Schwartz 1984; Taylor & Gabriel 1992). Tyto studie jsou však převážně laboratorního charakteru, terénní experimenty jsou omezené časovou náročností a potřebou opakovaných měření a vzorkování. Má diplomová práce, vychází z analýzy vzorků zooplanktonu z opakovaných terénních odběrů na přehradních nádržích Vír a Vranov v letech 2009 a 2010 a zabývá se právě tématem vlivu mikroparazitů a environmentálních gradientů na plodnost perlooček.

1.1 Cíle práce

Prvotním cílem mé diplomové práce bylo přispět k objasnění prostorové distribuce a časové dynamiky mikroparazitů napadajících perloočky r. *Daphnia* v českých přehradních nádržích. V těchto nádržích jsou vytvořené podélné environmentální gradienty a předběžné výsledky naznačovaly, že přímo ovlivňují nejen distribuci perlooček, ale i míru jejich parazitace. Má diplomová práce měla přispět k objasnění následujících otázek:

- Jaká je distribuce jednotlivých skupin parazitů u perlooček na podélném gradientu vybraných přehradních nádrží Vír a Vranov?
- Jaká je časová a prostorová variabilita v prevalenci parazitů u opakovaných odběrů?
- Jak jednotlivé skupiny parazitů ovlivňují plodnost nakažených jedinců rodu *Daphnia*?

Hlavní náplní mé laboratorní práce byla analýza vzorků zooplanktonu z opakovaných odběrů přehradních nádrží Vír a Vranov v letech 2009 a 2010. Bohužel se po analýze celkového množství přesahující 4400 jedinců perlooček ukázalo, že pouze 56 perlooček bylo nakaženo. Tento malý počet infikovaných samic nebyl dostačující k jakékoliv analýze prevalence parazitů a ke srovnání prostorové a časové variability. Z tohoto důvodu je má práce omezena pouze na slovní hodnocení tohoto tématu a diskusi s literaturou.

Díky získaným hodnotám o počtu vajíček u každé ze zkoumaných perlooček, množství fytoplanktonu a abiotických faktorech (měřených během terénních odběrů), jsem se mohla zaměřit na alternativní problematiku, a to vyhodnocení samotných environmentálních gradientů na horizontální a vertikální ose nádrže (resp. polohy odběrového místa v nádrži) na plodnost perlooček. Pro několik proměnných jsem testovala, nakolik mají signifikantní vliv na plodnost perlooček. Mezi ně patří: identita nádrže, sezona, stanoviště na podélné a svislé ose nádrže, případně potravní nabídka.

Během laboratorní práce jsem se potýkala s řadou potíží a otázek při identifikaci jednotlivých skupin mikroparazitů a volbou vhodné metodiky k jejich určování z fixovaných vzorků. Řešení problému s určováním mikrosporidiální infekce vyústilo v několikaměsíční hledání odpovědi a zkoumání jiných vzorků. Jako jeden z hlavních přínosů mé diplomové práce tedy považuji sepsání metodologických doporučení pro fixování živých vzorků zooplanktonu, sloužících k budoucímu zkoumání parazitů. Navrhuji vhodný způsob laboratorní práce s mikroparazity při velkém množství zkoumaných perlooček a detailněji popisují problémy s určováním jednotlivých skupin parazitů, konkrétně s identifikací mikrosporidií. Tato problematika je sepsána v Příloze I mé diplomové práce.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Údolní přehradní nádrže

2.1.1 Historie, účel výstavby

Historie výstavby přehradních nádrží ve světě se datuje na úctyhodných 5000 let. V České republice se historie přehradních nádrží začíná psát před 500 – 700 lety. Z této doby pochází u nás nejstarší přehradní nádrž Jordán. Podstatný podíl přehradních nádrží v České republice byl vybudován až ve druhé polovině 20. století (Broža et al. 2005). Tyto vodní nádrže mají pro Českou republiku velký význam, protože představují jediný rozsáhlý zdroj povrchové stojaté vody, která mimo jiné slouží jako zásobárna pitné vody pro většinu obyvatel (Říha 2012).

Umělé vodní nádrže se vytvářejí převážně výstavbou hrází nebo přehrad (Broža et al. 2005). Přehradou označujeme stavbu, která v údolí toku doplňuje přírodní svahy tam, kde jinak nemohou být, tj. napříč údolím, v jehož nejnižších polohách vede vodní tok (Broža et al. 2005). Výstavbou přehrad se tento přirozený říční tok přeruší. Přehradní nádrže jsou tedy často lokalizované v relativně úzkém údolí. Ty mají specifickou morfologii a označují se jako kaňonovité údolní přehradní nádrže.

Vodní nádrže umožňují přizpůsobit přirozený rozkolísaný říční průtokový režim potřebám společnosti. Jsou tedy primárně budovány kvůli jejich zásobní a ochranné (retenční) funkci. Zásobní funkce umožňuje zvyšovat nízké průtoky v toku pod nádrží v dlouhodobých obdobích nedostatku srážek, kdy přirozené přítoky nestačí pokrýt požadavky. Naproti tomu ochrannou funkci nádrže je zachytit část objemu povodně a přispět ke zmírnění povodňových škod. Přehradní nádrže mohou být dále využívány pro výrobu elektrické energie, pro odběry vody pro vodárenské využití, k rekreaci či rybolovu (Broža et al. 2005).

Další významnou zásobárnu stojaté vody v krajině mohou představovat jezera. Přestože mohou mít stejnou geografii, od údolních přehradních nádrží je odlišuje mnoho limnologických vlastností (Straškraba 1998). Jezera jsou mnohem starší. Většinou jsou přirozeného kombinovaného původu, kdy se na vzniku a tvarování jezerní pánve podílelo více různých geomorfologických pochodů. Jezera jsou napájena povrchovou a srážkovou vodou, která může do jezera přitékat ze všech stran. Největší hloubka je v centrální oblasti jezera. Voda zde má delší teoretickou dobu zdržení a hlavní hnací sílu vodních mas představuje vítr (Straškraba 1998).

Přehradní nádrže jsou umělého původu, vznikají přehrazením řeky hrází. Morfologie nádrže vychází z účelu stavby přehrad: zadržení většího množství vody při povodni či nadlepšení průtoku v období sucha nebo výroba elektrické energie. Přehradní nádrže jsou tedy charakterizovány jednosměrným podélným tokem vody od přítoku směrem k hrázi a podélným gradientem hloubky s největší hloubkou u hráze. Hlavní řídicí silou je přítok řeky. Kaňonovité přehradní nádrže tedy představují speciální vodní ekosystém definovaný velmi dobře vyvinutými biotickými a abiotickými gradienty podél vertikální a horizontální osy nádrže, řízenými právě tímto jedním přítokem řeky (Straškraba 1998).

2.1.2 Environmentální gradienty

Vlastnosti vody se v přehradních nádržích mění zejména ve směru vertikálním a ve směru horizontálním v závislosti na průtoku vody nádrží. Tyto vlastnosti se mění nejenom během ročních období, ale i během dne. Jsou vyvolány změnou teploty, koncentrací rozpuštěných plynů, chemickými a biochemickými procesy (Pitter 1999). Tyto faktory ovlivňují oživení v přehradních nádržích. Níže uvádím popis gradientů, které mají významný vliv na zooplanktonní společenstva v českých přehradních nádržích.

2.1.2.1 *Vertikální gradienty*

Z uvedených příčin podléhají vertikální stratifikaci především tyto složky:

TEPLOTA

Teplota je jedním z významných ukazatelů jakosti a vlastnosti vody, protože ovlivňuje rozpustnost kyslíku, rychlost biochemických pochodů, a tím mimo jiné i proces samočištění vody (Pitter 1999).

Ve vodních nádržích s dostatečnou hloubkou dochází v létě a v zimě k teplotní stratifikaci, která vzniká díky závislosti hustoty vody na teplotě a anomální vlastnosti vody (maximální hustota při 4 °C). V létě teplota povrchové vrstvy vody stoupá a v hlubších vrstvách se hromadí chladnější voda s větší hustotou. Svrchní vrstva vody (epilimnion) je od spodní vrstvy (hypolimnion) oddělena tzv. skočnou vrstvou (metalimnion), která brání cirkulaci vody v celém objemu. Lze tedy říci, že letní teplotní stratifikace je charakterizována dobře promíchanou teplejší svrchní vrstvou a chladnější vrstvou nade dnem. Toto období se nazývá letní stagnace. V zimě dochází k inverznímu rozdělení teploty a ve spodní vrstvě se

hromadí voda o teplotě 4 °C – období zimní stagnace. Na jaře a na podzim dochází vlivem působení větru a teplotních změn k proudění vodní masy a tím k promíchání jednotlivých vrstev. Teplota se následně v celém vodním sloupci vyrovnává. Hovoří se o jarní a podzimní cirkulaci (Pitter 1999).

Vytvoření teplotní stratifikace závisí na vnějších a vnitřních podmínkách nádrže. Hlavní vnější podmínky jsou: hydrometeorologické vlastnosti oblasti určené geografickou polohou, větrná expozice nádrže a roční období (Lampert & Sommer 2007). Vnitřní podmínky jsou: množství absorbovaného slunečního záření, tok vody (od přítoku k hrázi) a morfologie nádrže (plocha, tvar, hloubka, doba zdržení vody) (Straškraba & Hocking 2002).

Doba zdržení vody má významný vliv na hydrodynamické podmínky v nádrži a na vývoj stability letní stratifikace. Pokud je doba zdržení ve vodní nádrži krátká, míra toku vody skrz nádrž je vysoká a neumožní vyvinout teplotní stratifikaci, kvůli neustálému promíchávání jednotlivých vrstev vodního sloupce. Doba zdržení nad 200 dní již umožňuje vyvinout silnou teplotní stratifikace (Straškraba & Hocking 2002).

KYSLÍK

Teplotní stratifikace podmiňuje i stratifikaci dalších ukazatelů jakosti vody. Jde především o kyslíkovou stratifikaci, která ovlivňuje oxidačně-redukční potenciál a osídlení jednotlivých vodních vrstev organismy, kteří vyžadují pro své metabolické aktivity rozdílné koncentrace kyslíku (Pitter 1999).

Kyslík se dostává do vody difuzí z atmosféry či z fotosyntetické asimilace primárních producentů. Rozpustnost kyslíku ve vodě je závislá na teplotě a tlaku. Za standardního tlaku 101,325 kPa a teploty 20 °C je při stoprocentním nasycení obsah kyslíku ve vodě 9,09 mg/l (Lampert & Sommer 2007).

Svrchní vrstva vody u hladiny (epilimnion) je kyslíkem obvykle téměř nasycena. Eutrofní vody s vysokou produkcí řas a sinic bývají v letním období při intenzivním slunečním svitu a intenzivní fotosyntetické asimilaci kyslíkem i přesyceny. V období letní stagnace dochází v eutrofních vodách pod skočnou vrstvou (metalimniem) k rychlému poklesu koncentrace kyslíku, protože k promíchávání vody, a tedy k výměně kyslíku s atmosférou, dochází jen ve vrstvě vody v oblasti epilimnia. Ve spodních vrstvách vody nádrže (hypolimniu) se mohou koncentrace kyslíku pohybovat jen v desetínách mg/l a nade dnem hlubokých nádrží bývá někdy dosaženo až anoxických podmínek. Deficit kyslíku u dna je způsoben jen pomalou difuzí kyslíku do hypolimnia a biochemickou spotřebou kyslíku při

rozkladu organických látek (Pitter 1999). Na vertikální ose nádrže tedy můžeme rozlišovat dvě zóny:

- trofogenní zóna – povrchová vrstva vody, v níž primární producenti vytvářejí organické látky a produkují kyslík.
- trofolytická zóna – vrstva vody, do které proniká méně než 1% světelného záření. V této vrstvě je kyslík spotřebován organismy na rozkladné procesy, které zde převládají.

SVĚTLO

Pro vodní ekosystémy hraje důležitou roli infračervená složka světla jako zdroj tepla a oblast viditelného spektra (tzv. fotosynteticky aktivní záření), které využívají primární producenti při fotosyntetické asimilaci a organismy pro orientaci (Lampert & Sommer 2007). Světlo i teplo klesá s hloubkou. S hloubkou se také mění spektrální složení. Čistá voda absorbuje nejlépe červenou a oranžovou složku viditelného spektra, a proto tyto části nepronikají hluboko. Nejhlouběji pronikají zelenomodré a fialové části spektra. Se zvyšujícím se obsahem rozpuštěných organických látek roste absorpce světla v modré až fialové části spektra, voda je zabarvena do žluta až hněda (Bronmark & Hansson 1998). Na vertikální ose nádrže můžeme rozlišovat:

- vrstvu eufotickou: horní vrstva vodního sloupce, která je dobře prosvětlená a dopadá zde největší část světelného spektra. V této části převládá fotosyntéza nad respirací
- vrstvu afotickou: neboli zóna temna, kde neproniká sluneční záření (případně proniká jen v malé míře; tato oblast se někdy nazývá disfotickou zónou). V této vrstvě fotosyntéza neprobíhá vůbec, nebo pokud probíhá, nepřevažuje nad respirací.

FOSFOR

Přírodním zdrojem fosforu ve vodách je rozpouštění a vyluhování některých minerálů a zvětralých hornin. Antropogenním zdrojem anorganického fosforu je především aplikace fosforečných hnojiv a polyfosforečnanů z detergentů obsažených v odpadních vodách. Sloučeniny fosforu se dostávají do povrchových vod i s atmosférickými srážkami. Zdrojem organického fosforu je fosfor obsažený v živočišných odpadech a rostlinné biomase (Pitter 1999). Sloučeniny fosforu hrají významnou úlohu v přírodním koloběhu látek. Jsou nezbytné pro nižší i vyšší organismy, které je přeměňují na organicky vázaný fosfor. Zvláště významně se fosforečnanů uplatňují při růstu řas a sinic a při eutrofizaci povrchových vod (Pitter 1999). Eutrofní voda je voda bohatá na živiny, především sloučeniny fosforu a dusíku, s velkou

primární a sekundární produkci a produkcí ryb. U eutrofních nádrží se celkový fosfor pohybuje v rozmezí 30 - 100 $\mu\text{g/l}$ (Lampert & Sommer 2007).

Velmi důležitá je vertikální stratifikace sloučenin fosforu v nádrži. Ve vegetačním období dosahuje koncentrace sloučenin fosforu minima v oblasti epilimnia, protože fosfor je inkorporován do biomasy fotosyntetických organismů. Koncentrace fosforu se obvykle s hloubkou zvětšuje a největší je u dna nádrže, kde dochází k rozkladu biomasy fytoplanktonu a zooplanktonu a k uvolňování sloučenin fosforu ze sedimentů. V období podzimní a jarní cirkulaci vody se rozdíly po vertikále vyrovnají (Pitter 1999).

PRIMÁRNÍ PRODUCENTI

Hlavní fyzikální faktory ovlivňující vertikální distribuci fytoplanktonu jsou: gradient světla ve vodním prostředí, průhlednost vody a gradient teploty (Longhi & Beisner 2009). Množství dostupných živin a filtrační míra zooplanktonu jsou taktéž významným ovlivňujícím faktorem (Caputo et al. 2008; Decaestecker et al. 2002).

Na vertikální ose nádrže se rozlišuje:

- vrstva trofogenní (shodná s eufotickou vrstvou): díky dostupnosti světelného záření se v této vrstvě koncentruje většina biomasy primárních producentů.
- vrstva trofolytická (shodná s hypolimniem): v této vrstvě dochází k rozkladu nahromaděné biomasy heterotrofními organismy (Pitter 1999).

V určitých situacích se nemusí fytoplankton soustředit je ve vrstvách epilimnia, zejména tehdy, pokud sluneční záření u hladiny poškozuje jednotlivé buňky fytoplanktonu nebo pokud je vyčerpán zdroj živin, tehdy je pro fytoplankton výhodnější obývat větší hloubky, s větší koncentrací fosforu. Pokud se fytoplankton vyskytuje v oblasti metalimnia, je také uchráněn od neustálého promíchávání s vodní vrstvou epilimnia. V oblasti termokliny je také zpomalena sedimentační rychlost buněk díky změně v hustotě vody. Je-li fytoplankton koncentrován v této oblasti vodního sloupce, hovoříme o metalimnetickém maximu (Caputo et al. 2008; Lampert & Sommer 2007).

ZOOPLANKTON

Vertikální distribuci fytoplanktonu sleduje i distribuce filtrujícího zooplanktonu, s výskytem převážně ve vrstvách epi- a metalimnia. Zooplankton může také vykazovat diurnální vertikální migraci, která slouží jako únik před rybími predátory, kteří svou kořist vyhledávají pomocí zraku (Decaestecker et al. 2002; Lampert 1989). V našich zeměpisných šířkách je většina ryb ve vodních nádržích lokalizována převážně v epilimniu a pouze malá

část může být nalezena v hypolimniu (Draštík et al. 2008). Je zajímavé, že to ovšem nemusí nutně znamenat, že by zooplankton migroval (Sed'a et al. 200b).

Výskyt perlooček ve větších hloubkách by mohl být také výsledkem parazitace (Decaestecker et al. 2002) (viz níže kapitola Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*).

2.1.2.2 Horizontální gradienty

Vznik podélných gradientů je dán morfologií přehradních nádrží, které mají dlouhý kaňonovitý tvar s jedním hlavním přítokem řeky. Významným podélným gradientem je rostoucí hloubka od přítoku směrem k hrázi, kde může v našich nádržích vodní sloupec dosahovat až 50 m hloubky (Říha 2012). Podélné environmentální gradienty jsou v přehradních nádržích reprezentovány hlavně poklesem trofické úrovně ve směru od přítoku k hrázi a s tím související změny v oživení vodního sloupce.

Přítok řeky přináší různý materiál unášený proudem, organické látky a hlavně živiny (zejména fosfor a dusík). Pro oblast přítoku je tedy charakteristické zvýšení zákalu. Zákal lze definovat jako snížení průhlednosti vody, obvykle v důsledku přítomnosti rozptýlených částic, které mohou být buď přirozeného, nebo antropogenního původu. Jde např. o jílové minerály, huminové látky, hydratované oxidy kovů, bakterie, plankton a detrit (Pitter 1999).

Významný přítok živin stimuluje růst fytoplanktonu v této oblasti (Strašraba 1998). Směrem k hrázi množství unášených částic klesá, snižuje se množství živin a následně i biomasa fytoplanktonu, naopak se zvyšuje průhlednost. Heterogenita vodního prostředí se zvyšuje s rostoucí dobou zdržení vody ve vodní nádrži (Hejzlar & Vyhnálek 1998).

Pro filtrující zooplankton je oblast přítoku výhodná z důvodu větší kvantity potravy (větší biomasa řas, často vyjadřováno jako obsah chlorofylu a) a lepší kvality potravy (poměr C:P v biomase fytoplanktonu) (Caputo et al. 2008). Nicméně tento region je také atraktivnější pro planktonožravé ryby, které zde mohou být zvýhodněny lepšími trofickými podmínkami a lepšími podmínkami pro tření v oblasti litorálu. V kaňonovitých přehradních nádržích je litorál jen velmi chudě zastoupený (formovaný údolím řeky). Pelagická zóna reprezentuje hlavní objem vody v těchto nádržích (Říha et al. 2012). Příbřežní zóna v oblasti přítoku tedy poskytuje rybám vhodné prostředí k nalezení potravy, ke tření a k hledání úkrytů. Další možné vysvětlení zvýšeného výskytu ryb v oblasti přítoku řeky je jejich původ. Ryby obývající jezera a přehradní nádrže jsou říčního původu a proto mohou vybírat habitaty, které jsou podobnější těm v řece: jako oblast přítoku řeky do nádrže a mělké příbřežní oblasti (Prchalová et al. 2006; Prchalová et al. 2009; Gido et al. 2002).

2.2 Perloočky rodu *Daphnia* jako modelový organismus

Perloočky rodu *Daphnia* jsou malé (0,5 – 6 mm), průhlední, planktonní lupenonoží korýši (Branchiopoda: Anomopoda). Zástupci rodu *Daphnia* tvoří celosvětově jednu z nejrozšířenějších skupin sladkovodního zooplanktonu (Benzie 2005; Ebert 2005). Vyskytují se v mnoha typech stojatých vod, kromě extrémních habitatů jako jsou horké prameny nebo Antarktida (Lampert 2011; Sed'a & Petrušek 2011). Perloočky hrají důležitou roli v ekosystémových procesech, jako klíčový konzument primárních producentů a mikrobů (Lampert 2011). Zároveň jsou samy důležitou potravou mnoha ryb a některých bezobratlých organismů (Ebert 2005; Lampert 2006). Perloočky tedy tvoří spojovací článek mezi primární produkcí fytoplanktonu a vyššími trofickými úrovněmi v pelagických potravních řetězcích (Lampert 2011).

Perloočky mají řadu vlastností, které je předurčují k tomu, aby se staly výbornými modelovými organismy v populační ekologii, paleoekologii, evoluční biologii, ekologické biografii, toxikologii a řadě dalších oborů (Brendonck & De Meester 2003; Decaestecker et al. 2007; Lampert 2006). K tomu napomohly tyto jejich vlastnosti:

- jsou snadno kultivovatelné v laboratorních podmínkách
- mají krátkou generační dobu s produkcí velkého počtu potomků (dospělé samice modelových druhů mohou za vhodných podmínek produkovat snůšku vajíček každé 3 až 4 dny)
- mají nízkou mortalitu juvenilních jedinců
- mají přímý vývoj bez larválního stadia
- jsou průhledné, lze tedy lehce pozorovat jejich snůšky vajíček a další vnitřní struktury
- lze s nimi dobře manipulovat
- vytváří velké populace
- v laboratorních podmínkách je jednoduché udržovat klonální linie
- mají specifický způsob rozmnožování, kdy mohou za určitých podmínek přecházet z partenogeneze na sexuální rozmnožování
- reagují rychle na změny podmínek
- vytváří také diapauzující stadia přetrvávající v sedimentech v životaschopném stavu po mnoho let

2.2.1 Rozmnožování perlooček

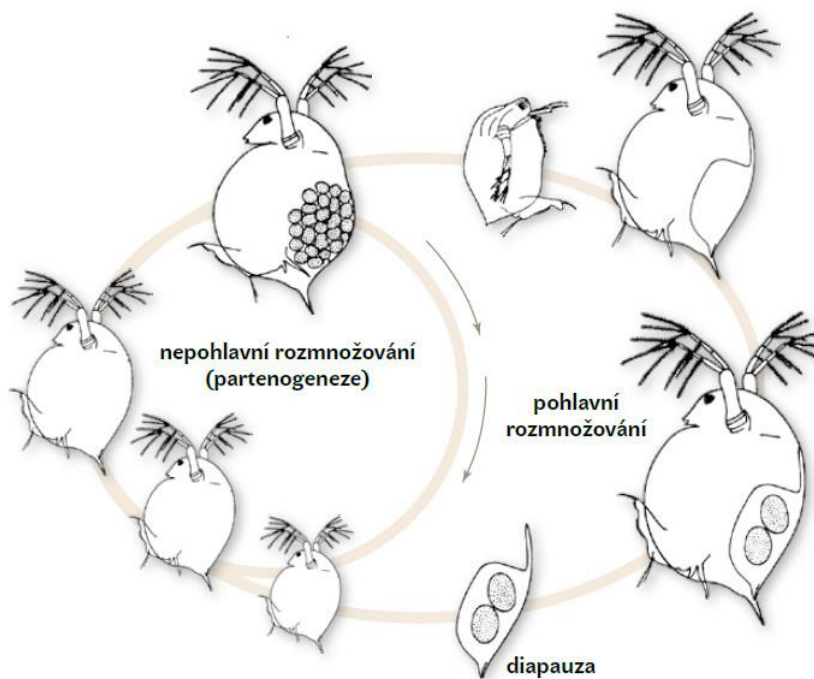
Většina druhů perlooček rodu *Daphnia* se nejčastěji rozmnožuje cyklickou partenogenezí (obr. 1). Za příznivých podmínek se z trvalých vajíček líhnou samičky, které produkují snůšky vajíček. Vzniklá vajíčka nevyžadují oplodnění v plodové komůrce a líhnou se z nich dcery - asexuální samice (apomiktická partenogeneze).

Perloočky se vyvíjí přímo, bez metamorfózy. Juvenilní jedinci se rodí s každým dospělým instarem, u rychle rostoucích druhů zhruba každé tři dny (Carius et al. 2001). Juvenilní samičky projdou 5 instary, než dospějí a jsou plodné (Benzie 2005). Podobně jako u jiných korýšů dochází k růstu těla jedince pouze tehdy, když je svlékán starý karapax (Carius et al. 2001). Ke svlékání karapaxu u dospělé samice dochází poté, co uvolní dceřiné jedince, ještě než jsou další vajíčka umístěna do plodové komůrky (Ebert 2008). První snůšku mívají rychle rostoucí druhy r. *Daphnia* za vhodných podmínek (dostatek potravy, optimální teplota) obvykle kolem 7. až 15. dne od narození (Ebert 2005). Samice během svého života mohou vyprodukovat až 20 snůšek (Ebert 2008).

Za určitých podmínek, obvykle v odpovědi na zhoršující se environmentální podmínky (např. zkracování denní periody, velká populační hustota, nedostatek potravy, nízká teplota), mohou partenogeneticky se rozmnožující samičky produkovat asexuálně nejen dceřiné potomstvo, ale i samečky (Lampert 2011; Macháček et al. 2013).

Tito samci následně oplodní pohlavně se rozmnožující, tzv. efipialní samičky (obr. 1). Sexuálně vzniklá diploidní vajíčka (obvykle 2) jsou uložena v plodové komůrce perloočky v ochranném pouzdře, které je silně chitinizované a melanizované a tvarově připomíná sedélko (Lampert 2006; Ebert 2008). Toto pouzdro zvané efipium slouží jako dormantní stádium (Benzie 2005). Efipia plavou na hladině nebo se usadí na dně nádrže, kde jsou schopná přežít v sedimentu v extrémních případech i několik stovek let (Frisch et al. 2014). V sedimentu nádrží představují banku trvalých vajíček a zásobárnu genotypů (Decaestecker et al. 2007). U některých specifických populací jsou perloočky schopné tvořit dormantní vajíčka i bez meiózy a tudíž nepotřebují samce (obligátní partenogeneze) (Ebert 2008).

Asexuální rozmnožování umožňuje perloočkám rychle reagovat na momentálně výhodné environmentální podmínky prostřednictvím rychle se množících klonálních jedinců. Sexuální reprodukce naopak poskytuje zdroj genetické variability skrz rekombinaci a zvyšuje pravděpodobnost, že některé genotypy budou lépe adaptovány na nové změny prostředí (Benzie 2005).



Obr. 1: Rozmnožovací cyklus perlooček (převzato z Petrussek 2010, autorka kreseb Katleen Van Der Gucht). Za příznivých podmínek se perloočky rozmnožují partenogenezí a produkují asexuální samičky. Reakcí na zhoršené environmentální podmínky tyto samičky produkují samce. Pohlavním rozmnožováním samičky a samce vzniknou obvykle dvě diploidní dormantní vajíčka chráněná efipiem.

2.3 Heterogenní distribuce perlooček v rámci jednoho vodního útvaru

Kaňonovitá morfologie údolních přehradních nádrží a environmentální gradienty vytváří na podélné ose nádrže místa s rozdílnými abiotickými a biotickými podmínkami. Tyto gradienty mohou ve zdánlivě homogenním vodním prostředí ovlivňovat distribuci jednotlivých druhů obdobným způsobem jako pevné bariéry v terestrických ekosystémech (Barton & Hewitt 1985; Petrusek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a).

Jednotlivé druhy perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* (*D. longispina*, *D. galeata*, *D. cucullata*) se liší ekologicky a do jisté míry morfologicky, zejména velikostí těla, to jim umožňuje prosperovat v odlišných oblastech nádrže s odlišnými podmínkami (Gliwicz 1990). V místě výskytu dvou druhů může docházet k jejich křížení a ke vzniku hybridních genotypů. Hybridní mohou kombinovat výhodné vlastnosti obou rodičovských druhů a mohou být následně lépe adaptováni na podmínky dané oblasti (Spaak & Hoekstra 1997). V těchto oblastech, v tzv. hybridních zónách, mohou tedy hybridní převládnout nad rodičovskými druhy (Petrusek et al. 2008a). Hybridní genotypy dceřiných jedinců vznikají v důsledku sexuálního rozmnožování odlišných rodičovských druhů a mohou být následně po několika generacích udržovány klonálním rozmnožováním (partenogenezí). Partenogenetická reprodukce tedy snižuje riziko extinkce hybridů a umožňuje jim dosáhnout vysoké abundance (Barton & Hewitt 1985).

Mezi hlavní faktory ovlivňující prostorovou distribuci jednotlivých druhů perlooček a jejich hybridů na podélné ose nádrže je považován gradient dostupnosti potravy a gradient predáčního tlaku (Petrusek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a). Planktonožravé ryby představují hlavní predátory perlooček v českých přehradních nádržích. V jiných vodních ekosystémech mohou hrát důležitou roli predátorů perlooček i některé druhy bezobratlých živočichů, např. larvy koretry *Chaoborus* spp. (Diptera), znakoplavky *Notonecta* spp. (Heteroptera) nebo dravá perloočka *Leptodora kindtii* (Cladocera) (Stibor & Luning 1994; Loffler et al. 2004).

Region v eutrofní části přítoku je pro perloočky bohatý na potravu, ale je také atraktivnější pro ryby (Prchalová et al. 2008). Pro planktonožravé ryby, které svou kořist vyhledávají pomocí zraku, představují větší perloočky lepší kořist (Gliwicz 1990), proto jsou zde malé druhy zooplanktonu zvýhodněny. V této oblasti tedy mohou dominovat malé perloočky *D. cucullata* a jejich hybridní *D. cucullata* x *D. galeata*. Větší perloočky *D. galeata* jsou pod větším predáčním tlakem ze strany ryb, proto se vyskytují dále od přítoku, kde směrem k hrázi ryb ubývá (Petrusek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a).

Rozdílný predační tlak na zooplanktonní společenstvo umožňuje koexistenci obou rodičovských druhů *D. cucullata* a *D. galeata* a jejich hybridů. Mezidruhová hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* kombinují relativně malou velikost těla (dovolující uniknout predátorům) rodičovského druhu *D. cucullata* a větší produkci vajíček většího rodičovského druhu *D. galeata* (Spaak & Hoekstra 1997; Loffler et al. 2004; Petrusek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a).

Tělem velké perloočky druhu *D. longispina* a jejich hybridů *D. galeata* x *D. longispina* obývají dolní oblasti nádrže blíže k hrázi (Petrusek et al. 2008; Sed'a et al. 2007a). Obecně velký filtrující zooplankton preferuje oblasti u hráze s nižší trofickou úrovní. Nemusí to být jen kvůli výskytu planktonožravých ryb v oblasti přítoku a silnému predačnímu tlaku, ale také kvůli předpokladu, že větší filtrující zooplankton bude úspěšnější v oblastech s nízkou potravní nabídkou. Větší tělo a větší filtrační aparát umožňuje přefiltrovat více vody (Gliwicz 1990).

Hybridů druhů *D. cucullata* a *D. longispina* v českých přehradních nádržích pozorováni nebyli (Petrusek et al. 2008a; Petrusek et al. 2013; Sed'a et al. 2007a). Oba rodičovské druhy jsou prostorově odděleny, vyskytují se v oblastech s rozdílnými environmentálními podmínkami. Dlouhý profil kaňonovitých přehradních nádrží tedy zřejmě společný výskyt a křížení těchto dvou rodičovských druhů nepodporuje.

Heterogenní distribuce ryb a rozdílný predační tlak ovlivňují distribuci perlooček také i ve vertikálním směru, např. perloočky druhu *D. longispina* a jejich hybridů *D. galeata* x *D. longispina* často dominují v meta- či hypolimniu (Petrusek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a; Sed'a et al. 2007b). Dolní oblasti přehradní nádrže s větší hloubkou nabízejí pro velký zooplankton další výhodu – potencionální možnost únik před predací do nižších vrstev vodního sloupce, protože většina ryb v evropských nádržích se koncentruje ve vrstvách epilimnia a metalimnia (De Meester & Weider 1999; Draštík et al. 2008). Nicméně v českých přehradních nádržích výraznější diurnální vertikální migrace perlooček pozorována nebyla (Sed'a et al. 2007b). Vertikální distribuce může být ovšem vysvětlena i rozdílnou kvalitou potravy mezi epilimniem a hlubšími vrstvami vodního sloupce. Seston ve větších hloubkách obsahuje více fosforu než ve vrstvách epilimnia a představuje pro zooplankton vhodnější potravou. Této potravy je zde daleko menší množství než v horních vrstvách vodního sloupce. Kvantita potravy je tedy pro zooplankton rozhodující. (Garcia-Ruiz et al. 1999; Pitter 1999). Vertikální distribuce perlooček může být také ovlivněna heterogenní distribucí mikroparazitů např. oomycet (viz níže kapitola Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*) (Wolinska et al. 2011a).

Tedy nejenom gradient predačního tlaku a dostupnost potravy, ale také i parazitismus významně ovlivňuje populaci perlooček. Kombinací všech těchto faktorů vznikají místa s rozdílnými abiotickými a biotickými podmínkami umožňující koexistenci rodičovských druhů a jejich hybridů v rámci jednoho vodního útvaru. Tyto podmínky také ovlivňují morfologii, plodnost a další životní strategie jednotlivých druhů perlooček.

2.4 Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*

Paraziti perlooček rodu *Daphnia* patří do řady taxonomických skupin (Ebert 2005; Lampert 2011). Má diplomová práce se zaměřuje na 4 nejčastější skupiny eukaryotických mikroparazitů vyskytujících se u perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* v českých přehradních nádržích. Mezi tyto skupiny patří:

- mikrosporidie
- oomycety
- prvok *Caullerya mesnili*
- kvasinka *Metschnikowia bicuspidata*

Infekce způsobené uvedenými mikroparazity se nejčastěji přenáší horizontální cestou. Horizontální přenos znamená infekci nových hostitelů skrz infekční částice (spory) uvolněné do vody z infikovaných hostitelů. Ty mohou být uvolněné z živých jedinců nebo ze spor rozkládajících se těl infikovaných perlooček. Zdravé perloočky se mohou nakazit sporamí během filtrace vody (Ebert 2005; Lampert 2011). Spory mohou také klesat na dno vodní nádrže, kde se mohou akumulovat a přetrvávat v sedimentu do té doby, než se promícháním dostanou zpět do vodního sloupce (Decaestecker et al. 2007). Další způsob přenosu mikroparazitů u perlooček je vertikální přenos infekčních stádií přímo ze samičky na vajíčka (Lampert 2011).

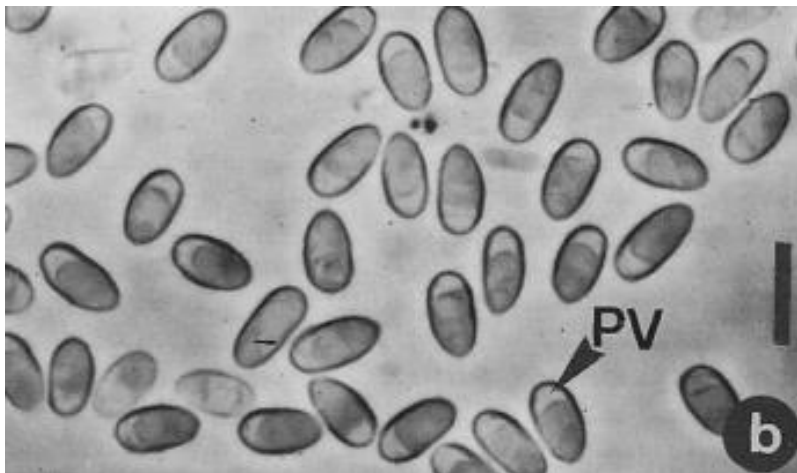
Níže uvádím charakteristiky a fotografie jednotlivých skupin mikroparazitů uváděné v literatuře. V kapitole Laboratorní určování mikroparazitů se následně podrobněji věnuji popisu jednotlivých symptomů a zmiňuji vlastní poznatky s určováním mikroparazitů. V téže kapitole jsou také uvedeny fotografie, které jsem pořídila během prohlížení infikovaných perlooček pomocí stereomikroskopu.

2.4.1 Studované skupiny mikroparazitů

2.4.1.1 *Mikrosporidie*

Mikrosporidie zahrnují největší skupinu parazitů perlooček. Jsou to obligátní vnitrobuněční paraziti napadající specifickou tkáň hostitele, např. střevo, vaječníky, tukovou tkáň či karapax (Ebert 2005; Lampert 2011). Většina mikrosporidií napadá u perlooček buňky střevního epitelu. Tyto mikrosporidie produkují velmi malé průhledné spory obvykle menší než 3 μm (obr. 2). Infekce často bývá lokalizována v zadní části střeva. Tyto druhy je těžké bez pitvy infikované perloočky odhalit. Některé mikrosporidie lze však v pokročilé fázi infekce pozorovat jako tmavý shluk spor vyplňující tělo perloočky (obr. 3) (Ebert 2005). Jednotlivé druhy mikrosporidií se liší mimo jiné ve velikosti a tvaru spor. Infekce je obvykle přenášena horizontálně (Ebert 2005). Zdá se, že ve srovnání s ostatními uvedenými mikroparazity, nemají mikrosporidie tak negativní vliv na plodnost a přežívání perlooček (Ebert 2005).

V analyzovaných vzorcích perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* z českých přehradních nádrží nakažených mikrosporidii dominoval jednak druh v literatuře uváděný jako *Berwaldia schaefernai* a dále blíže neurčené taxony (Wolinska et al. 2009).



Obr. 2: Tvar spor mikrosporidie *Berwaldia schaefernai* (převzato z Vávra & Larsson 1994).



Obr. 3: Perloočka s pokročilou fází mikrosporidiální infekce (foto: Jana Hubová).

2.4.1.2 *Oomycety*

Oomycety jsou mnohoaderné organismy patřící do říše Stramenophila. Mohou žít saprofytičky či paraziticky, s výskytem na souši i ve vodě. Na první pohled se podobají plísním, proto bývají často (spolu s chytridiomycety), ale nesprávně označovány jako vodní plísně. U perlooček oomycety napadají buď snůšku s vajíčky, nebo oblast hlavy, a následně mycelium prorůstá celým tělem hostitele (obr. 4) (Wolinska et al. 2009). Infekce je přenášena horizontálně ze spor uvolněných z infikovaných jedinců, zejména po smrti (Tellenbach et al. 2007). Snůška vajíček však může být nakažena i během pootvívání plodové komůrky do okolní vody (kvůli přístupu kyslíku k vajíčkům) (Lampert 2011).

Jak ukazují experimentální studie, oomycety jsou vysoce virulentní, dokážou zcela zničit snůšku s vajíčky, která již nejsou dále životaschopná (Tellenbach et al. 2007, Wolinska et al. 2008a). Pokud je infikována jen snůška, a oomycety neprorostly dále do těla perloočky, může tato perloočka po uvolnění infikované snůšky produkovat další zdravá vajíčka (Tellenbach et al. 2007).

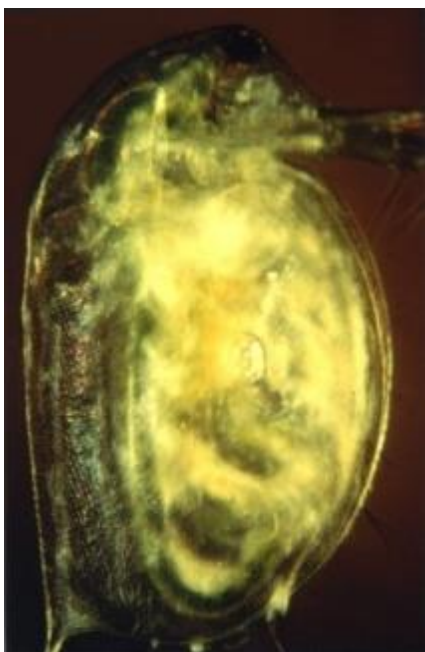
Perloočky mohou být infikovány oomycety např. z rodu *Aphanomyces* a *Saprolegnia* nebo oomycety z čeledi Pythiaceae (Wolinska et al. 2009).



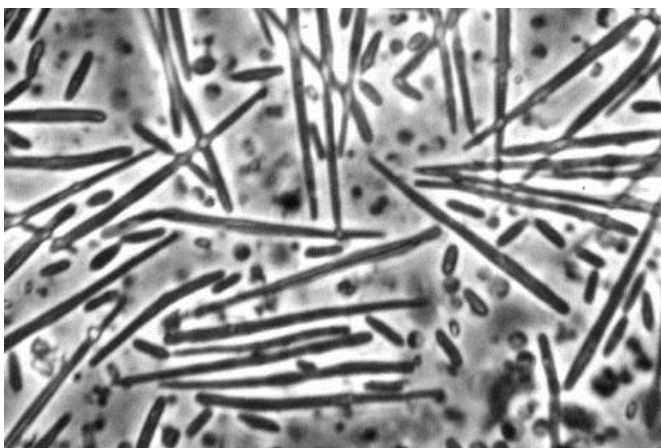
Obr. 4: Hlava perloočky, která je prorostlá myceliem oomycet (foto: Jana Hubová).

2.4.1.3 Kvasinka *Metschnikowia bicuspidata*

Metschnikowia bicuspidata patří mezi kvasinky (Ascomycota, Saccharomycotina). Tato kvasinka je extracelulární mikroparazit, jehož spory pronikají skrz střevní stěnu do hemolymfy hostitele (Ebert 2005; Ebert 2008). *M. bicuspidata* vytváří velké množství spor charakteristického jehličkovitého tvaru (obr. 5), které vyplňují celé tělo hostitele (Ebert 2008). Těla silně infikovaných perlooček mají bělavou barvu (obr. 6) (Ebert 2005). Infekce se přenáší horizontální cestou (Ebert 2008). Infikované perloočky mají redukovanou plodnost (až o 50 %) a životnost (Ebert 2005; Duffy & Hall 2008; Wolinska et al. 2011a) Úspěšná infekce zabíjí perloočku během 2 až 3 týdnů (Ebert 2005). Epidemie způsobená kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata* se často vyskytuje na podzim (Duffy & Hall 2008; Wolinska et al. 2011a).



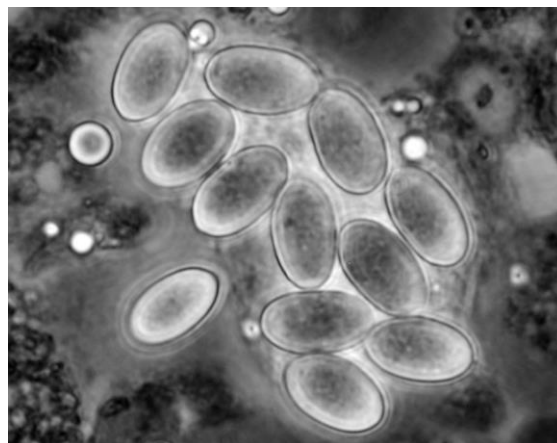
Obr. 6: Mléčné zabarvení těla infikované perloočky *D. magna* kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata* (převzato z Ebert 2005).



Obr. 5: Tvar spor kvasinky *Metschnikowia bicuspidata* (převzato z Ebert 2005).

2.4.1.4 Prvok *Caullerya mesnili*

Caullerya mesnili je parazitický prvok řazený do třídy Ichthyosporea (Lohr et al. 2010). Je to vnitrobuněčný parazit napadající střevní epitel hostitele (obr. 7), kde vytváří velké množství spor, které se shlukují do větších útvarů (obr. 8) (Ebert 2008; Wolinska & Spaak 2009). *C. mesnili* je vysoce virulentní, s prevalencí dosahující až 45 % (Wolinska et al. 2007a). Infikované perloočky mají silně sníženou plodnost (až o 95 %) a životnost (Little & Ebert 1999; Wolinska et al. 2007a). Na rozdíl od výše zmiňovaných parazitů neovlivňuje tato infekce průhlednost těla perlooček (Ebert 2005). Infekce se mezi jedinci přenáší horizontální cestou, spory parazita odchází ze střeva hostitele se zbytky potravy (Ebert 2008).



Obr. 8: Tvar spor prvoka *Caullerya mesnili* (převzato z Ebert 2005).

Obr. 7: Perloočka *D. galeata* infikována *C. mesnili* (foto: Petr Jan Juračka). U nakažené perloočky lze pozorovat velké množství spor parazita ve střevním epitelu; spory jsou graficky upraveny a zvýrazněny modrou barvou.

2.4.2 Koevoluce v systému perloočka-parazit

Tito nejčastěji studovaní mikroparaziti perlooček obvykle nepotřebují ve svém životním cyklu dalšího mezipřehostitele (vyjma řady mikrosporidií), navíc mikroparaziti mají krátkou generační dobu, která jim umožňuje rychlou reakci na evoluci rezistence hostitelů (Ebert 2008). Antagonistická interakce mezi perloočkou a parazitem vede ke vzniku rychlé koevoluční dynamiky (Ebert 2008; Hamilton 1980). Paraziti tedy mohou na své hostitele vytvářet časově zpožděnou, negativně frekvenčně závislou selekci, která vyúsťuje v oscilaci genové frekvence jak u parazita, tak i u hostitele, což je v souladu s hypotézou Červené královny (Dybdahl & Lively 1998; Wolinska & Spaak 2009). To znamená, že paraziti jsou schopni s časovým zpožděním sledovat nejčastější hostitelské genotypy, tyto genotypy mohou být následně silně infikovány a vzácné genotypy perlooček mohou převládnout. Obrat v interakci perloočka-parazit je v tomto systému obzvláště rychlý a úzce specifický (Wolinska & Spaak 2009). To dokazuje i studie několika druhů perlooček a jejich parazitů, kdy v rámci pouhých 7 dní frekvence nejčastějších hostitelských klonů, které byly pod silnou infekcí, klesla a frekvence dříve vzácných a málo infikovaných klonů se zvýšila (Little a Ebert 1999).

Systém perloočka-parazit tedy představuje výborný model pro studium koevoluce (Ebert 2008; Lampert 2011). Detailněji se tomuto tématu věnuji ve své bakalářské práci (Hubová 2010).

2.4.3 Vztah parazite k plodnosti a přežívání perlooček

Je tedy evidentní, že paraziti hrají důležitou roli (společně s kompeticí a predací) při regulaci hostitelské populační dynamiky (Anderson & May 1982; Thomson 1994). Paraziti tedy ovlivňují nejenom zranitelnost perlooček k predaci, jejich migrační a filtrační chování, ale zejména mají vliv i na jejich plodnost a přežívání (Ebert 2005; Lampert 2011).

Perloočky nosí své potomky v plodové komůrce po několik dní, než je při svlékání karapaxu uvolní do vodního prostředí. Partenogenetická vajíčka jsou u perlooček také snadno pozorovatelná. Proto je velikost snůšky nejvhodnější a nejčastěji sledovaný znak ve spojitosti s parazitací (Ebert 2005). Řada studií se zabývá právě vlivem parazitů na plodnost a přežívání perlooček. Tyto studie ukazují, že počet vajíček ve snůšce bývá u perlooček ovlivněn méně často než samotná přítomnost či absence celé snůšky (Decaestecker et al. 2005; Stirnadel & Ebert 1997). V mnoha případech mikroparaziti spíše hostitelskou plodnost potlačí úplně a perloočku kastrují, než by redukovali velikost její snůšky (Ebert 2005; Stirnadel & Ebert 1997). To potvrzují i výsledky práce Wolinska et al. (2004), kdy pouze 2,4 % dospělých

samiček perlooček *Daphnia longispina* x *galeata* nakažených prvokem *Caullerya mesnili* měly snůšku s vajíčky, ve srovnání se zdravými samičkami. Příkladem dalšího mikroparazita, který způsobuje u perlooček kastraci, je často studovaná bakterie *Pasteuria ramosa* (Ebert 2005). Kastrace hostitele je pro parazita výhodnější strategií. Kastrovaný hostitel vkládá své zdroje do přežívání, nikoli do reprodukce, a může tak produkovat a šířit více parazitických stádií po delší dobu (Ebert 2005; Stirnadel & Ebert 1997). Naopak někteří paraziti zabíjí svého hostitele velmi rychle, např. bakterie způsobující infekci označovanou jako White Fat Cell Disease. Tato infekce silně redukuje jak plodnost, tak i přežívání (Ebert 2005; Lampert 2011). Široké spektrum střevních mikrosporidií volí mírnější strategii a redukují celkovou zdatnost perlooček jen o 15 až 20 % (Ebert 2005).

Přežívání infikovaných perlooček může být také ovlivněno environmentálními podmínkami (Lampert 2011).

2.4.4 Vliv environmentálních faktorů a sezonní dynamika napadení parazity

Teplota a potravní nabídka jsou jedním z hlavních faktorů, které mohou ovlivnit fyziologii a chování perlooček a parazitů (Spaak & Hoekstra 1995; Schoebel et al. 2011). Jak ukázaly laboratorní experimenty, vyšší podíl perlooček byl infikován prvokem *Caullerya mesnili* při teplotě 12 °C než při teplotě vyšší (Schoebel et al. 2011). Těmto výsledkům odpovídá i výskyt *Caullerya mesnili* a kvasinky *Metschnikowia bicuspidata* v přírodních populacích, kdy vyšší výskyt infekce byl za nižší teploty (Duffy & Hall 2008; Schoebel et al. 2011; Wolinska et al. 2011a). Opačný trend ve vztahu k teplotě měl výskyt infekcí způsobených mikrosporidii, jenž byly zaznamenány při teplotách vyšších (Wolinska et al. 2004).

Hall et al. (2009) publikovali matematický model, který popisuje dynamiku interakce hostitel-parazit v souvislosti s různou teplotou a úrovní potravní nabídky. Za extrémně nízkých potravních podmínek strádají perloočky, ale i paraziti. Plodnost perlooček je nízká, stejně tak jako produkce parazitických spor. Epidemie by měla být omezena kvůli limitacím zdrojů (Hall et al. 2009). Pokud je potravní nabídka střední či vysoká, nastává interakce obou faktorů: teploty i potravy (Hall et al. 2009). V létě je potravní nabídka pro perloočky nízká či nevhodná (perloočky strádají), ale vysoká teplota vody podporuje produkci spor parazitů, obojí by mělo zvýhodňovat vysokou prevalenci parazita a přenos infekce. Na podzim vysoká kvalita potravy inhibuje přenos infekce a nízká teplota redukuje produkci spor, což by mělo vést k ukončení epidemie. Pokud je kvalita potravy vysoká, paraziti produkují více spor a

perloočky více zdravých potomků, kteří by mohli být infikováni. Nicméně experimentální studie ukázaly, že za dobrých potravních podmínek infikované samičky rostly do větších velikostí a produkovaly více parazitických spor, ale na druhou stranu perloočky, které měly více potravy, byly méně často infikovány. To může být důsledek nižší filtrační míry při vyšší potravní nabídce nebo zvýšené odolnosti perlooček (Hall et al. 2009).

Tento model potvrzuje i terénní studie populace perlooček nakažené kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata*. Epidemie způsobená kvasinkou začala, když byla kvalita potravy pro perloočky nízká a vrcholila v září (Hall et al. 2009). Stejný výskyt infekce *M. bicuspidata* a oomycetů byl zjištěn v českých přehradních nádržích, kdy prevalence kvasinky *M. bicuspidata* byla na začátku podzimu (Wolinska et al. 2011a). Změna v biomase fytoplanktonu se promítla jako změna ve vzrůstu průhlednosti vody od přítoku k hrázi. Prevalence *M. bicuspidata* a oomycetů se zvýšila s rostoucí průhledností vody, tzn. vyšší prevalence parazitů byla za nízkých potravních podmínek, což odpovídá i laboratorním experimentům (Hall et al. 2009).

V mnoha velkých eutrofních jezerech mají perloočky a fytoplankton dvě populační maxima - jarní a letní (Ebert 2005). Přenos parazitů je často závislý na hustotě hostitelské populace, proto je obvykle prevalence parazitů velmi nízká či nulová během zimy a na začátku jara, ale naroste po jarním vrcholu abundance perlooček a dosahuje maxima během léta (Lampert 2011).

2.4.5 Heterogenní prostorová distribuce mikroparazitů

Environmentální faktory tedy ovlivňují výskyt a trvání epidemie. Místa s rozdílnými environmentálními podmínkami by mohly vykazovat rozdílnou míru infekce a heterogenní distribuci mikroparazitů. Tato hypotéza byla také potvrzena ve studii 11 českých přehradních nádrží (Wolinska et al. 2011a). Jak již bylo v úvodu zmíněno, tyto údolní nádrže jsou charakteristické přítomností abiotických a biotických gradientů na horizontální a vertikální ose nádrže. Gradient dostupnosti potravy a gradient predačního tlaku ovlivňují prostorovou distribuci jednotlivých druhů perlooček druhového komplexu *Daphnia longispina* (Petrušek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a). V těchto nádržích vykazovaly i jednotlivé skupiny mikroparazitů odlišnou prostorovou distribuci (Wolinska et al. 2011a).

Výskyt prvoka *Caullerya mesnili* byl vyšší v horních oblastech nádrže. Kvasinka *Metschnikowia bicuspidata* a oomycety byly častější ve střední a dolní části přehradní nádrže. Mikrosporidie byly jedinou skupinou parazitů, která se vyskytovala rovnoměrně ve všech

zkoumaných nádrží i v rámci jedné nádrže (nicméně složení mikrosporidií se mezi některými nádržemi lišilo) (Wolinska et al. 2011a; Weigl et al. 2012). To může být dáno způsobem přenosu této infekce. Nejčastější mikrosporidie v přehradních nádržích je druh označovaný v literatuře jako *Berwaldia schaefernai* (ve skutečnosti se jedná o jiný taxon; J. Vávra, os. sdělení), u nějž se předpokládá přenos sekundárním hostitelem - hmyzem s vodním larválním stádiem. Přenos skrz létající hmyz může být důvodem homogenního rozšíření infekce (Wolinska et al. 2011b).

Výskyt *Caullerya mesnili* byl vyšší u přítoku. V této oblasti mají perloočky lepší potravní podmínky. Prevalence *C. mesnili* také rostla s rostoucí hostitelskou hustotou. Naopak prevalence *M. bicuspidata* a oomycet rostla při nižším obsahu řas, tj. horších potravních podmínkách pro perloočky (Wolinska et al. 2011a). Gradient predačního tlaku ze strany ryb se snižuje od přítoku k hrázi (Prchalová et al. 2008, 2009). Infekce kvasinkou *M. bicuspidata*, mikrosporidii a oomycety způsobují zabarvení těla perlooček a tím je více zviditelnějí pro ryby. Prevalence infekce způsobené těmito parazity klesá s rostoucím predačním tlakem (Duffy & Hall 2008). Prvok *C. mesnili* neovlivňuje průhlednost těla perlooček a tudíž se tato infekce vyskytuje hlavně v oblasti přítoku, kde je sice větší výskyt ryb, ale infekce se může šířit mezi zdravými jedinci perlooček (Wolinska et al. 2011a).

Pro vertikální distribuci mikroparazitů byla navržena hypotéza, která předpokládá, že ve větších hloubkách vodního sloupce je u perlooček rodu *Daphnia*, které vykazující diurnální vertikální migraci, větší výskyt infekce. Sediment nádrží slouží jako zásobárna parazitických spor a dormantních stádií perlooček. U perlooček, které sestupují do nižších vrstev vodního sloupce k blízkosti sedimentu, aby se vyhnuly predátorům, je vyšší pravděpodobnost, že se sporami infikují (Decaestecker et al. 2002). Prazitické oomycety se častěji nacházely u perlooček z větších hloubek. Nicméně tento model byl formulován pro mělké vodní plochy, kde migrující perloočky skutečně sestupují ke dnu, v českých přehradních nádržích navíc diurnální vertikální migrace perlooček r. *Daphnia* nebyla pozorována (Seďa et al. 2007b).

Jestliže ryby představují pro přenos oomycet slepou uličku, může být migrace nakažených perlooček do nižších vrstev výhodná pro šíření parazita. V nižších hloubkách je menší predační tlak a paraziti se mohou tedy šířit mezi perloočkami (Prchalová et al. 2008). Pokud by naopak sloužily ryby jako alternativní hostitelé, únik perlooček do nižších vrstev může způsobit pokles přenosu infekce. Je také možné, že infikované perloočky jsou ve špatném fyziologickém stavu a mohou pasivně klesat do hlubších vrstev (A. Petrušek, os. sdělení). Nicméně vizuálně lovící ryby mohou selektivně vyžírat infikované perloočky z horních vrstev vodního sloupce, což může vést ke vzrůstu prevalence v nižších vrstvách

(Duffy & Hall 2008). Pokud sediment přehradních nádrží slouží jako zásobárna infekčních spor parazitů (Decaestecker et al. 2002), mohou být perloočky žijící u dna (Sed'a et al. 2007b) vystaveny většímu riziku infekce a být častěji parazitovány než perloočky z horních vrstev (Wolinska et al. 2011a).

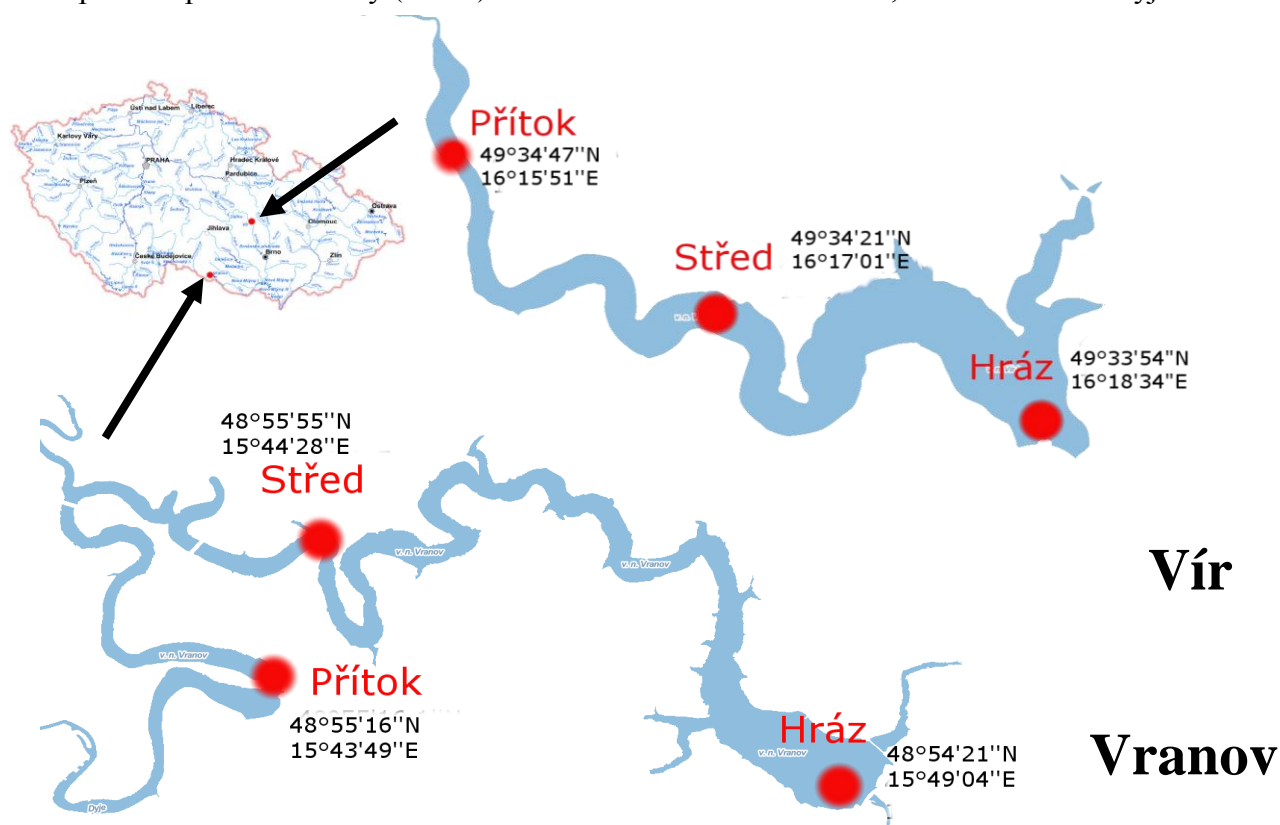
Prostorová distribuce parazitů je tedy výsledkem kombinace tzv. *bottom-up* (potrava) a *top-down* (predace) efektů (Wolinska et al. 2011a).

3 METODIKA PRÁCE

Má diplomová práce byla vypracována v rámci grantu Grantové agentury AV ČR IAA600960901 Hybridní zóny v pelagiále nádrží: faktory zodpovědné za lokální dominanci mezidruhových hybridů perlooček r. *Daphnia*. Tento projekt probíhal pod vedením dr. Jaromíra Sedi z Hydrobiologického ústavu Akademie věd ČR a ve spolupráci s týmem dr. Justiny Woliňské z Ludwig-Maximilians-Universität v Mnichově.

3.1 Zkoumané přehradní nádrže

Pro účel mé diplomové práce jsem zpracovávala zejména vzorky zooplanktonu odebrané na přehradních nádržích Vír a Vranov (podrobný seznam odebraných vzorků viz níže kapitola Laboratorní určování mikroparazitů). Obě přehradní nádrže mají kaňonovitý profil a patří do povodí Moravy (obr. 9). Vír se nachází na řece Svatce, Vranov na řece Dyji.



Obr. 9: Mapa ČR. Kaňonovité přehradní nádrže Vír a Vranov. Na jednotlivých přehradních nádržích jsou označena odběrová místa: přítok, střed, hráze a jejich souřadnice.

Dříve vybudovaná Vranovská přehrada je přibližně dvakrát delší a s dvojnásobně větší plochou a objemem vody než přehrada Vír. Přehrada Vír má ovšem delší teoretickou dobu zdržení vody, větší maximální hloubku u hráze a nachází se ve vyšší nadmořské výšce než přehradní nádrž Vranov (Broža et al. 2005; Petrušek et al. 2008a; <http://www.prehrady.cz/>) (tab. 1).

Přehrada	Vodní tok	Plocha povodí (km ²)	Začátek provozu	Délka přehrady od přítoku k hrázi (km)	Výška hráze nad dnem (m)	Teoret. doba zdržení (dny)	Prům. průtok (m ³ /s)	Kóta koruny hráze (m. n. m.)	Celkový objem (mil. m ³)	Max. zatopená plocha (ha)
Vír	Svratka	410,5	1958	8	66,2	166	3,607	471,00	56,193	223,6
Vranov	Dyje	2211	1934	18	47	134	9,74	353,94	132,7	761,3

Tab. 1: Základní vodohospodářské údaje pro přehradní nádrže Vír a Vranov (upraveno podle Broža et al. 2005; Petrušek et al. 2008a; <http://www.prehrady.cz/>).

Přehradní nádrž Vír plní tyto účely (Broža et al. 2005; <http://www.prehrady.cz/>):

- zásobení vodou pro skupinový vodovod Bystřice nad Pernštejnem, Žďár nad Sázavou, Vířský oblastní vodovod
- nadlepšení min. průtoku na 2,5 m³/s
- snížení povodňových průtoků
- odběry pro závlahy
- energetické využití

Vranovská přehradní nádrž je typickým příkladem víceúčelové vodní nádrže, slouží pro:

- zásobení vodou pro skupinový vodovod Vranov, Mor. Budějovice, Dukovany, Znojmo
- zajištění průtoku v Dyjsko-mlýnském náhonu od Krhovického jezu
- nadlepšení min. průtoku na 4,3 m³/s
- odběry pro závlahy
- výrobu elektrické energie
- snížení povodňových průtoků
- rekreaci a plavbu
- rybářství

3.2 Terénní odběry vzorků

Odběry vzorků na obou vybraných přehradních nádržích probíhaly v letech 2009 a 2010. Vzorky byly odebírány zejména v období růstové sezony zooplanktonu tj. od května do září. Další odběry probíhaly na přelomu podzimu a zimy, aby byly pokryty sezonní změny v pelagiále nádrže (seznam vzorků viz Příloha II). Některých odběrů jsem se také sama účastnila (obr. 10).

Stanoviště pro odběry vzorků byly zvoleny u obou přehradních nádrží tak, aby se daly zachytit změny způsobené gradienty na podélné ose nádrže, tj. vzorkování probíhalo vždy na třech stanovištích: přítok, střed a hráz (obr. 11) (přesné souřadnice jednotlivých stanovišť jsou uvedeny výše na obr. 9). (Dále v textu je výraz „stanoviště“ použit jako označení odběrového místa přítok, střed, hráz v rámci přehradní nádrže). U opakovaných odběrů se poloha stanoviště přítok mírně lišila, záleželo na stavu vody ve vybraném měsíci (metodika odběrů uvedená také v pracích: Petrušek et al. 2008a; Sed'a et al. 2007a).

Na každém stanovišti bylo změřeno několik parametrů charakterizujících environmentální gradienty. Na vertikálním profilu byly pomocí měřicích sond zaznamenány gradienty teploty a množství rozpuštěného kyslíku (viz Příloha III).

Pomocí Secchiho desky nebo bílé planktonní sítě byla na daném stanovišti stanovena průhlednost vody. Také byly odebírány, ponořením malých PE lahvíček pod hladinu, vzorky vody pro laboratorní určení množství chlorofylu a celkového fosforu ve vodě. Stanovení chlorofylu a bylo použito k odhadu gradientu potravní nabídky pro filtrující perloočky. Na obou přehradních nádržích sinice často vytváří vodní květ, který silně ovlivňuje množství chlorofylu v horní vrstvě epilimnia. Filtrující zooplankton ovšem využívá takto velký partikulovaný fytoplankton jako svou potravu velmi málo. Z tohoto důvodu byly odebírány také vzorky vody přefiltrované přes síť s velikostí ok 40 μm (k zachycení koloniálních řas označovaných jako síťový fytoplankton). Množství fytoplanktonu bylo stanoveno v laboratoři fluorimetricky po extrakci pigmentů do acetonu (výsledná data uvedena v Příloze IV). Celkový fosfor byl měřen kolorimetricky po působení kyseliny chloristé podle metodiky Kopáčka a Hejzlara (1993) (výsledná data uvedena v Příloze IV).

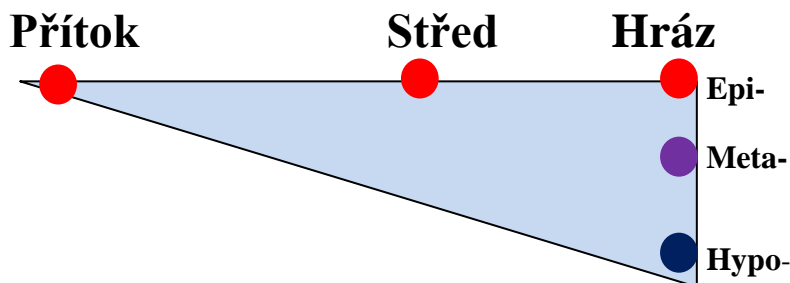
Na každém stanovišti byly odebírány vertikálními tahy vzorky planktonu z celého vodního sloupce pomocí jedné z následujících planktonních sítí: o průměru 240 mm a velikostí ok 140 μm , 310 mm a velikostí ok 200 μm , 400 mm a velikostí ok 175 μm . Vzorky

zooplanktonu sloužící pro morfologickou analýzu a výskyt parazitů byly fixovány v 96% etanolu.

Pokud byl vodní sloupec na stanovišti hráz (kde je největší hloubka) teplotně stratifikován, byly také odebírány odděleně vzorky planktonu z epi-, meta-, hypolimnia pomocí stahovací planktonní sítě (obr. 11). Hranice jednotlivých vrstev vodního sloupce byly určeny na místě dle naměřené teploty a množství rozpuštěného kyslíku v každém metru hloubky (konkrétní vertikální profily teplot a rozpuštěného kyslíku viz Příloha III).



Obr. 10: Terénní odběr vzorků u hráze přehradní nádrže Želivka.



Obr. 11: Stanoviště oděrů na horizontální a vertikální ose nádrže.

Vzorky byly odebírány na stanovištích přítok, střed a hráz. Na stanovišti hráz byly také odebírány vzorky z epi-, meta- a hypolimnia.

3.3 Laboratorní určování mikroparazitů

Pro účel své diplomové práce jsem zejména zpracovávala celkem 46 dostupných vzorků planktonu z 11 odběrových termínů (tab. 2). Vzorky pocházely:

- z přehradní nádrže Vír z r. 2009 (květen) a z r. 2010 (červenec, listopad)
- z přehradní nádrže Vranov z r. 2009 (květen, červen, červenec) a z r. 2010 (červen, červenec, říjen, listopad, prosinec)

Přehrada	Datum	Stanoviště
Vír	6.5.2009	přítok
		střed
		hráz E,M,H
	27.7.2010	přítok
		střed
		hráz E,M,H
	2.11.2010	přítok
		střed
		hráz
Vranov	7.5.2009	přítok
		střed
		hráz E,M,H
	10.6.2009	přítok
		střed
		hráz E,M,H
	22.7.2009	přítok
		střed
		hráz E,M,H

Přehrada	Datum	Stanoviště
Vranov	10.6.2010	přítok
		střed
		hráz E,M
	21.7.2010	přítok
		střed
		hráz E,M,H
	1.10.2010	přítok
		střed
		hráz
3.11.2010	přítok	
	střed	
	hráz	
10.12.2010	přítok	
	střed	
	hráz	

Tab. 2: Přehled vyhodnocovaných vzorků. Vzorky byly odebírány v letech 2009 a 2010 na přehradních nádržích Vír a Vranov. Pro každé datum byla zvolena 3 stanoviště: přítok, střed, hráz. Pokud byl vodní sloupec v oblasti hráze stratifikovaný, odebíraly se zvlášť vzorky zooplanktonu z epi- (hrázE), meta- (hrázM) a hypolimnia (hrázH).

Ze všech výše vypsáných vzorků planktonu (fixovaných v etanolu), jsem v laboratoři náhodně vybírala 100 dospělých samiček perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina*. Pouze ve třech vzorcích planktonu nebylo dostatečné množství perlooček. Jednalo se o tyto vzorky:

- Vír – hráz hypolimnion – 6. 5. 2009 (celkem ve vzorku 7 dospělých perlooček)
- Vír – přítok – 2. 11. 2010 (celkem ve vzorku 58 dospělých perlooček)
- Vranov – hráz metalimnion – 10. 6. 2009 (celkem ve vzorku 87 dospělých perlooček)

K zjištění přítomnosti a identifikaci parazitů jsem vyšetřila celkem 4452 dospělých samiček perlooček.

3.3.1 Postup při určování mikroparazitů

Všechny vybrané samičky perlooček jsem pozorovala pomocí stereomikroskopu Olympus SZX12 se zvětšením: objektiv 1,5 krát a zoom 85,5 krát. Vzorky perlooček byly fixovány v 96% etanolu, který jsem použila také jako médium během pozorování.

Jednotlivé skupiny mikroparazitů napadají rozdílnou část těla perlooček (viz níže) a jejich symptomy jsou pozorovatelné pod různým zvětšením. K určení nákazy jsem tedy potřebovala s každou perloočkou manipulovat (popřípadě ji rozpitvat) pomocí preparační jehly či entomologické pinzety. Prozkoumání jedné perloočky trvalo delší dobu a mezitím se etanol z podložního sklíčka rychle vypařoval, proto jsem pro svou práci zvolila podložní sklíčko s plastovým rámečkem na obvodu (sloužící jako počítací komůrka). Při práci s tímto sklíčkem je důležité zvolit správné množství etanolu. Pokud je ho použito více, a pozorované perloočky v něm volně plavou, je obraz mírně zkreslen a rozostřen. Etanolu by mělo být použito takové množství, aby se vybrané perloočky nepohybovaly, ale by zároveň nedocházelo k jeho veškerému odpaření a vysychání perlooček. Sklíčko s rámečkem mi také umožnilo pracovat s několika desítkami perlooček najednou. To je výhodné pro prvotní roztrídění infikovaných jedinců a následné porovnávání symptomů. Z tohoto důvodu také doporučuji symptomy mikroparazitů pozorovat pomocí stereomikroskopu. Práce pomocí mikroskopu je při velkém počtu zkoumaných jedinců velice náročná a zdlouhavá (kvůli zrcadlově převrácenému obrazu pozorovaného objektu).

U každé zkoumané perloočky jsem nejprve zaznamenávala počet vajíček ve snůšce. Samičky s efipiem (kterých nicméně bylo jen velmi málo) nebyly zahrnuty do analýzy. Počet efipiálních samiček uvádím v tab. 3 v kapitole Výsledky práce.

Dále jsem u všech perlooček zjišťovala a zaznamenávala přítomnost následujících 4 skupin parazitů:

- mikrosporidie
- oomycety (Hyfy oomycet se nejčastěji rozrůstají do celého těla perlooček ze dvou oblastí: z oblasti hlavy nebo z plodové komůrky perlooček. V textu níže uvádím detailní popis obou případů.)
- prvok *Caullerya mesnili* ze skupiny Ichthyosporea (= Mesomycetozoea)
- kvasinka *Metschnikowia bicuspidata*

Rozlišit tyto skupiny parazitů jsem se učila u Dr. Justyny Wolińské na Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) v Mnichově. Vzhledem k tomu, že identifikace parazitární infekce pomocí stereomikroskopu není snadná (jak při větším zvětšení, které umožňují mikroskopy), bylo třeba mé určovací znalosti posílit. Určování parazitů jsem tedy nejprve prováděla na několika vzorcích perlooček získaných stejným způsobem z odběrů z přehradní nádrže Želivka z dat 3. - 5. 8. 2009. Vzorky byly odebírány na 6 stanovištích na podélném gradientu nádrže (přítok, Vojslavice, Zahrádka, střed, most, hráz – epilimnion). Z každého vzorku jsem stejným způsobem vyšetřovala 100 perlooček na přítomnost parazitů. Tato data mi posloužila k porovnání přítomnosti parazitů s analyzovanými vzorky z přehradních nádrží Vír a Vranov (viz níže v kapitole Diskuze) a zejména k potvrzení, zda jsem schopná u perlooček parazity skutečně spolehlivě odhalit.

Níže uvádím detailnější popis z pozorování vybraných skupin parazitů. Symptomy jednotlivých infekcí jsou zachyceny na fotografiích (obr. 12-16), jedná se o reálný obraz mikroparazitů pozorovaných pod stereomikroskopem (k porovnání s fotografiemi pořízenými mikroskopem uvedenými v kapitole Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*).

3.3.2 Úskalí a doporučení při určování mikroparazitů

3.3.2.1 Prvok *Caullerya mesnili*



Obr. 12: *Caullerya mesnili*. Shluky hroznovitých spór napadajících střevní epitel perloočky.

Caullerya mesnili tvoří charakteristické sférické shluky malých spor (obr. 12). *C. mesnili* napadá střevní epitel a hepatopankreatický výběžek perlooček. Jednotlivé spory nezpůsobují žádné barevné zbarvení hostitele, pokud nejsou ve velkých shlucích, je těžké je odhalit. K určení této infekce jsem vždy potřebovala největší zvětšení stereomikroskopu (zoom 85,5x). Spory mají také jiný lom světla, trénovanému pozorovateli se mohou jevit jako „lesknoucí se“ místa uvnitř střevního epitelu perloočky.

3.3.2.2 Oomycety (napadající oblast hlavy perloočky)



Obr. 13: Oomycety. Detail hlavy perloočky, která je prorostlá parazitickým myceliem.

Oomycety napadající oblast hlavy perloočky je možné rozeznat i pod malým zvětšením stereomikroskopu. Pokud se infekce rozvine do pokročilého stádia a mycelium proroste celým tělem perloočky, je netypicky vypadající perloočka rozpoznatelná pouhým okem. Většina perlooček ve vzorku nebyla tak průhledná jako na fotografii (obr. 13). Myslím si, že pro začínajícího pozorovatele může být těžké rozpoznat malé, nerozvinuté mycelium v hlavové oblasti od očních a antenálních svalů perlooček.

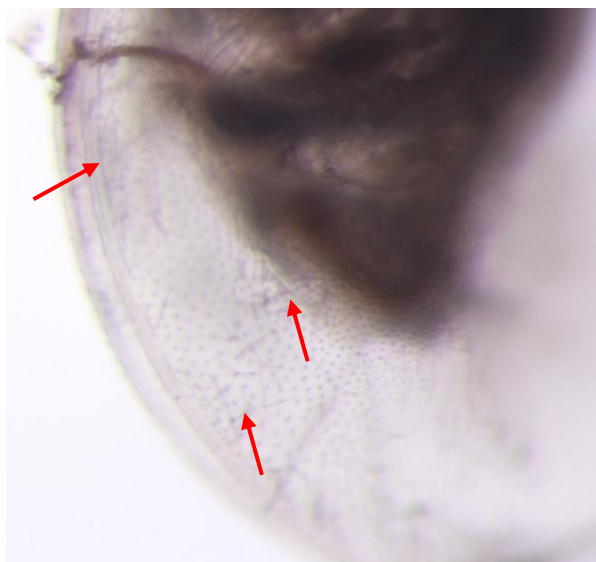
3.3.2.3 Oomycety (napadající oblast snůšky perloočky)



Obr. 14: Oomycety. Detail dorsální části těla perloočky s plodovou komůrkou, která je prorostlá parazitickým myceliem.

U infikovaných sameček byla vždy snůška prorostlá či zdeformovaná myceliem tak, že nešlo určit přesný počet vajíček perloočky. Vajíčka tvořila jeden velký tmavý shluk uvnitř plodové komůrky. Na obr. 14 parazitické mycelium prorůstající skrz celý prostor plodové komůrky perloočky, která však nemá žádná vajíčka. Toto mycelium se rozrůstalo z hlavové oblasti (která byla silně parazitována). V pokročilém stádiu infekce je myceliem prorostlé celé tělo perlooček a je těžké určit, z které oblasti těla perloočky se mikroparazit rozrůstá.

3.3.2.4 Kvasinka *Metschnikowia bicuspidata*



Obr. 15: *Metschnikowia bicuspidata*. Detail ventrální části karapaxu v oblasti postabdomenu. Spory parazita se jeví jako malé jehličky.

K určení této infekce jsem vždy potřebovala největší zvětšení stereomikroskopu (zvětšení 85,5x). Jehličkovité spory nezpůsobují žádné zbarvení svého hostitele (silně rozvinutá infekce již způsobí mléčné zbarvení těla). Pokud je perloočka průsvitná a bez jakéhokoliv zbarvení (způsobeného např. fixací), lze tuto infekci rozpoznat jako nepravidelné „čárkování“ v karapaxu perlooček (obr. 15). Pokud jsem ve vzorcích tuto infekci u perlooček objevila, vždy se spory shlukovaly ve větším množství

v oblasti rostra perloočky (pod složeným okem) a ve spodní ventrální části karapaxu (oblast postabdomenu, na bázi spiny). Je-li tělo perloočky neprůhledné, je nalezení spor obtížné. Pro kontrolu také doporučuji prohlížet perloočky s bočním osvětlením, spory jsou následně pozorovatelné s mléčným zbarvením.

3.3.2.5 Mikrosporidie



Obr. 16: Mikrosporidie. Celkový pohled na infikovanou perloočku. Spóry tvoří tmavou masu podél střeva perloočky.

Odhalení mikrosporidiální infekce mi činilo během práce problémy. Pokud je perloočka průhledná a bez zabarvení způsobené fixací, lze rozvinutou infekci pozorovat již pouhým okem jako výrazný tmavý shluk uvnitř těla perloočky (obr. 16). Tato černá masa je nezaměnitelná a odpovídá uváděným popisům v literatuře. Bohužel ze všech zkoumaných perlooček jich bylo jen málo s tak průhledným tělem, jak uvádím na fotografii (obr. 16). Většina fixovaných perlooček byla tmavého zabarvení (v důsledku zakalení karapaxu), u kterého je velmi obtížné rozeznat, zda se jedná o zdravou perloočku, parazitovanou perloočku

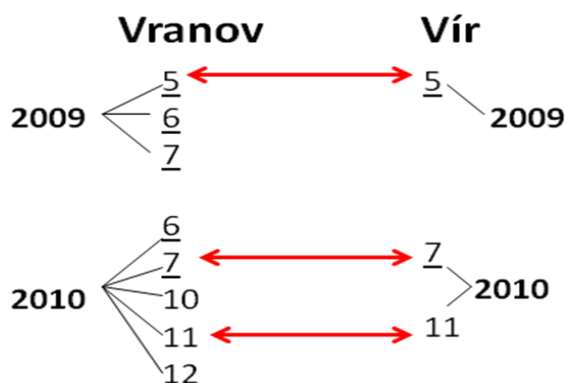
či o vliv fixace na vaječníky perloočky. Na tento problém jsem přišla během prohlížení prvních vzorků a následně jsem na něj musela na několik měsíců zaměřit. Bylo třeba, abych s jistotou dovedla pod stereomikroskopem určit mikrosporidiální infekci, bez nutnosti pitvy každé podezřelé perloočky. Pomocí pitvy pod mikroskopem lze odhalit hruškovité spory mikrosporidie. S mým počtem přesahujícím 4400 zkoumaných perlooček by byl tento postup značně časově náročný. Podrobný popis problematiky s určováním mikrosporidiální infekce uvádím v Příloze I.

3.3.3 **Fotografování perlooček**

K fotodokumentaci jednotlivých skupin parazitů či zdravých perlooček jsem používala digitální zrcadlový fotoaparát CANON EOS 650D s počítačovým programem Quick PHOTO CAMERA 3.0. Jednotlivé perloočky jsem fotografovala přes stereomikroskop na podložním sklíčku s rámečkem, na kterém jsem perloočky vyšetřovala. K zaznamenání symptomů u perlooček bylo potřeba, aby výsledná fotografie nakažené samičky odpovídala obrazu, který jsem viděla pod stereomikroskopem, zejména kvůli problému s určením mikrosporidiální infekce. Rozdíly mezi zdravou a potencionálně nakaženou perloočkou mikrosporidii nebyly z fotografie pořízené pomocí mikroskopu tak patrné, jako při použití stereomikroskopu.

3.4 Vyhodnocování dat

Pro analýzu dat o plodnosti perlooček (data o nakaženosti parazitů nebyla hodnotitelná statisticky kvůli malému počtu pozorování) byly využity vzorky z odběrových termínů z let 2009 a 2010 z přehradních nádrží Vranov a Víř. Konkrétní měsíce odběrů pro jednotlivé



nádrže a roky jsou zaznamenány ve schématu (obr. 17). Ze schématu lze vyčíst, že pouze měsíce: květen, červenec a listopad (odpovídající sezóně jaro, léto, podzim) byly odebírány na obou přehradních nádržích ve stejných letech (vyznačeno červenými šipkami).

Obr. 17: Konkrétní měsíce a roky odběrů vzorků na přehradní nádrži Vranov a Víř.

V odběrových měsících květen – červenec (ve schématu podtrženy) byl vodní sloupec tepelně stratifikován a vzorky u hráze byly brány z jednotlivých vrstev epi-, meta- a hypolimnia. Z každé jednotlivé vrstvy bylo vyšetřováno 100 náhodně vybraných perlooček (celkem 300 perlooček na celý vodní sloupec z oblasti hráze). V měsících říjen – prosinec, kdy nebyl vodní sloupec tepelně stratifikován, se vzorky zooplanktonu odebíraly tahem planktonní sítě z celého vodního sloupce, tzn. 100 vyšetřených perlooček na celý vodní sloupec ze stanoviště hráze.

Ze stanoviště přítok a střed bylo vyšetřováno po cca 100 perloočkách, kromě několika vzorků, kde byl celkový počet perlooček menší (viz kapitola Laboratorní určování mikroparazitů), případně kde se vyskytovaly efipialní jedinci (viz kapitola Výsledky práce). Pro relevantní srovnání bylo tedy potřeba použít obdobný počet perlooček také ze stanoviště hráze. Z celkového počtu 300 jedinců u odběrů stratifikovaného vodního sloupce bylo 100 jedinců náhodně vybráno (pomocí programu Excel) z jednotlivých vrstev.

U jednotlivých odběrů stratifikovaného vodního sloupce se však hloubky jednotlivých vrstev (epi-, meta- a hypolimnia) lišily a ze studie na 11 českých přehradních nádržích (Seďa et al. 2007a) je patrné, že v jednotlivých vrstvách stratifikovaného vodního sloupce se liší i abundance perlooček. V některých nádržích může být abundance perlooček v oblasti metalimnia dokonce vyšší než v epilimniu. Náhodný výběr 100 perlooček bylo tedy třeba vážit přes mocnosti jednotlivých vodních vrstev s využitím znalosti o abundanci perlooček

v jednotlivých vrstvách vodního sloupce. Bohužel jsem neměla k dispozici údaje o abundancích perlooček v jednotlivých vrstvách stratifikovaného vodního sloupce v oblasti hráze přímo pro dané odběrové dny, proto byla pro extrapolaci použita data získaná z přehradních nádrží Vír a Vranov v předchozím projektu (publikovaná v práci Sed'a et al. 2007a).

Data o plodnosti perlooček v jednotlivých vzorcích, resp. z jednotlivých stanovišť, byla následně použita pro testování vlivu několika faktorů na plodnost perlooček pomocí programu R (R: A Language and Environment for Statistical Computing; dostupného na: <http://www.r-project.org/>). Mezi tyto faktory patří: identita přehradní nádrže (Vír, Vranov), sezona (jaro, léto, podzim), stanoviště na horizontální ose (přítok, střed, hráz) a na vertikální ose nádrže (epi-, meta-, hypolimnion), resp. potravní nabídka. Byly provedeny následující analýzy:

Plodnost perlooček na vertikálním profilu přehradní nádrže

Pomocí hierarchické analýzy rozptylu (h-ANOVA) byl testován vliv pozice v jednotlivých vrstvách stratifikovaného vodního sloupce (epi-, meta-, hypolimnion), sezony (jaro, léto) a jejich interakce na plodnost perlooček. Do analýzy byly zahrnuty vzorky odebírané ze stanoviště hráz (z epi-, meta- a hypolimnia) z přehradních nádrží Vír a Vranov z odběrových termínů květen 2009 (reprezentující jarní sezonu) a červenec 2010 (reprezentující letní sezonu). Pouze v těchto obdobích probíhaly odběry vzorků ze stratifikovaného vodního sloupce zároveň u obou přehradních nádrží. Celkem bylo do analýzy zahrnuto 1095 perlooček.

Plodnost perlooček na horizontálním profilu přehradní nádrže

Pomocí hierarchické analýzy rozptylu (h-ANOVA) byl testován vliv pozice (stanoviště: přítok, střed, hráz) podél horizontální osy nádrže, vliv sezony (jaro, léto, podzim) a jejich interakce na plodnost perlooček. Do analýzy byly zahrnuty vzorky z přehradních nádrží Vír a Vranov ze stanovišť přítok, střed a hráz z následujících odběrových termínů: květen 2009 (jarní sezona), červenec 2010 (letní sezona) a listopad 2010 (podzimní sezona). V těchto termínech probíhaly odběry vzorků zároveň u obou přehradních nádrží. Celkem bylo do analýzy zahrnuto 1637 perlooček. Pro termíny, u kterých byly na stanovišti hráz odebírány

vzorky z jednotlivých vrstev stratifikovaného vodního sloupce, byly do analýzy použity náhodně vybrané podvzorky 100 perlooček (viz výše).

U výše uvedené analýzy byl použit faktor pozice (stanoviště: přítok, střed, hráz) v rámci horizontálního profilu nádrže. Pozice v rámci horizontální osy nádrže je ovšem jen ordinální vyjádření gradientů. Proto bylo také otestováno, zda model, v němž místo ordinálního vyjádření gradientů budou použita přímo data charakterizující gradient živin a potravní nabídky, bude vysvětlovat variabilitu v plodnosti perlooček lépe či hůře než model pracující s pozicí na horizontální ose nádrže. Cílem této analýzy bylo tedy použít faktor, který environmentální gradienty lépe popisuje. Tento faktor byl získán z analýzy hlavních komponent (PCA) z následující proměnných naměřených během terénních odběrů, jež vyjadřují gradient úživnosti, tedy potravní nabídku pro zooplankton: průhlednost, celkový fosfor, chlorofyl a. Analýza hlavních komponent byla spočítána pomocí programu STATISTICA verze 6.1 a první osa PCA byla použita jako souhrnná proměnná „potrava“. Tento faktor potenciálně lépe vystihuje environmentální prostředí daných lokalit na horizontální ose nádrže.

Podíl variability v datech o plodnosti, který lze vysvětlit pomocí výše uvedených faktorů a jejich interakcí, byl vypočítán v prostředí R pomocí smíšeného lineárního modelu (LMER) se zachovanou hierarchií dat. Vysvětlená variabilita byla vyjádřena jako korigovaný koeficient determinace ($\text{adj}R^2$). V první analýze byly jako faktory použity: identita nádrže, sezona a poloha v nádrži (stanoviště), ve druhé analýze byl místo faktoru stanoviště v nádrži použit faktor potrava.

4 VÝSLEDKY PRÁCE

Výskyt mikroparazitů u perlooček rodu *Daphnia*

Ze všech 46 odebraných vzorků zooplanktonu (z 11 odběrových termínů) z přehradních nádrží Vír a Vranov jsem náhodně vybírala po 100 dospělých samičkách perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* k určení přítomnosti 4 skupin mikroparazitů. U každé zkoumané perloočky jsem nejprve zaznamenávala počet vajíček ve snůšce. Z celkového počtu 4452 vyšetřovaných samiček jsem pouze u 26 z nich zaznamenala v plodové komůrce efipium. Tyto samičky nebyly následně zahrnuty do statistických analýz ke zjištění vlivu environmentálních faktorů na plodnost perlooček. Počet efipiálních samiček uvádím v tabulce č. 3.

Přehrada	Datum	Stanoviště	Počet efip. samiček.
Vír	6.5.2009	všechna	0
	27.7.2010	střed	5
	2.11.2010	hráz	1
Vranov	7.5.2009	hráz H	1
	10.6.2009	střed	1
		hráz H	1
	22.7.2009	střed	2
	10.6.2010	všechna	0
	21.7.2010	všechna	0
	1.10.2010	přítok	4
	3.11.2010	přítok	3
	10.12.2010	přítok	3
střed		2	
	hráz	3	

Tab. 3: Počet samiček s efipiem. V tabulce je vypsáno všech 11 odběrových termínů z let 2009 a 2010 z přehradní nádrže Vír a Vranov. U každého odběru je v posledním sloupci tabulky zaznamenán počet efipiálních samiček ze 100 zkoumaných. U odběrů, kde se vyskytla samička s efipiem je rozepsané také stanoviště na podélné ose nádrže.

Z celkového počtu 26 efipiálních samiček se jich nejvíce vyskytovalo ve vzorcích z podzimních odběrů – celkem 11 samiček s efipiem. Celkově však byl podíl efipiálních jedinců ve vzorcích zanedbatelný.

Následně jsem u všech perlooček zjišťovala přítomnost mikroparazitů: prvok *Caullerya mesnili*, kvasinka *Metschnikowia bicuspidata*, mikrosporidie a oomycety. Z celkového počtu 4452 vyšetřených jedinců jsem infekci zaznamenala pouze u 56 perlooček: 29 infikovaných mikrosporidií, 13 infikovaných oomycety, 11 infikovaných prvokem *Caullerya mesnili* a 3 infikované kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata*. Tento nízký počet dle všeho nebyl způsoben tím, že bych parazity nebyla schopna v hostitelích odhalit (viz Diskuze).

V tabulce č. 4 níže uvádím seznam všech odběrových termínů a míst v rámci horizontální a vertikální osy nádrže pro přehradní nádrže Vír a Vranov se zaznamenaným počtem perlooček, u kterých jsem pozorovala výskyt dané infekce. Nízký počet infikovaných perlooček nebyl relevantní k původním plánovaným analýzám, proto zde uvádím jen slovní hodnocení trendů, které jsem při práci s infikovanými perloočkami pozorovala a které lze vyčíst z uvedené tabulky.

Výskyt mikroparazitů byl vyšší ve středních oblastech nádrže a v oblastech u hráze. Parazitické mikrosporidie byly rozšířeny po celé délce nádrží. Oomycety jsem zaznamenala převážně u vzorků ze stanovišť střed a hráz. U hráze se jednalo vždy o vzorky z oblasti meta- a hypolimnia.

Největší výskyt mikroparazitů jsem zaznamenala u letních vzorků, zejména mikrosporidií a oomycet. U jarních a zimních vzorků jsem nezaznamenala ani jeden výskyt infekce prvokem *Caullerya mesnili* a kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata*. Všechny infikované perloočky kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata* pocházely pouze z podzimních vzorků.

Infekci způsobenou oomycety jsem většinou zaznamenala u perlooček, které měly větší počet vyvinutých vajíček ve snůšce. Naopak perloočky infikované prvokem *Caullerya mesnili* a kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata* neměly žádná vajíčka.

Přehrada	Datum	Stanoviště	Hloubka (m)	Počet nakažených perlooček				
				ca	mi	me	o	
Vír	6.5.2009	přítok	0-5		2			
		střed	0-25					
		hráz E	0-5					
		hráz M	6-13					
		hráz H	16-50				1	
	27.7.2010	přítok	0-4		3			
		střed	0-22		7			
		hráz E	0-5					
		hráz M	6-15		1		1	
		hráz H	18-55		5			
	2.11.2010	přítok	0-3,3		1	1	1	
		střed	0-24					
		hráz	0-57		2			
	Vranov	7.5.2009	přítok	0-5		1		
			střed	0-18		3		
hráz E			0-8					
hráz M			10-16					
hráz H			18-40		1			
10.6.2009		přítok	0-5,5					
		střed	0-18					
		hráz E	0-3					
		hráz M	5-17	1				
		hráz H	19-48				1	
22.7.2009		přítok	0-6,2					
		střed	0-18				1	
		hráz E	0-6					
		hráz M	7-15					
		hráz H	15-38	1			1	
10.6.2010		přítok	0-11					
		střed	0-20		1		5	
		hráz E	0-2					
		hráz M	2,5-12					
21.7.2010		přítok	0-7,4					
		střed	0-19	4				
		hráz E	0-4	1				
		hráz M	6-12				1	
		hráz H	13-35				1	
1.10.2010	přítok	0-7	1		1			
	střed	0-20						
	hráz	0-18	1		1			
3.11.2010	přítok	0-7						
	střed	0-19						
	hráz	0-39,5	2	1				
10.12.2010	přítok	0-14,5						
	střed	0-18,5		1				
	hráz	0-38,5						
Počty mikroparazitů			56	11	29	3	13	
			celkem	ca	mi	me	o	

Tab. 4: Výskyt jednotlivých skupin mikroparazitů u perlooček rodu *Daphnia* ve studovaných vzorcích. V tabulce je vypsáno všech 11 odběrových termínů z let 2009 a 2010 z přehradní nádrže Vír a Vranov a počty nakažených perlooček danou infekcí. Vysvětlivky: **ca** = *Caullerya mesnili*, **mi** = mikrosporidie, **me** = *Metschnikowia bicuspidata*, **o** = oomycety.

Plodnost perlooček na vertikálním profilu přehradní nádrže

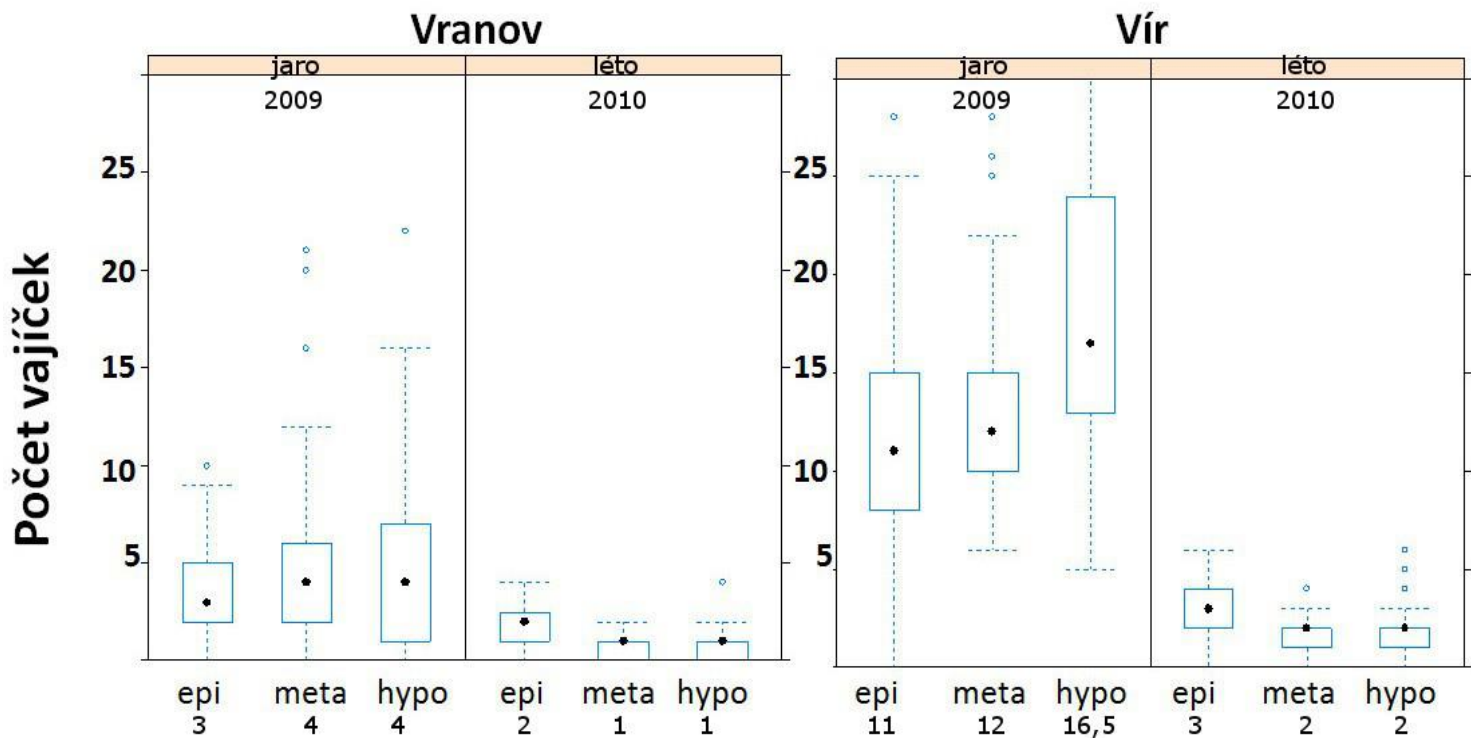
Pomocí hierarchické analýzy rozptylu byla testována závislost plodnosti perlooček na jejich výskytu v rámci vertikálního profilu na stanovišti hráz v přehradních nádržích Vír a Vranov (tab. 5). Z grafického znázornění (krabicových diagramů na obr. 17) vyplývá, že plodnost perlooček se liší i mezi nádržemi (zejména v jarním období). Tento faktor nebyl v analýze přímo testován, je ale zřejmé že plodnost perlooček na stanovišti hráz v nádrži Vír je u obou sezon vyšší než plodnost perlooček na tom samém stanovišti v nádrži Vranov.

Signifikantní jsou sezónní rozdíly v plodnostech, a to jak samotný efekt sezony, tak i interakce s identitou nádrže a vertikální pozicí v rámci vodního sloupce (tab. 5). Plodnost perlooček v oblasti hráze je u obou přehradních nádrží vyšší v jarním období než v letním, tento trend je nejpatrnější v přehradní nádrži Vír.

Samotná faktor pozice na vertikálním profilu nebyl statisticky signifikantní, na rozdíl od vysoce významných interakcí se sezónou (tab. 5). Důvodem je, že v jarním období jsou na stanovišti hráz u obou přehradních nádrží hodnoty mediánů pro počty vajíček vyšší u perlooček pocházejících z metalimnia a hypolimnia dané nádrže než u perlooček pocházejících z epilimnia. Naopak v letním období jsou hodnoty mediánů pro počty vajíček vyšší u perlooček pocházejících z epilimnia než z nižších vrstev vodního sloupce dané nádrže.

Faktor	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměr čtverců	F hodnota	p hodnota
sezona	1	10370	10370	954,73	$< 2 \times 10^{-16}$
vertikální pozice	2	53	27	2,453	0,087
přehrada:sezona	1	3079	3079	283,48	$< 2 \times 10^{-16}$
přehrada: pozice	2	37	19	1,71	0,18
sezona:pozice	2	686	343	31,57	$4,73 \times 10^{-14}$
přehrada:sezona:pozice	8	916	114	10,54	$2,56 \times 10^{-14}$

Tab. 5: Výsledky hierarchické analýzy rozptylu (h-ANOVA) plodnosti perlooček na vertikálním gradientu v rámci studovaných nádrží.



Obr. 17: Krabicové diagramy porovnávající plodnost perlooček (osa y) na stanovišti hráz v přehradních nádržích Vranov a Vír z odběrových termínů na jaře 2009 a v létě 2010. Počet vajíček u perlooček je porovnáván v závislosti na jejich výskytu ve vertikálním profilu přehradní nádrže (osa x). Vysvětlivky: **epi** = epilimnion, **meta** = metalimnion, **hypo** = hypolimnion. Černé body reprezentují medián, horní a dolní okraje obdélníků kvartily, přerušovanou čarou je vyznačen rozsah hodnot (s vyloučením odlehých hodnot, které jsou vyznačeny kroužkem). Pod popisky na ose x jsou uvedeny vypočítané hodnoty mediánů.

Tyto výsledky potvrzují, že identita přehradní nádrže, sezona, pozice v rámci vertikálního profilu nádrže a jejich interakce mají signifikantní vliv na plodnost perlooček. Obdobné výsledky vyšly i tehdy, byly-li do analýzy zahrnuty všechny vzorky odebírané ze stanoviště hráz v období teplotní stratifikace vodního sloupce, tedy i ty, které byly odebírány u obou přehradních nádrží v odlišných jarních a letních termínech. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v Příloze V.

Plodnost perlooček na horizontálním profilu přehradní nádrže

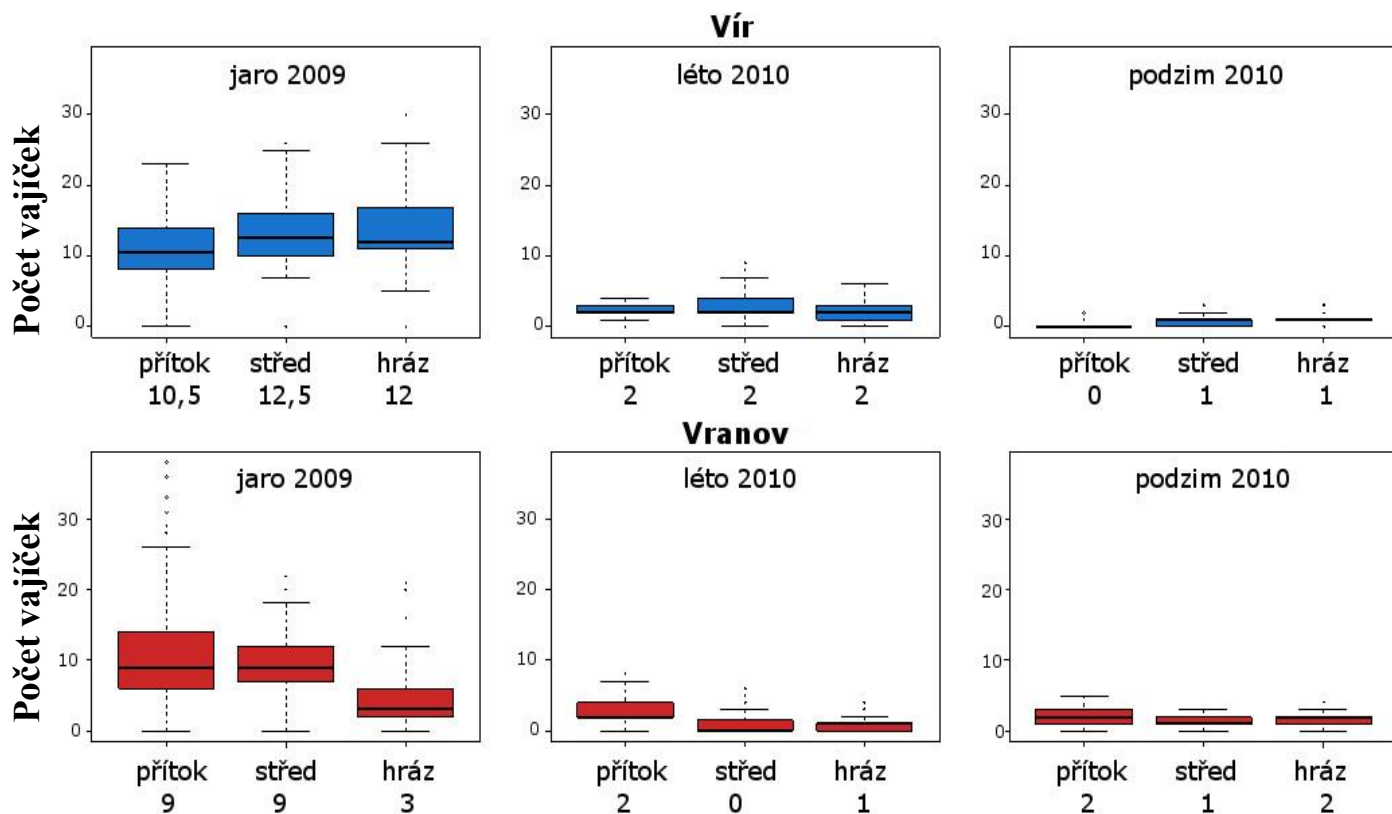
Pomocí hierarchické analýzy rozptylu byla testována závislost plodnosti perlooček na jejich výskytu v rámci horizontální osy v přehradních nádržích Vír a Vranov. Signifikantní byly všechny faktory, stejně jako jejich interakce (tab. 6). Stejně jako v případě vertikálního profilu má průkazný vliv na plodnost perlooček na horizontálním gradientu samotná *sezona*. Z grafického znázornění (krabicových diagramů na obr. 18) lze vyčíst, že plodnost perlooček je na jaře výrazně vyšší než v letním a podzimním období. Počty vajíček se u perlooček z letních a podzimních odběrů liší jen nepatrně, tento trend je pozorovatelný u obou přehradních nádrží, signifikantní vliv interakce *identita přehradní nádrže – sezona* (tab. 6) nicméně naznačuje, že detaily sezónní dynamiky v plodnosti se mezi nádržemi mírně liší.

Dále byl potvrzen signifikantní vliv *stanoviště* na podélné ose nádrže (přítok, střed, hráze) na plodnost perlooček (tab. 6), z krabicových diagramů však jednoznačný trend mezi jednotlivými stanovišti nevyplývá (obr. 18). Horizontální průběhy plodností perlooček se nicméně liší v závislosti na sezoně (signifikantní interakce *sezony – stanoviště* na podélné ose nádrže) (tab. 6) a v závislosti na identitě přehradní nádrže (signifikantní interakce *přehradní nádrže – stanoviště*).

Na jaře, kdy mají perloočky větší počet vajíček, je v přehradní nádrži Vranov podstatně výraznější pokles plodnosti perlooček směrem ke hrázi než v létě a na podzim. Naopak u přehradní nádrže Vír je na jaře plodnost perlooček o něco nižší na stanovišti přítok než na stanovištích dále směrem k hrázi. V obou přehradních nádržích mají perloočky v létě a na podzim velmi málo vajíček, poloha v nádrži tento počet výrazně neovlivňuje.

Faktor	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměr čtverců	F hodnota	p hodnota
sezona	3	22905	7635	521,17	$< 2 \times 10^{-16}$
stanoviště	2	5561	2781	189,80	$< 2 \times 10^{-16}$
přehrada:sezona	2	1655	828	56,50	$< 2 \times 10^{-16}$
přehrada:stanoviště	2	1926	963	65,73	$< 2 \times 10^{-16}$
sezona:stanoviště	6	1694	282	19,27	$< 2 \times 10^{-16}$
přehrada:sezona:stanoviště	4	765	191	13,06	$1,5 \times 10^{-10}$

Tab. 6: Výsledky hierarchické analýzy rozptylu (h-ANOVA) plodnosti perlooček na horizontálním gradientu v rámci studovaných nádrží.



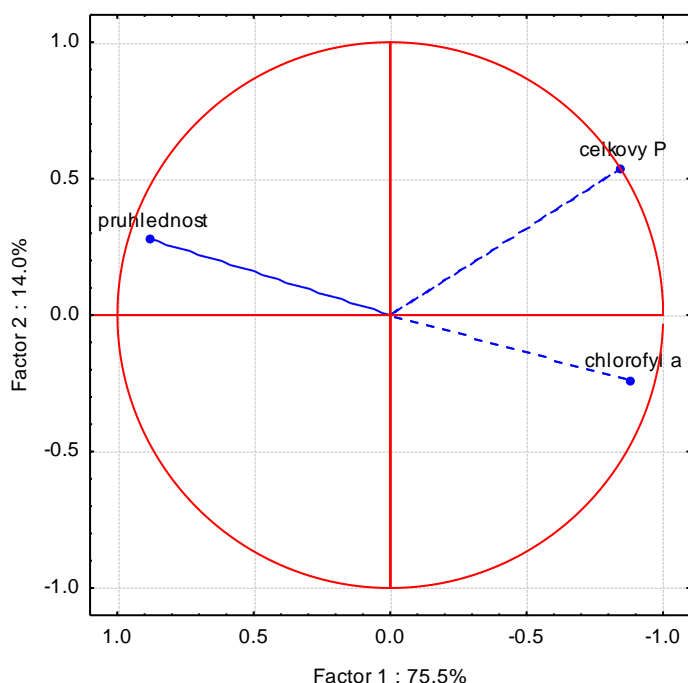
Obr. 18: Krabicové diagramy porovnávající plodnost perlooček (osa y) v přehradních nádržích Vír a Vranov z odběrových termínů na jaře 2009, v létě 2010 a na podzim 2010. Počet vajíček u perlooček je porovnáván v závislosti na jejich výskytu v rámci horizontální osy nádrže (osa x). Černé čáry reprezentují medián, horní a dolní okraje obdélníků kvartily, přerušovanou čarou je vyznačen rozsah hodnot (s vyloučením odlehlých hodnot, které jsou vyznačeny tečkou). Pod popisky na ose x jsou uvedeny vypočítané hodnoty mediánů.

Pomocí regresního modelu byly také spočítány dva typy koeficientu determinace R^2 : *marginal* (R^2_m) a *conditional* (R^2_c). R^2_m odpovídající variabilitě vysvětlené fixovanými faktory (tj. *sezona – stanoviště*) vysvětlil celkem 27,7 % z celkové variability hodnot. R^2_c odpovídající variabilitě vysvětlené celým modelem (tj. *identita přehradní nádrže – stanoviště – sezona*) vysvětlil 63,9 % z celkové variability hodnot. Plodnost perlooček je tedy značně ovlivněná kombinací všech uvedených faktorů.

Dále byla s pomocí proměnných: průhlednost, celkový fosfor a chlorofyl a provedena analýza hlavních komponent, ze které byla získána náhradní proměnná „potrava“. Tato proměnná vysvětluje 75,5 % variability obsažené v původních proměnných. Pro lepší přehlednost jsou hodnoty první osy PCA převedeny na opačné znaménko, aby byla potrava pozitivně korelována s množstvím celkového fosforu a chlorofylu a a negativně korelována s průhledností (obr. 19). Vztah mezi proměnnou „potrava“ a původními proměnnými je shrnut v tab. 7. Jednotlivé hodnoty proměnné „potrava“ pro vzorky z jednotlivých odběrových termínů jsou uvedeny v tabulce vzorků v Příloze II.

Původní proměnná	potrava [PCA1 × (-1)]
průhlednost	-0,880
celkový fosfor	0,844
chlorofyl a	0,883

Tab. 7: Vztah mezi měřenými proměnnými a souhrnnou proměnnou „potrava“ získanou pomocí analýzy hlavních komponent (jako opačná hodnota na první ose PCA).



Obr. 19: Vztahy původních proměnných a výsledných faktorů z analýzy hlavních komponent. První faktor vysvětluje 75,5 % variability obsažené v původních proměnných: průhlednost, celkový fosfor a chlorofyl a. Na ose Y je znázorněna proměnná „potrava“ (získaná změnou znaménka původní PCA osy), negativně korelovaná s průhledností a pozitivně korelovaná s celkovým fosforem a chlorofylem-a.

Koeficient determinace (R^2_m) pro faktory *sezona – stanoviště* vysvětloval 27,7 % variability hodnot. Bylo-li stanoviště nahrazeno potravou, výsledný model *sezona – potrava* vysvětloval 24,1 % variability. Modelem *identita přehradní nádrže – stanoviště – sezona* se podařilo vysvětlit 63,9 % z celkové variability hodnot, tedy o několik procent více, než v případě modelu *identita přehradní nádrže – stanoviště – potrava*, kde výsledný koeficient determinace (R^2_c) vysvětloval 60,5 % variability hodnot. I když byl faktor potrava spočítán jako reálná čísla (nikoli jako ordinální proměnná), měl nepatrně menší vysvětlující sílu pro plodnost perlooček.

Využití modelu s faktorem stanoviště (přítok, střed, hráz) v rámci horizontální osy nádrže, jako ordinální proměnné, měl tedy obdobnou vypovídající hodnotu jako použití modelu s faktorem potravy, který konkrétněji popisuje dané oblasti přehradní nádrže z hlediska přítomnosti environmentálních gradientů (množství celkového fosforu a chlorofylu a).

5 DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem se zabývala výskytem čtyř nejčastěji studovaných skupin mikroparazitů (mikrosporidie, oomycety, prvok *Caullerya mesnili*, kvasinka *Metschnikowia bicuspidata*) u perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* z přehradních nádrží Vír a Vranov a variabilitou v plodnosti těchto perlooček.

Obě studované údolní přehradní nádrže mají kaňonovitý profil s jednosměrným tokem vody od přítoku směrem k hrázi a podélným gradientem hloubky s největší hloubkou u hráze (Straškraba 1998; Straškraba & Hocking 2002). Tyto nádrže podléhají teplotní stratifikaci v průběhu roku (teplotní a kyslíkové profily viz Příloha V) (Lampert & Sommer 2007) Uvedené vlastnosti umožňují v přehradních nádržích, společně s klimatickými podmínkami a dostatečnou teoretickou dobou zdržení, utváření environmentálních gradientů na horizontální a vertikální ose nádrže, kde řídicí silou je právě přítok řeky (Lampert & Sommer 2007; Straškraba 1998; Straškraba & Hocking 2002).

Naměřené hodnoty abiotických faktorů v obou přehradních nádržích (viz Příloha IV) jasně ukazují pokles v celkovém množství fosforu (živin) a chlorofylu a (fytoplanktonu) od přítoku směrem k hrázi. Pokles v biomase fytoplanktonu v těchto nádržích je následován vzrůstem průhlednosti vody směrem k hrázi (viz Příloha II). Jakákoliv změna v biomase fytoplanktonu ovlivní společenstvo zooplanktonu a následně celou kaskádu organismů v potravním řetězci (Straškraba 1998; Lampert & Sommer 2007). Významnými zástupci zooplanktonního společenstva v českých přehradních nádržích jsou perloočky z druhového komplexu *Daphnia longispina*, na nichž předchozí studie ukázaly, že gradienty abiotických a biotických faktorů ovlivňují u perlooček jejich výskyt, druhové složení, životní strategie či prostorovou distribuci v rámci nádrže (Petrušek et al. 2008a; Seďa et al. 2007a; Seďa et al. 2007b).

Perloočky rodu *Daphnia* napadá řada mikroparazitů s rozdílným životním cyklem, hostitelskou specifitou a lokální adaptací. Jejich výskyt je kontrolován řadou environmentálních faktorů (Lampert 2011). Údolní přehradní nádrže s charakteristickými abiotickými a biotickými gradienty na horizontální a vertikální ose nádrže tedy představují vhodné prostředí pro studium vztahu perloočka-parazit a vlivů environmentálních faktorů na tento systém. Původním cílem mé diplomové práce bylo zejména vyhodnocení distribuce a časových změn ve výskytu jednotlivých skupin parazitů u perlooček na podélném gradientu přehradních nádrží Vír a Vranov a zjištění vlivu jednotlivých skupin parazitů na plodnost

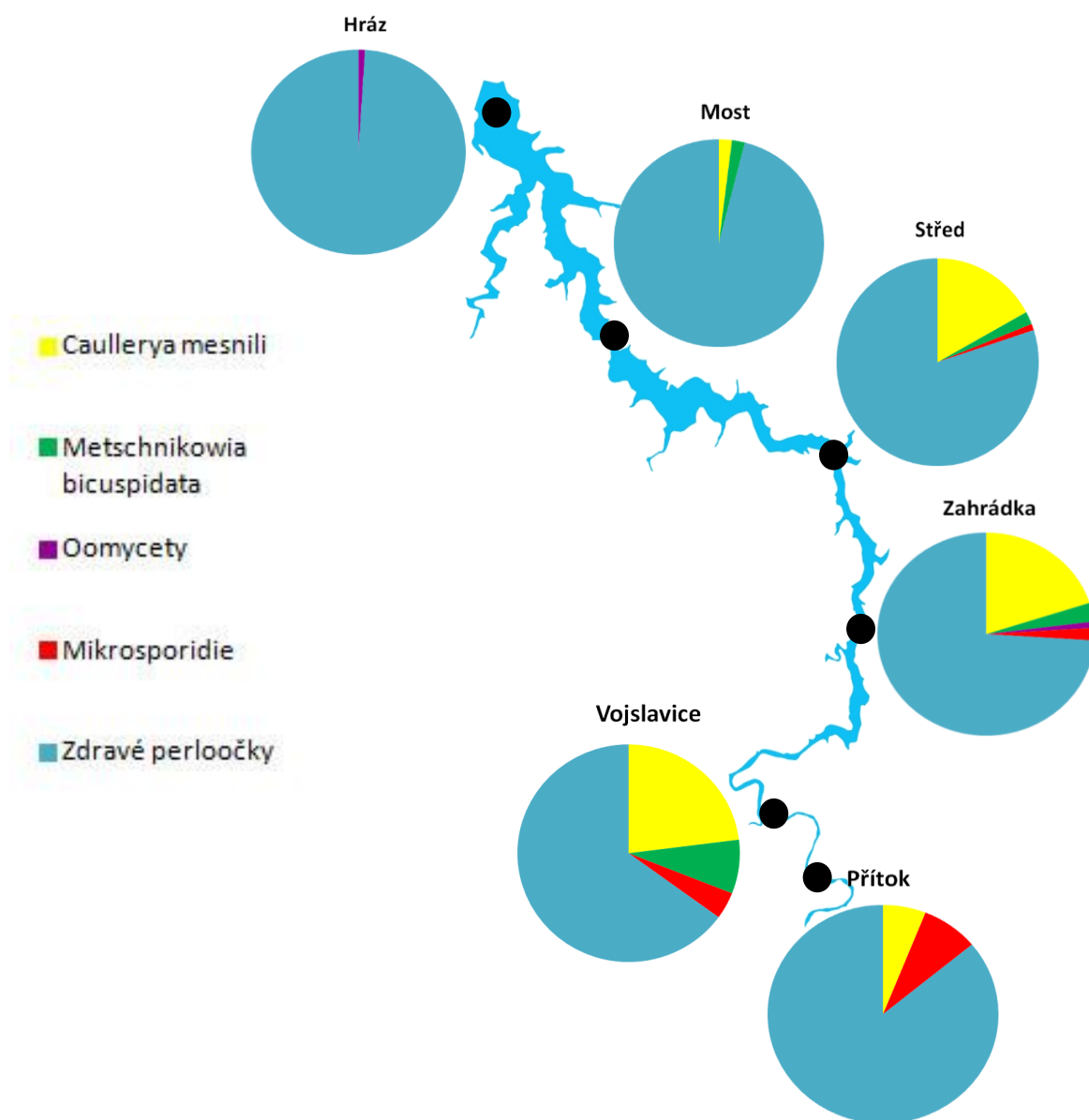
perlooček. Přestože v důsledku nízkého počtu nakažených jedinců nebylo možno tento cíl naplnit, níže diskutuji alespoň základní pozorované trendy.

Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*

Celkem jsem na přítomnost čtyř skupin mikroparazitů vyšetřila 4452 dospělých samiček perlooček ze vzorků z přehradních nádrží Vír a Vranov. Během vyšetřování perlooček jsem také zaznamenávala počet vajíček ve snůšce či přítomnost efipia. Celkem jsem zaznamenala zanedbatelné množství, tj. 26 efipiálních samiček (efipiální samičky jsou zaznamenány v tab. 3). Z celkového počtu přesahující několik tisíc vyšetřovaných jedinců jsem infekci zaznamenala pouze u 56 perlooček (seznam infikovaných perlooček viz tab. 4). Tento počet nebyl relevantní k plánovaným analýzám.

Jsem přesvědčená, že tak nízký počet infikovaných perlooček nebyl zapříčiněn mými určovacími schopnostmi. Jednotlivé skupiny mikroparazitů jsem se učila identifikovat u Dr. Justyny Wolińské na Ludwig-Maximilians-Universität v Mnichově. Zde jsem prohlížela infikované perloočky pomocí stereomikroskopu se zvětšením 250x. Stereomikroskop, který jsem měla k dispozici během své práce na katedře ekologie má maximální zvětšení 128x. Nicméně i toto zvětšení bylo dostatečné, abych rozeznala spory prvoka *Caullerya mesnili*, které nezpůsobují žádné zbarvení hostitele a jejich velikost je okolo 8 μm (Lohr et al. 2010). To činí tuto skupinu mikroparazitů velmi těžce identifikovatelnou, ostatní skupiny sledovaných parazitů se projevují podstatně výrazněji (alespoň pokud je infekce dostatečně rozvinutá). Během své laboratorní práce jsem také narazila na problémy spojené s určováním mikroparazitů z fixovaných vzorků zooplanktonu. Potýkala jsem se zejména s problémem rozlišení mikrosporidiální infekce od artefaktů způsobených fixací 96% etanolem. Problematiku fixace vzorků zooplanktonu detailněji popisují a diskutují v Příloze I.

Před samotným finálním zpracováním vzorků určených pro mou diplomovou práci z nádrží Vír a Vranov jsem si své určovací schopnosti ověřila na vzorcích získaných stejným způsobem ze 6 stanovišť z přehradní nádrže Želivka z dat 3. - 5. 8. 2009. Výskyt jednotlivých skupin mikroparazitů na podélném gradientu přehradní nádrže Želivka jsem vyhodnotila graficky níže (obr. 20). Ve vzorcích z této nádrže jsem našla relativně velké množství nakažených perlooček (počty jednotlivých infekcí jsou zaznamenány v tabulce VI-1 v Příloze VI). Na třech odběrových stanovištích byla infikována přibližně čtvrtina vyšetřovaných samiček a výskyt jednotlivých skupin mikroparazitů byl na podélné ose nádrže heterogenní.



Obr. 20: Výskyt mikroparazitů na horizontální ose přehradní nádrže Želivka v srpnu 2008.

Jednotlivé lokality odběrů vzorků jsou vyznačeny na profilu nádrže černým bodem. Ke každému odběrnému místu je přiřazen koláčový graf zobrazující množství nakažených/ zdravých perlooček ze 100 vyšetřovaných.

Je tedy evidentní, že nízký počet infikovaných perlooček ze vzorků z přehradních nádrží Vír a Vranov byl skutečně s největší pravděpodobností dán nízkou prevalencí parazitů v daných letech. Občasná nízká prevalence je zmiňovaná i v literatuře. Stirnadel a Ebert (1997) v metodice své práce s mikroparazitami uvádějí, že pro mikroparazity *Caullerya mesnili* a mikrosporidie nemohly být provedeny plánované statistické analýzy, neboť našli méně než 3 infekce na každý druh vyšetřovaných perlooček (Stirnadel & Ebert 1997). Stejný problém uvádí i Wolinska a Spaak (2009), pro jejich studii nebyl počet nakažených perlooček (z 60 – 120 vyšetřovaných perlooček na vzorek) dostatečný a museli vyšetřit další množství perlooček, aby dosáhli počtu alespoň 20 infikovaných jedinců na vzorek.

Nízká prevalence parazitů je uvedena i ve studiích z českých přehradních nádrží. Yin et al. (2012b) studovali 100 – 300 perlooček na vzorek z nádrží Římov a Vír z období září – prosinec 2009. Z jejich výsledků vyplývá, že kvasinka *Metschnikowia bicuspidata* nebyla u perlooček z Říмова nalezena vůbec, přitom v přehradní nádrži Vír byla s prevalencí až 15%. *Caullerya mesnili* se u vzorků perlooček z přehradní nádrže Vír vyskytovala jen ve dvou odběrových dnech a to s prevalencí méně než 3% (Yin et al. 2012b). Taktéž studie Wolinské et al. (2011a) na 11 přehradních nádržích v období dvou let ukazuje u přehradní nádrže Vír relativně nízkou prevalenci některých parazitů: mikrosporidie méně jak 10%, oomycety okolo 4%, *Metschnikowia bicuspidata* nalezena nebyla. Nicméně *Caullerya mesnili* dosahovala prevalencí okolo 25% (Wolinska et al. 2011aa). I výše uvedené nízké prevalence některých skupin parazitů jsou ovšem v porovnání s mými počty infikovaných perlooček stále vyšší.

Heterogenní distribuce mikroparazitů

Z celkového počtu 4452 vyšetřených jedinců jsem infekci u svých vzorků zaznamenala pouze u 56 perlooček. I u tak malého počtu infikovaných jedinců jsem pozorovala určité trendy v heterogenní distribuci parazitů, které mohu srovnat s předchozí prací z 11 českých přehradních nádrží, zabývající se heterogenní a sezonní distribucí uvedených skupin mikroparazitů (Wolinska et al. 2011aa).

Pozorovala jsem vyšší výskyt mikroparazitů ve středních a dolních oblastech nádrže než v oblastech přítoku. U přehradní nádrže Želivka jsem taktéž pozorovala vyšší míru parazitice u perlooček ze střední části nádrže. V těchto oblastech nádrží zaznamenali Wolinska et al. (2011a) infekce způsobené mikrosporidii, oomycety a kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata*. Důležité faktory, které mohou ovlivnit distribuci mikroparazitů, jsou potravní

zdroje a predace perlooček rybami (Hall et al. 2009). Gradient predačního tlaku v rámci nádrží se snižuje od přítoku k hrázi (Prchalová et al. 2008). Infekce způsobené mikrosporidii, oomycety a kvasinkou *M. bicuspidata* způsobují zabarvení těla perlooček a tím je činí atraktivnější kořistí pro zrakem se orientující rybí predátory (Duffy & Hall 2008). Výskyt parazitů *M. bicuspidata* a oomycet se tedy v českých přehradních nádržích zvyšoval s klesajícím predačním tlakem a potravní nabídkou směrem k hrázi (Wolinska et al. 2011aa).

Oomycety v oblasti hráze navíc vykazovaly vertikální distribuci – byly častěji nacházeny u perlooček z hlubších vrstev vodního sloupce (Wolinska et al. 2011aa). To jsem také při své práci s mikroparazity zaznamenala. Oomycety se u přehradních nádrží Vír, Vranov a Želivka nacházely ve vzorcích ze stanoviště hráz. Ve vzorcích perlooček ze stanoviště hráz z přehradní nádrže Želivka se ani jiná skupina mikroparazitů nevyskytovala. U nádrže Vír a Vranov se vždy oomycety vyskytovaly ve vzorcích z oblasti meta- a hypolimnia. Několik možných scénářů vysvětlujících vertikální distribuci této (vliv selektivní predace, fyziologického stavu nakažených jedinců apod.) rozebírám detailně v literárním přehledu (viz kapitola Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*).

Opačná prostorová distribuce v rámci přehradních nádrží byla zaznamenána u parazitického prvoka *Caullerya mesnili* (Wolinska et al. 2011aa). Výskyt *C. mesnili* byl vyšší u přítoku, kde jsou pro perloočky nejlepší potravní podmínky, ale také větší výskyt ryb (Prchalová et al. 2008). Infekce *C. mesnili* neovlivňuje průhlednost perlooček a tudíž nepodléhají predačnímu tlaku více než perloočky zdravé, v oblasti přítoku se tedy může šířit (Wolinska et al. 2011aa). U přehradní nádrže Želivka jsem nejčastěji ve vzorcích perlooček pozorovala právě parazitického prvoka *Caullerya mesnili*. Výskyt této infekce zřetelně klesl u posledních dvou stanovišť v dolní části přehrady.

U vzorků z přehradní nádrže Želivka jsem zaznamenala výskyt mikrosporidií na několika stanovištích. V rámci studie přehradních nádrží byl zjištěn na podélné ose nádrže homogenní výskyt této infekce (Wolinska et al. 2011aa). Možný způsob rozšíření infekce uvádím v literárním přehledu (viz kapitola Mikroparaziti perlooček rodu *Daphnia*).

Sezonní výskyt mikroparazitů

Jak ukazuje řada studií, teplota a potravní nabídka ovlivňují nejen samotné perloočky, ale také výrazně ovlivňují výskyt, šíření a přetrvávání mikroparazitů v populaci perlooček (např. Schoebel et al. 2011; Hall et al. 2009). Sezonní změny environmentálních faktorů v přehradních nádržích tedy také ovlivňují sezonní výskyt mikroparazitů (Hall et al. 2009; Johnson et al. 2009; Wolinska et al. 2011a). Během své práce jsem zaznamenala nejčastější výskyt mikroparazitů u vzorků z letního období, zejména mikrosporidií a oomycet. Hall et al. (2009) navrhuje jako možné vysvětlení zvýšené prevalence parazitů v letním období cirkulaci parazitických spor v oblasti epilimnia. Pokud je v létě vodní sloupec teplotně stratifikován, spory kontinuálně cirkulují v epilimniu. V této horní vrstvě vodního sloupce je pro perloočky zvýšená pravděpodobnost nákazy a tedy dobré podmínky pro šíření infekce. Podzimní míchání vody následně způsobí naředění parazitických spor a pravděpodobně vede k ukončení epidemie. Tito autoři také navrhli matematický model, ve kterém kombinace nízké (či nevhodné) potravní nabídky pro perloočky spolu s vysokou teplotou vody (podporující rozmnožování mikroparazitů) podporuje vysokou prevalenci parazitů právě v letním období (Hall et al. 2009). V mnoha eutrofních nádržích mají perloočky v návaznosti na sezonní dynamiku fytoplanktonu dvě populační maxima – na jaře a v létě (Ebert 2005; Sommer et al. 1986). Hustotně závislý přenos infekce v hostitelské populaci perlooček může být dalším důvodem vysoké prevalence parazitů v letním období (Lampert 2011).

Opačný trend v sezonním výskytu jsem pozorovala u výskytu infekce kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata*. Všechny infikované perloočky kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata* pocházely pouze z podzimních vzorků. Stejný výskyt infekce *M. bicuspidata* byl zjištěn i ve studii 11 českých přehradních nádržích (Wolinska et al. 2011a). Autoři uvádějí vyšší prevalenci *M. bicuspidata* na začátku podzimu za nízkých potravních podmínek pro perloočky (Wolinska et al. 2011a). Vyšší prevalenci *M. bicuspidata* za nižší teploty potvrzují i další studie přírodních populací perlooček a jejich mikroparazitů (např. Duffy & Hall 2008; Hall et al. 2009). Vyšší výskyt parazitů za nižší teploty může vysvětlovat teplotní optimum parazita nebo snížená odolnost perlooček k infekci (Schoebel et al. 2011). Druhý model sezonní dynamiky parazitů navržený v práci autorů Hall et al. (2009) se zabývá vysvětlením vyšší prevalence parazitů ve stratifikovaných nádržích v podzimním období. Autoři navrhuje, že pokud jsou spory mikroparazitů uvolňovány z mrtvých těl infikovaných perlooček, které klesly do oblasti hypolimnia, je k šíření infekce zapotřebí vertikální míchání vodního sloupce (Hall et al. 2009). Pokles teploty vyvolává podzimní míchání vody a tedy rozmíchání infekční

spor (Johnson et al. 2009). Přenos infekce by měl být tedy inhibován během letní teplotní stratifikace kvůli prostorovému oddělení potencionálních hostitelů v epilimniu a infekčních spor v hypolimniu. Vysoká prevalence parazitů by tedy měla být v podzimním období (Hall et al. 2009; Johnson et al. 2009).

Vliv mikroparazitů na plodnost perlooček

Z řady odborných publikací je evidentní, že paraziti mají zásadní vliv na plodnost, přežívání a životní strategie perlooček (např. Ebert 2005; Decaestecker et al. 2005; Stirnadel & Ebert 1997; Wolinska et al. 2004). Vliv mikroparazitů u perlooček z přehradních nádrží Vír a Vranov jsem ve své práci, z důvodu malého počtu infikovaných jedinců, nemohla vyhodnotit. Nicméně jsem pozorovala, že perloočky infikované prvokem *Caullerya mesnili* a kvasinkou *Metschnikowia bicuspidata* neměly žádná vajíčka. Oba druhy mikroparazitů jsou v literatuře uváděny jako vysoce virulentní. Pro kvasinku *M. bicuspidata* je uváděná redukce plodnosti infikovaných jedinců až o 50 % (Ebert 2005; Duffy & Hall 2008; Wolinska et al. 2011a) a pro *C. mesnili* až o 95 % (Little & Ebert 1999; Wolinska et al. 2007a). Vysokou redukcí plodnosti u samic perlooček *Daphnia longispina* x *galeata* infikovaných prvokem *C. mesnili* potvrzuje i další práce autorů Wolinska et al. (2004). Výsledky jejich práce ukazují, že pouze 2,4 % dospělých infikovaných samic mělo snůšku s vajíčky (Wolinska et al. 2004). Naopak infekci způsobenou parazitickými oomycety jsem většinou zaznamenala u perlooček, které měly větší počet vyvinutých vajíček ve snůšce. Publikace většinou uvádějí jakým způsobem je infekce přenášena mezi hostiteli, jaké jsou její symptomy, jak moc je u infikovaných perlooček redukována plodnost či životnost a zda jsou infikovaná vajíčka životaschopná či nikoli (např. Ebert 2005; Tellenbach et al. 2007; Wolinska et al. 2008a; Wolinska et al. 2009). Nenašla jsem však informaci o tom, zda jsou perloočky s větší snůškou vyvinutých vajíček (vlivem fyziologického stavu) více náchylné k této infekci, či zda parazitické spory oomycet přednostně nenapadají právě tyto perloočky (např. v důsledku chemotaxe zoospor). Parazitické oomycety napadají u perlooček snůšku či oblast hlavy, z těchto míst se parazitické mycelium rozrůstá do celého těla infikované perloočky (Wolinska et al. 2008a). Vajíčka jsou deformována a dále nejsou životaschopná (Tellenbach et al. 2007). To bylo evidentní i u mých vzorků. Vajíčka infikovaných perlooček byla zdeformována a zcela prorostlá myceliem. Je možné, že větší počet vyvinutých vajíček ve snůšce by mohlo vytvářet dobrý substrát pro rozrůstání parazitického mycelia.

Vliv environmentálních gradientů na plodnost perlooček

Vzhledem k nedostatku dat pro analýzu prevalence mikroparazitů a jejich vlivu na plodnost perlooček jsem se dále ve své práci zaměřila na alternativní problematiku a to na vliv samotných environmentálních gradientů v přehradních nádržích Vír a Vranov na plodnost perlooček v rámci horizontální a vertikální osy nádrže.

Gradientsy na horizontální ose nádrže (od přítoku směrem k hrázi) jsou charakterizovány zejména poklesem v množství živin, fytoplanktonu a rybí obsádky, naopak vzrůstem hloubky a průhlednosti (Straškraba 1998; Prchalová et al. 2006). Vertikální gradienty pak představují, změnu v teplotě vody, množství rozpuštěného kyslíku a dopadajícího světla (Straškraba 1998; Pitter 1999; Lampert & Sommer 2007). Tyto prostorové změny ve fyzikálních, chemických a biologických vlastnostech vodního prostředí doprovázejí současně také změny časové způsobené změnou klimatických podmínek (Pitter 1999). Podstatnou část zooplanktonního společenstva přehradních nádržích Vír a Vranov tvoří perloočky z druhového komplexu *Daphnia longispina* (Petrušek et al. 2008b). Je tedy evidentní, že populace perlooček v přehradních nádržích čelí velké fluktuaci environmentálních podmínek. Kompetice o zdroje, predace a parazitismus utváří vysoce specifické životní strategie v morfologii, chování a rozmnožování, mezi kterými musí perloočky v danou dobu volit, aby optimalizovaly alokaci svých zdrojů a maximalizovaly svou reprodukční rychlost (Black 1993; Schwartz 1984). Velikost prvoroďček (primipar), jejich stáří, počet a velikost jednotlivých vajíček, počet reprodukčních událostí, to vše může být fyziologickou odpovědí na různé podmínky prostředí (Benzie 2005). Perloočky v přehradních nádržích tedy představují užitečný model pro studium vlivu environmentálních faktorů na plodnost této důležité skupiny zooplanktonu.

Díky zjištěným počtům vajíček u každé zkoumané perloočky jsem se mohla ve své práci konkrétně zaměřit na vliv těchto faktorů: identita přehradní nádrže, sezona a stanoviště na plodnost perlooček na podélné a svislé ose nádrže.

V analýzách byl faktor „stanoviště“ použit jako ordinální vyjádření gradientů na horizontální ose nádrže, neboť jednotlivá stanoviště (přítok, střed, hráz) se liší abiotickými a biotickými vlastnostmi prostředí, a tedy i potravní nabídkou pro zooplankton. Nicméně

z výsledků smíšených lineárních modelů vyplývá, že využití stanoviště jako ordinální proměnné v modelu *identita přehradní nádrže – sezona – stanoviště* vysvětluje dokonce více variability v datech o plodnosti (63,9 %) než model, ve kterém bylo „stanoviště“ nahrazeno zástupnou proměnnou „potrava“ získanou analýzou hlavních komponent z proměnných přímo vyjadřujících gradient živin a potravní nabídky (výsledný koeficient determinace vysvětloval 60,5 % variability hodnot).

Plodnost perlooček na horizontálním profilu přehradní nádrže

Z výsledků analýzy rozptylu vyplývá, že v mém navrženém modelu měla *sezona* statisticky průkazný vliv na plodnost perlooček (plodnost dále myšlena jako počet vajíček či embryí ve snůšce). Plodnost perlooček byla nejvyšší v jarním období. Sezonní rozdíly v plodnosti perlooček jsou ovlivněny zejména predací a vývojem fytoplanktonního společenstva v jezerních habitatech mírného pásu, jak jej popisuje tzv. PEG model (Sommer et al., 1986).

Na jaře nastává díky dostatečnému množství živin a přibývajícimu slunečnímu záření nelimitovaný růst fytoplanktonu. Perloočky mají přebytek potravy a mohou vytvářet jarní maximum své biomasy (Sommer et al., 1986). Planktonožravé ryby jsou v tuto dobu ještě malé a nezpůsobují silný predanční tlak (Prchalova et al. 2008). Pokud nejsou perloočky ovlivněné velikostně-selektivními predátory, mohou dosahovat dospělosti ve větší velikosti (Ebert 1990; Sommer et al. 1986). Dostatek potravních zdrojů a vhodná teplota mají pozitivní vliv na růst a rozmnožování perlooček (Schwartz 1984). Laboratorní studie taktéž potvrzují, že pokud jsou perloočky krmeny kvalitní potravou, dospívají samičky rychleji, rozmnožují se častěji a mají větší snůšku (Schwartz 1984; Spaak & Hoekstra 2010; Lampert 2011).

Naopak během léta převládají ve fytoplanktonu druhy koloniálních řas či sinice, které představují pro perloočky nevhodnou potravu, a trvá jim déle ji zpracovat. Ryby se v této době stávají pro perloočky hlavním zdrojem mortality (Stibor & Luning 1994). Výsledek predace rybami je selektivní tlak na menší velikost (v porovnání s jarním společenstvem) a tím i na menší snůšku s menšími vajíčky (Schwartz 1984; De Meester & Weider 1999; Stibor & Luning 1994). Vysoký predanční tlak a nízká potravní nabídka pro letní perloočky vede k celkové redukci plodnosti (Manca & Tognota 1993). Laboratorní experimenty také potvrzují pokles plodnosti perlooček se vzrůstající teplotou (Weider and Wolf 1991). Všechny

tyto faktory mohou přispívat k tomu, že plodnost perlooček byla v létě výrazně nižší než v jarním období.

Počet vajíček ve snůšce se u perlooček z letních a podzimních odběrů lišil jen nepatrně. Během pozdimních odběrů bylo v obou přehradních nádržích naměřeno minimální množství fytoplanktonu, společně s nízkou teplotou to vede ke zhoršení životních podmínek pro perloočky (Schwartz 1984). Nezachytili jsme tedy možný druhý vrchol potravní nabídky, který může nastat se zvýšenou dostupností fosforu těsně po rozbití letní teplotní stratifikace.

Mé výsledky také ukazují signifikantní vliv *stanoviště* na podélné ose nádrže na plodnost perlooček. Obě údolní nádrže obývají perloočky z druhového komplexu *Daphnia longispina* (Petrušek et al. 2008b). Tyto druhy vykazují heterogenní distribuci na horizontální ose nádrže (Petrušek 2008a). Konkrétním taxonomickým složením perlooček v 11 přehradních nádržích se zabývá studie Sed'a et al. (2007a). Z této studie vyplývá, že v přítokové oblasti v přehradní nádrži Vír a Vranov dominuje malý druh *Daphnia cucullata*, ve středních oblastech se vyskytuje převážně druh *Daphnia galeata* a jeho mezidruhová hybridy (Vranov: *D. galeata* x *cucullata*; Vír: *D. galeata* x *D. cucullata*). Oblasti hráze obou přehradních nádrží obývají tělem větší druh *Daphnia longispina* společně s *Daphnia galeata* a jejími hybridy (Sed'a et al. 2007a). Tato heterogenní distribuce jednotlivých druhů je ovlivněná zejména predačním tlakem a dostupností potravy.

Potravou bohaté přítokové oblasti jsou hojně obývané také rybami (Prchalová et al. 2008). Predace rybami vyvolává silný selekční tlak na malou velikost těla perlooček a dřívější reprodukci. Tyto perloočky investují svou energii do rozmnožování spíše než do somatického růstu. Začínají se tedy rozmnožovat dříve na menší velikosti, jejich snůšky mají hodně malých vajíček a během svého života mají více snůšek (Spaak & Hoekstra 2010; Stibor & Luning 1994; Macháček & Sed'a 1998). Větší snůšky u samiček z oblasti přítoku než u samiček z oblasti hráze byly také pozorovány během studie přehradní nádrže Římov (Macháček & Sed'a 1998). Tyto reprodukční strategie potvrzují i laboratorní experimenty s perloočkami vystavenými rybím kairomonům (Taylor & Gabriel 1992; De Meester & Weider 1999; Macháček & Sed'a 1998).

Opačné životní strategie se vyskytují u perlooček z dolních oblastí přehradní nádrže. Nižší predační tlak a menší potravní nabídka zde umožňují výskyt větších druhů. Jedinci investují více energie do růstu, začínají se množit později, velikost jejich plodové komůrky jim umožňuje mít větší kvalitnější vajíčka, ale v menším počtu, a během svého života produkují menší počet snůšek (Stibor & Luning 1994; Bartosiewicz & Jablonski 2015).

Studie Petruska et al. (2008a) mimo jiné potvrzuje rostoucí velikost karapaxu perlooček a klesající počet vajíček ve snůšce směrem od přítoku k hrázi.

Mezidruhová kříženci mohou vyplňovat niku mezi rodičovskými druhy. Například práce Weider a Wolf (1991) ukazuje, že hybridi volí mezi životními strategiemi svých rodičovských druhů.

výše zmiňované práce tedy ukazují vliv environmentálních gradientů v jednotlivých oblastech nádrže v rámci horizontální osy. Tyto gradienty se nicméně sezónně mění a jejich charakter se liší i mezi jednotlivými nádržemi. Ve svých datech jsem tedy nepozorovala signifikantní vliv samotného stanoviště na plodnost perlooček, ta se lišila v závislosti na sezoně (signifikantní interakce *sezony – stanoviště*) a v závislosti na identitě přehradní nádrže (signifikantní interakce *přehradní nádrže – stanoviště*).

U obou přehradních nádrží byla plodnost perlooček na stanovištích přítok, střed, hráz vyšší na jaře než plodnost v těch samých stanovištích v létě a na podzim. To odráží již výše zmíněnou dobrou potravní nabídku a nízký predační tlak na začátku růstové sezony (Sommer et al. 1986). Na jaře byla v oblasti hráze v přehradní nádrži Vranov výrazně nižší plodnost perlooček než v létě a na podzim. To by mohlo být vysvětleno vznikem silných gradientů na podélné ose nádrže. Vranovská přehradní nádrž je 2x delší než přehradní nádrž Vír (Broža et al. 2005) a větší rozdíly v podmínkách pro perloočky mezi přítokem a hrází se možná mohou promítnout do většího rozdílu v plodnosti u perlooček mezi těmito stanovišti.

Zhoršené podmínky v létě a na podzim způsobily redukci v plodnosti perlooček v obou sezonách na všech stanovištích na podobně nízký počet vajíček.

Plodnost perlooček na vertikálním profilu přehradní nádrže

Z výsledků hierarchické analýzy rozptylu vyplývá, že samotná *identita přehradní nádrže* má statisticky průkazný vliv na plodnost perlooček ze stanoviště hráz. Více vajíček ve snůšce měly perloočky od hráze přehradní nádrže Vír.

Statisticky významná závislost byla prokázána u interakce *identita přehradní nádrže – sezona*. Plodnost perlooček na stanovišti hráz v přehradní nádrži Vír je u obou sezon vyšší než plodnost perlooček na tom samém stanovišti v přehradní nádrži Vranov. Vliv sezony je na plodnost perlooček nejmarkantnější. Plodnost perlooček v oblasti hráze je u obou přehradních nádrží vyšší v jarním období než v letním. Jak jsem již popisovala v textu výše, jarní sezona je

pro perloočky v přehradních nádržích, vzhledem k nízké predaci a vysoké potravní nabídce, lepším obdobím, než sezona letní (Sommer et al. 1986).

Interakce *identita přehradní nádrže – sezona – pozice v rámci vertikálního profilu* byla také signifikantní. V letním období jsou počty vajíček vyšší u perlooček pocházejících z vrstvy epilimnia než z nižších vrstev vodního sloupce dané nádrže. Pro perloočky ve větších hloubkách vodního sloupce se v letním období může stát limitujícím množství rozpuštěného kyslíku (Lampert 2011, Pitter 1999). V létě je vodní sloupec tepelně stratifikován a po vertikální ose ubývá množství kyslíku (Lampert & Sommer 2007). V obou přehradních nádržích byly v oblasti hypolimnia hodnoty naměřeného kyslíku minimální, u dna pak nastávaly anoxické podmínky (viz Příloha II). Pro perloočky byly tedy v letním období lepší podmínky v oblasti epilimnia.

Naopak v jarním období jsou na stanovišti hráz u obou přehradních nádrží počty vajíček vyšší u perlooček pocházejících z metalimnia a hypolimnia dané nádrže než u perlooček pocházejících z epilimnia. Výraznější rozdíl v plodnosti mezi perloočkami z oblasti epilimnia a hypolimnia je u přehradní nádrže Vír, která má 1,5x větší hloubku než Vranovská přehrada (Broža et al. 2005).

Tyto výsledky rozdílných plodností na vertikální ose nádrže jsou shodné s laboratorními experimenty s perloočkami *Daphnia galeata* a vodou odebíranou z přehradní nádrže Římov (Macháček 2001; Macháček & Sed'a 2007). Samičky z hypolimnia byly menší, měly daleko více vajíček v plodové komůrce, ale s menší velikostí, než samičky z vyšších vrstev vodního sloupce (Macháček & Sed'a 2007). V nízkých teplotách sice tyto perloočky rostou pomalu, přesto tedy existovat i jiný faktor, který by vysvětloval větší výskyt perlooček v nižších vrstvách vodního sloupce a jejich. Macháček a Sed'a (2001; 2007) navrhuje, že k větší plodnosti perlooček z hlubších vrstev může přispívat i lepší kvalita potravy. Seston ve vrstvách hypolimnia má vyšší obsah fosforu (Garcia-Ruiz et al. 1999). Také vysoký obsah partikulovaného uhlíku naznačuje přítomnost velkého množství bakterií, detritu a bičíkovců v této oblasti (Macháček & Sed'a 2007). Vliv rozsivek nebo bakterií na výsledek reprodukce u perlooček není ještě zcela jasný, ale vysoký obsah nenasycených mastných kyselin a fosforu by mohl být pro perloočky zásadní (Macháček 2001).

6 ZÁVĚR

Údolní přehradní nádrže mají důležitou zásobní, ochrannou, rekreační a estetickou funkci v naší krajině. Díky svým limnologickým vlastnostem se však stávají také unikátním vodním ekosystémem. Jejich charakteristický kaňonovitý profil s jednosměrným tokem řeky utváří na podélné a svislé ose nádrže řadu environmentálních gradientů. Tyto environmentální gradienty jsou utvářeny kombinací několika abiotických a biotických faktorů, které následně ovlivňují všechny členy trofické kaskády.

Významnou a u nás nejstudovanější složkou zooplanktonního společenstva v přehradních nádržích tvoří perloočky r. *Daphnia*, které se staly modelovým organismem pro řadu biologických oborů. I tyto malé organismy mají své parazity, ačkoliv se o nich do nedávna mnohé nevědo.

Má diplomová práce se zabývala výskytem čtyř nejčastějších skupin mikroparazitů u perlooček z přehradních nádrží Vír a Vranov. Ve své práci potvrzuji, že výskyt těchto mikroparazitů na horizontální a vertikální ose nádrže není náhodný a odráží heterogenní distribuci jednotlivých druhů perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* a přítomnost environmentálních gradientů. Dále se ve své práci zabývám detailním popisem vyšetřování perlooček na přítomnost mikroparazitů a možnými metodickými problémy. Malé množství nakažených jedinců bohužel neumožnilo zaměřit se detailně na vliv parazitace na plodnost perlooček.

Plodnost samic je nicméně ovlivněna zejména samotnými environmentálními gradienty a změnami potravní nabídky v čase. Výsledky mé práce ukazují signifikantní vliv sezony, stanoviště (resp. potravní nabídky) i identity přehradní nádrže na plodnost perlooček na horizontální i vertikální ose nádrže.

7 SEZNAM LITERATURY

- Anderson, R. M. and R. M. May (1982). "Coevolution of hosts and parasites." *Parasitology* **85**: 411-426.
- Barton, N. H. and G. M. Hewitt (1985). "Analysis of hybrid zones." *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-148.
- Bartosiewicz, M., J. Jablonski, et al. (2015). "Brood space limitation of reproduction may explain growth after maturity in differently sized *Daphnia* species." *Journal of Plankton Research*, doi 10.1093/plankt/fbu108
- Benzie, J. A. H. (2005). CLADOCERA: The Genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). Belgium, Kenobi Productions..
- Black, A. R. (1993). "Predator-Induced Phenotypic Plasticity in *Daphnia pulex*: Life History and Morphological Responses to *Notonecta* and *Chaoborus*." *Limnology and Oceanography* **38**(5): 986-996.
- Black, A. R. and S. I. Dodson (2003). "Ethanol: a better preservation technique for *Daphnia*." *Limnology and Oceanography: Methods* **1**: 45-50.
- Brendonck, L. and L. De Meester (2003). "Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment." *Hydrobiologia* **491**: 65-84.
- Bronmark, C. and L. A. Hansson (1998). *The biology of lakes and pond*. New York, Oxford University Press.
- Broža, V., L. Satrapa, et al. (2005). *Přehrady Čech, Moravy a Slezska*. Liberec, Nakladatelství 555.
- Caputo, L., L. N. Flores, et al. (2008). "Phytoplankton distribution along trophic gradients within and among reservoirs in Catalonia (Spain)." *Freshwater Biology* **53**: 2543-2556.
- Carius, H. J., T. J. Little, et al. (2001). "Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection." *Evolution* **55**(6): 1136-1145.
- De Meester, L. and L. J. Weider (1999). "Depth Selection Behavior, Fish Kairomones, and the Life Histories of *Daphnia hyalina* × *galeata* Hybrid Clones." *Limnology and Oceanography* **44**(5): 1248-1258.
- Decaestecker, E., L. De Meester, et al. (2002). "In deep trouble: habitat selection constrained by multiple enemies in zooplankton." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(8): 5481-5485.
- Decaestecker, E., S. Declerck, et al. (2005). "Ecological implications of parasites in natural *Daphnia* populations." *Oecologia* **144**(3): 382-390.
- Decaestecker, E., S. Gaba, et al. (2007). "Host-parasite "Red Queen" dynamics archived in pond sediment." *Nature* **400**: 870-873.
- Dhargalkar, V. K. and X. N. Veclecar (2004). *Zooplankton Methodology, Collection and Identification - a field Manual*. National Institute of Oceanography.
- Drašítk, V., J. Kubečka, et al. (2008). "The effect of hydropower on fish stocks: comparison between cascade and non-cascade reservoirs." *Hydrobiologia* **609**(1): 25-39.

- Duffy, M. A. and S. R. Hall (2008). "Selective predation and rapid evolution can jointly dampen effects of virulent parasites on *Daphnia* populations." *American Naturalist* **171**(4): 499-510.
- Dybdahl, M. F. and C. M. Lively (1998). "Host-parasite coevolution: evidence for rare advantage and time-lagged selection in a natural population." *Evolution* **52**(4): 1057-1066.
- Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>.
- Ebert, D. (2008). "Host-parasite coevolution: insights from the *Daphnia*-parasite model system." *Current Opinion in Microbiology* **11**: 1-12.
- Frisch, D., P. Morton, et al. (2014). "A millennial-scale chronicle of evolutionary responses to cultural eutrophication in *Daphnia*." *Ecology Letters* **17**(3): 360-368.
- Garcia-Ruiz, A., J. Lucena, et al. (1999). "Do bacteria regenerate phosphorus while decomposing seston?" *Marine and Freshwater Research* **50**(5): 459-466.
- Gido, K. B., C. W. Hargrave, et al. (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. (1990). "Food thresholds and body size in cladocerans." *Nature* **343**(6259): 638-640.
- Goetze, E. and M. Jungbluth (2013). "Aceton preservation for molecular studies." *Journal of Plankton Research* **35**(5): 978-981.
- Hall, S. R., C. J. Knight, et al. (2009). "Quality matters: resource quality for hosts and the timing of epidemics." *Ecology Letters* **12**(2): 118-128.
- Hamilton, W. D. (1980). "Sex versus non-sex versus parasite." *Oikos* **35**(2): 282-290.
- Haney, J. and D. Hall (1973). "Sugar-Coated *Daphnia*: A Preservation Technique for Cladocera." *Limnology and Oceanography* **18**(2): 331-333.
- Hejzlar, J. and V. Vyhnalek (1998). "Longitudinal heterogeneity of phosphorus and phytoplankton concentrations in deep-valley reservoirs." *International Review of Hydrobiology* **83**(3): 139-146.
- Hubová, J. (2010). "Koevoluce hostitel-parazit ve vodním prostředí." Bakalářská práce.
- Johnson, P. T. J., A. R. Ives, et al. (2009). "Long-term disease dynamics in lakes: causes and consequences of chytrid infections in *Daphnia* populations." *Ecology* **90**(1): 132-144.
- Kopáček, J. and J. Hejzlar (1993). "Semi-micro determination of total phosphorus in freshwaters with perchloric-acid digestion." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **53**(3): 173-183.
- Kořínek, V. (2005). "Dichotomický klíč perlooček (Cladocera) České republiky" dostupné na: <http://www.blatna.cuni.cz/foto800/bvz/Clic%20Cladocera%20Korinek/Korinek%20-%20klic%20cladocera%202005.pdf>.
- Lampert, W. (1989). "The Adaptive Significance of Diel Vertical Migration of Zooplankton." *Functional Ecology* **3**(1): 21-27.
- Lampert, W. (2006). "*Daphnia*: model herbivore, predator and prey." *Polish Journal of Ecology* **54**: 607-620.

- Lampert, W. (2011). *Daphnia: Development of a Model Organism in Ecology and Evolution*. Germany, International Ecology Institute.
- Lampert, W. and U. Sommer (2007). *Limnology*. New York, Oxford University Press.
- Little, T. J. and D. Ebert (1999). "Associations between parasitism and host genotype in natural populations of *Daphnia* (Crustacea: Cladocera)." *Journal of Animal Ecology* **68**: 143-149.
- Löffler, A., J. Wolinska, et al. (2004). "Life history patterns of parental and hybrid *Daphnia* differ between lakes." *Freshwater Biology* **49**: 1372-1380.
- Lohr, J. N., C. Laforsch, et al. (2010). "A *Daphnia* parasite (*Caullerya mesnili*) constitutes a new member of the Ichthyosporea, a group of protists near the animal–fungi divergence." *Journal of Eukaryotic Microbiology* **57**: 328-336.
- Longhi, M. L. and B. E. Beisner (2009). "Environmental factors controlling the vertical distribution of phytoplankton in lakes." *Journal of Plankton Research* **31**(10): 1195-1207.
- Macháček, J. (2001). "*Daphnia galeata* life history response to heterogeneous food conditions and dissolved chemicals in the reservoir." *Hydrobiologia* **442**(1-3): 215-222.
- Macháček, J. and J. Sed'a (1998). "Spatio-temporal changes of morphological and life history parameters of *Daphnia galeata* in a canyon-shaped reservoir." *International Review of Hydrobiology* **83**(SI): 171-178.
- Macháček, J. and J. Sed'a (2007). "Life history response of *Daphnia galeata* to heterogeneous conditions within a reservoir as determined in a cross-designed laboratory experiment." *Aquatic Ecology* **41**(1): 55-66.
- Macháček, J., I. Vaničková, et al. (2013). "Sexual reproduction of *Daphnia* in a deep temperate reservoir: the phenology and genetics of male formation." *Hydrobiologia* **175**(1): 113-123.
- Manca, M. and A. G. Tognota (1993). "Seasonal changes in morphology and size of *Daphnia hyalina* Leydig in Lago Maggiore." *Hydrobiologia* **264**(3): 159-167.
- Petrusek, A. (2010). "Modelka *Daphnia*. Perloočky jako modelové organismy v biologii." *Vesmír* **89**: 470-473.
- Petrusek, A., A. Hobaek, et al. (2008b). "A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda)." *Zoologica Scripta* **37**: 507-519.
- Petrusek, A., J. Seda, et al. (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.
- Pitter, P. (1999). *Hydrochemie*. Praha, Vydavatelství VŠCHT.
- Prchalová, M., J. Kubečka, et al. (2009). "The effect of depth, distance from dam and habitat on spatial distribution of fish in an artificial reservoir." *Ecology of Freshwater Fish* **18**(2): 247-260.
- Prchalová, M., J. Kubečka, et al. (2006). "Fish habitat preferences in an artificial reservoir system." *International Association of Theoretical and Applied Limnology* **29**(4): 1890-1894.

- Prchalová, M., J. Kubečka, et al. (2008). "Distribution patterns of fishes in a canyon-shaped reservoir." *Journal of Fish Biology* **73**: 54-78.
- Říha, M., M. Vašek, et al. (2012). "Diel horizontal migration of fish between littoral and pelagial in model reservoir." In: Říha, M.: *Dynamic of fish spatial distribution in reservoirs* - Ph.D.Thesis.
- Sed'a, J., K. Kolářová, et al. (2007b). "*Daphnia galeata* in the deep hypolimnion: spatial differentiation of a "typical epilimnetic" species." *Hydrobiologia* **594**: 47-57.
- Sed'a, J. and A. Petrusek (2011). "*Daphnia* as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks." *Journal of Limnology* **70**(2): 337-334.
- Sed'a, J., A. Petrusek, et al. (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**(7): 619-628.
- Schoebel, C. N., C. Tellenbach, et al. (2011). "Temperature effects on parasite prevalence in a natural hybrid complex." *Biology Letters* **7**(1): 108-111.
- Schwartz, S. (1984). "Life History Strategies in *Daphnia*: A Review and Predictions." *Oikos* **42**(1): 114-122.
- Sommer, U., Z. M. Gliwicz, et al. (1986). "The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters." *Archiv für Hydrobiologie* **106**(4): 433-471.
- Spaak, P. and J. R. Hoekstra (1997). "Fish predation on a *Daphnia* hybrid species complex: a factor explaining species coexistence?" *Limnology and Oceanography* **42**: 753-762.
- Spaak, P. and J. R. Hoekstra (2010). "Life-history variation and the coexistence of a *Daphnia* hybrid with its parental species." *Ecology* **76**(2): 553-564.
- Steedman, H. F. (1976). *Zooplankton fixation and preservation*. Paris, The Unesco Press.
- Stibor, H. and J. Luning (1994). "Predator-Induced Phenotypic Variation in the Pattern of Growth and Reproduction in *Daphnia hyalina* (Crustacea: Cladocera)." *Functional Ecology* **8**(1): 97-101.
- Stirnadel, H. A. and D. Ebert (1997). "Prevalence, Host Specificity and Impact on Host Fecundity of Microparasites and Epibionts in Three Sympatric *Daphnia* Species." *Journal of Animal Ecology* **66**(2): 212-222.
- Straškraba, M. (1998). "Limnological differences between deep valley reservoirs and deep lakes." *International Review of Hydrobiology* **83**: 1-12.
- Straškraba, M. and G. Hocking (2002). "The Effect of Theoretical Retention Time on the Hydrodynamics of Deep River Valley Reservoirs." *International Review of Hydrobiology* **87**(1): 61-83.
- Taylor, B. E. and W. Gabriel (1992). "To grow or not to grow: optimal resource allocation for *Daphnia*." *American Naturalist* **139**(2): 248-266.
- Tellenbach, C., J. Wolinska, et al. (2007). "Epidemiology of a *Daphnia* brood parasite and its implications on host life-history traits." *Oecologia* **154**(2): 369-375.
- Thompson, J. N. (1994). *The coevolutionary process*. Chicago., University of Chicago Press.
- Weider, L. J. and H. G. Wolf (1991). "Life-History Variation in a Hybrid Species Complex of *Daphnia*." *Oecologia* **87**(4): 506-513.
- Weigl, S., H. Koerner, et al. (2012). "Natural distribution and co-infection patterns of microsporidia parasites in the *Daphnia longispina* complex." *Parasitology* **139**(7): 870-880.

- Wolinska, J., B. Keller, et al. (2004). "Do parasites lower *Daphnia* hybrid fitness?" *Limnology and Oceanography* **49**(4): 1401-1407.
- Wolinska, J., B. Keller, et al. (2007a). "Parasite survey of a *Daphnia* hybrid complex: host-specificity and environment determine infection." *Journal of Animal Ecology* **76**: 191-200.
- Wolinska, J. and C. K. King (2009). "Environment can alter selection in host-parasite interactions." *Trends in Parasitology* **25**(5): 236-244.
- Wolinska, J., K. C. King, et al. (2008). "Virulence, cultivating conditions, and phylogenetic analyses of oomycete parasites in *Daphnia*." *Parasitology* **135**(14): 1667-1678.
- Wolinska, J., J. Seda, et al. (2011a). "Spatial variation of *Daphnia* parasite load within individual water bodies." *Journal of Plankton Research* **33**(8): 1284-1294.
- Wolinska, J. and P. Spaak (2009). "The cost of being common: evidence from natural *Daphnia* populations." *Evolution* **63**(7): 1893-1901.
- Wolinska, J., P. Spaak, et al. (2011b). "Transmission mode affects the population genetic structure of *Daphnia* parasites." *Journal of Evolutionary Biology* **24**(2): 265-273.
- Yin, M., A. Petrusek, et al. (2012). "Fine-scale genetic analysis of *Daphnia* host populations infected by two virulent parasites – strong fluctuations in clonal structure at small temporal and spatial scales." *International Journal for Parasitology* **42**: 115-121.

Webové stránky:

- Vítejte na Zemi. Hlavní vodní toky a nádrže v České republice.
http://www.vitejtenazemi.cz/archiv/voda_cs/045_mapa_nadrze_cr.pdf
[cit. 20. 7. 2014]
- Přehrady ČR. Soupis přehrad ČR. <http://www.prehrady.cz/> [cit. 22. 7. 2014]
- Mapy. <https://www.google.cz/maps/preview> [cit. 22. 7. 2014]
- Hlásná a předpovědní povodňová služba. www.hydro.chmi.cz [cit. 26. 7. 2014]

PŘÍLOHA I

Problémy s určováním mikrosporidiální infekce perlooček rodu *Daphnia* u fixovaných vzorků

Úvod

Během počátku své laboratorní práce jsem se při určování mikroparazitů u perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* setkala s několika problémy, které mě vedly k řešení dalších otázek a k sepsání této metodiky pro práci s mikroparazity, konkrétně s mikrosporidiiemi.

Při prohlížení prvních dvou etanolových vzorků určených pro mou diplomovou práci jsem zpozorovala několik odlišných perlooček, které se svým vzhledem lišily od jiných, zjevně zdravých jedinců a podobaly se perloočkám s mikrosporidiální infekcí (fotografie a popisy perlooček viz níže). Mému vedoucímu diplomové práce se tyto perloočky zprvu nejevily být neobvyklé. Svou nejistotu jsem tedy přisuzovala začátečnickým znalostem s určováním mikroparazitů a dále jsem tyto perloočky považovala za nakažené s počáteční fází mikrosporidiální infekce. Stejným způsobem jsem pokračovala ve zpracování dalších sedmi vzorků. Během prohlížení 700 samiček jsem ovšem začala rozeznávat velké rozdíly ve vzhledu mezi těmito (dále v textu označovanými jako „hnědé“) a zdravými perloočkami. Postupně jsem začala vylučovat možnost, že by hnědé perloočky byly nakažené mikrosporidii. V některých vzorcích byl jejich výskyt velmi častý (každá druhá vyšetřovaná perloočka). V porovnání s výskytem jiných skupin mikroparazitů se mi zdálo nepravděpodobné, že by byla mikrosporidiální infekce tak rozšířená. Také jsem začala lépe rozeznávat rozdíly mezi hnědými neobvykle vypadajícími perloočkami a perloočkami, u kterých jsem s jistotou určila rozvinutou mikrosporidiální infekci. Po rozlišení těchto znaků u níže popsaných skupin perlooček bylo patrné, že zařazení hnědých perlooček mezi perloočky s mikrosporidiální infekcí bylo chybné a že je třeba perloočky z jednotlivých vzorků vyšetřit znovu. Hnědé zbarvení ztěžovalo práci při identifikaci mikroparazitů a v některých případech bylo velmi obtížné rozeznat, zda se jedná o symptomy mikrosporidiální infekce nebo o perloočku s tmavě hnědou oblastí uvnitř těla. Při celkovém počtu několika tisíc vyšetřovaných samiček by bylo velmi časově náročné zkoumat každou podezřelou perloočku

pod mikroskopem a pomocí pitvy zjišťovat přítomnost mikrosporidiálních spor. Proto jsem se rozhodla nejprve se zaměřit na důvod neobvyklého vzhledu těchto perlooček a na nalezení vhodné metodiky, která by mi umožnila s jistotou rozeznat mikrosporidiální infekci u tak velkého množství jedinců.

Hnědé perloočky jsem pozorovala i ve fixovaných vzorcích zooplanktonu z jiných lokalit, naopak v živých vzorcích zooplanktonu jsem je nezaznamenala. Při manipulaci s živými vzorky v laboratoři jsem nedopatřením zjistila, že hnědé zbarvení těla se začalo objevovat ihned po té, co jsem živé perloočky vložila do 96% etanolu. Naskytla se tedy otázka, jaký vliv má na perloočky výběr fixačního činidla či jeho koncentrace. Několik odborných prací a příruček je věnováno tématu fixace zooplanktonu a porovnávání vlivu různých fixačních činidel na výsledný vzhled fixovaných organismů. V žádné práci jsem ovšem nenašla podobný popis morfologických změn u perlooček, který jsem po fixaci 96% etanolem pozorovala, a který v této práci podrobně popisuji.

Způsoby fixace zooplanktonu

K fixaci vzorků zooplanktonu se používá řada chemických látek a rozdílných postupů, v závislosti na jejich budoucím využití (Steedman 1976). Například vzorky pro genetickou analýzu se fixují zmrazením v tekutém dusíku (Benzie 2005; Steedman 1976). Pro taxonomické a morfologické charakteristiky se nejčastěji užívají dvě fixační činidla: 4-5% formaldehyd (formalin) nebo 70-96% etanol (Steedman 1976; Kořínek 2005). Fixované vzorky vypadají po použití obou médií obdobně, ale každé z nich má jisté (ne)výhody, záleží spíše na zvyklostech daného pracoviště, které fixační činidlo pro fixaci vzorků upřednostňuje.

Použití formaldehydu:

- Konzervace formaldehydem je velmi stálá, vysychání probíhá pomalu. Při dlouhodobém skladování se může časem vysrážet pevný paraldehyd, který může vzorek poškodit (Kořínek 2005).
- Vystavování se formaldehydových výparů může mít akutní či chronický vliv na lidské zdraví. Je tedy potřeba pracovat v dobře odvětrávaném prostředí. S tím jsou i spojené náklady potřebné na likvidaci formaldehydu. V některých zemích je práce s formaldehydovými vzorky zcela zakázána (Black & Dodson 2003).
- Formaldehyd vybělí přírodní pigmenty (Steedman 1976).

Použití etanolu:

- Etanol má sice nízké pořizovací náklady, ale během vyšetřování a uskladnění rychle vysychá a je ho potřeba relativně velké množství (Haney & Hall 1973).
- Etanol není vhodný na dlouhodobé muzejní skladování (Black & Dodson 2003).
- Při použití alkoholu záleží výsledek konzervace na úplné náhradě vody alkoholem (Kořínek 2005).
- Etanol je nevhodný pro pozorování bakteriálních infekcí (J. Vávra, os. sdělení; Wolinska et al. 2011a).

Použití narkotik:

Počáteční reakcí zooplanktonu na jakékoliv fixační ustalovače a konzervační látky je rychlý a trhavý pohyb. Vlivem prudké osmotické změny dochází ke kontrakcím těla a tělních přívěšků, to může vést k deformacím a ztěžovat práci se vzorky. Této reakci lze však předejít použitím narkotik a dočasné anestezii vzorků (Dhargalkar & Veclecar 2004). Jako narkotikum se používá např.: voda nasycená oxidem uhličitým, chloroform, metanol a chlorid hořečnatý (asi 7 g chloridu hořečnatého rozpuštěného ve 100 ml destilované vodě). Hlavním účelem narkotik je zabránit prudké kontrakci těla a zkrácení fixovaných vzorků (Steedman 1976).

Popis pozorovaných perlooček

Vzhled zdravé perloočky běžných nepigmentovaných druhů r. *Daphnia*

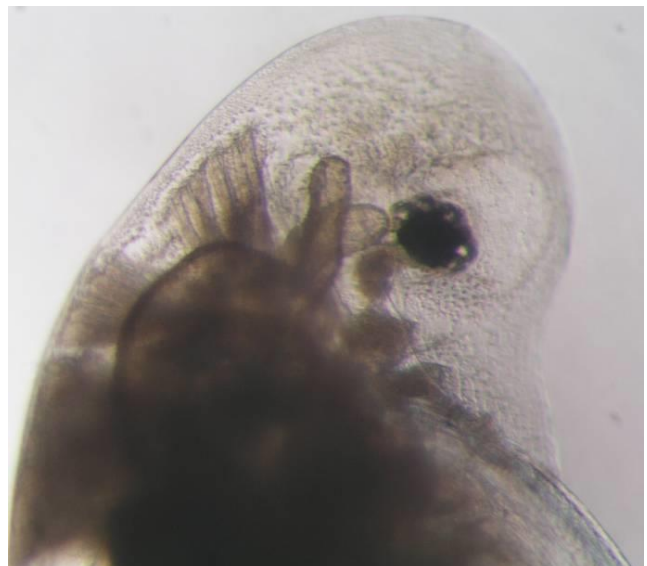
Tyto perloočky mají vzhled, který je typicky uváděný na fotografiích v literatuře či internetových zdrojích ilustrujících anatomii a morfologii perlooček. Celé tělo perlooček je průhledné (obr. I-1). Skořápky karapaxu nejsou zbarvené (obr. I-2). Lze snadno pozorovat jednotlivé struktury těla: filtrační aparát (jednotlivé hrudní končetiny), hepatopankreatické výběžky (obr. I-3), svaly, srdce a střevo. Pokud není ve střevě zbytek potravy, je celé střevo dobře pozorovatelné a průsvitné. U takto vypadajících perlooček lze ve střevě snadno odhalit např. spory mikroparazita *Caullerya mesnilli*. Lze také snadno pozorovat jednotlivá vajíčka ve snůšce.



Obr. I-1: Celkový pohled na tělo perloočky.
Tělo perloočky je průhledné bez zbarvení.
Lze rozeznat jednotlivé tělní struktury.



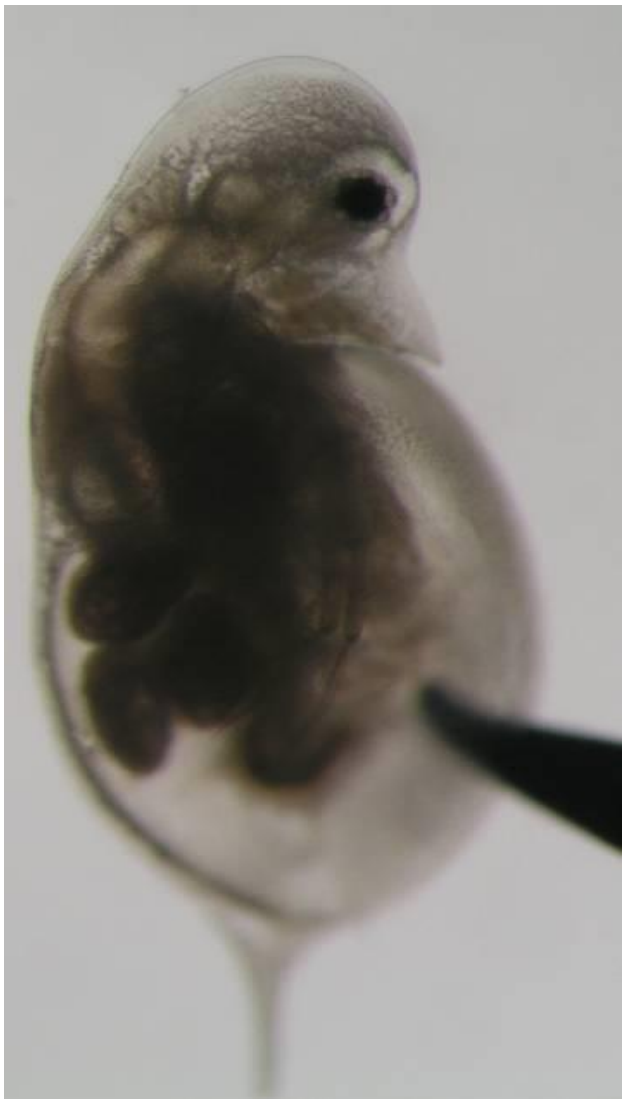
Obr. I-2: Detailní pohled na filtrační aparát.
Skořápky karapaxu nejsou zbarveny a lze snadno pozorovat hrudní končetiny, střevo a abdomen.



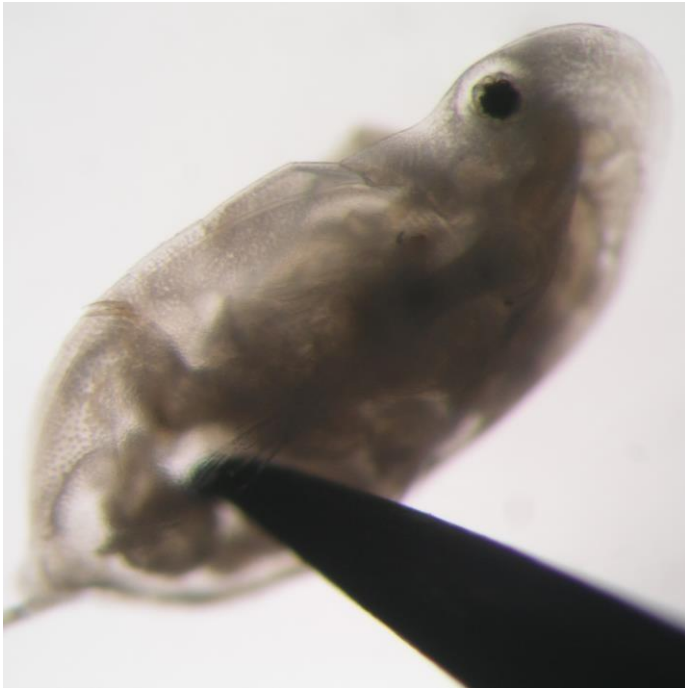
Obr. I-3: Oblast hlavy. Hlava perloočky je také průhledná a lze snadno pozorovat hepatopankreatické výběžky.

Vzhled hnědé perloočky

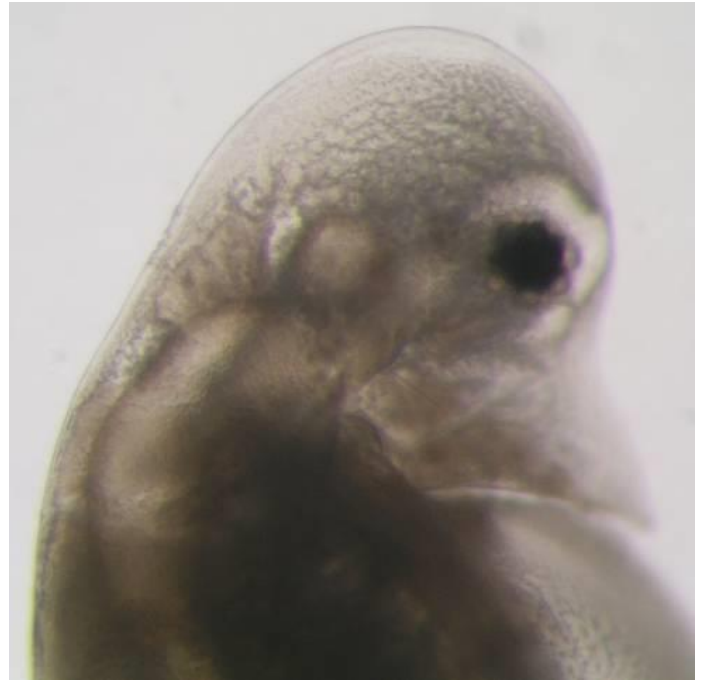
Tyto odlišně vypadající perloočky mají tělo zbarvené do tmavě hnědé či šedé barvy (obr. I-4). Oblast filtračního aparátu, střeva a srdce se jeví jako jeden tmavý celek, někdy těžce rozpoznatelný od mikrosporidiální infekce. Střevo lze obvykle dobře pozorovat jen v hlavové oblasti, dále podél těla jej lze v tmavé masě tělních struktur pozorovat s těžší. Pokud je ve snůšce více vajíček, je obtížné je rozeznat. Pro tyto perloočky je charakteristická hnědá či šedá struktura na ventrální straně karapaxu (nejčastěji okraje skořápek kryjících hrudní končetiny) (obr. I-5) a v hlavové oblasti (obr. I-6) (zejména pod složeným okem a u rostra). Tato struktura většinou překrývá i hepatopankreatické výběžky. Karapax takto vypadajících perlooček má „zakouřený“ vzhled (obr. I-7).



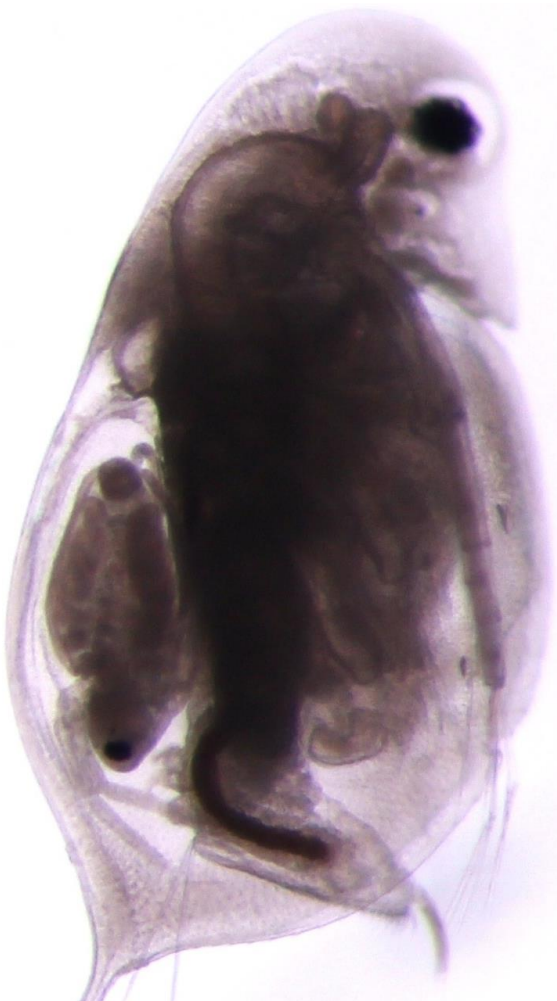
Obr. I-4: Celkový pohled na tělo perloočky. Karapax má „zakouřený“ vzhled. Oblast střeva a filtračních končetin tvoří jednu tmavě hnědou oblast. Hepatopankreatické výběžky, srdce a střevo je hůře pozorovatelné.



Obr. I-5: Pohled na ventrální oblast karapaxu.



Obr. I-6: Pohled na oblast hlavy.



Obr. I-7: Celkový pohled na tělo perloočky. Tmavá oblast podél střeva je lehce zaměnitelná se začínající mikrosporidiální infekcí.

Vzhled perloočky s mikrosporidiální infekcí

Mikrosporidiální infekci lze v pokročilém stádiu u druhů produkujících spory pozorovat jako celistvou tmavou masu spor v těle perloočky (obr. I–8). Jednotlivé spory, které jsou pozorovatelné pouze pod mikroskopem po pitvě perloočky, mají hruškovitý tvar. Perloočky s mikrosporidiální infekcí většinou mají (na rozdíl od výše zmíněných „hnědých“ perlooček) průhledný karapax bez zbarvení a šedých struktur. Hepatopankreatické výběžky jsou také dobře viditelné (pokud není mikrosporidiální infekce rozšířená až do hlavové části těla). Pozorovala jsem, že u většiny perlooček, nakažených druhy mikrosporidií běžnými v přehradních nádržích, se začíná tmavý shluk spor objevovat v dorzální oblasti těla, přibližně v první třetině délky střeva. Z této části se infekce rozšiřuje podél střeva do oblasti filtračního aparátu nebo do hlavové oblasti. Oblasti střeva, které nejsou zakryté tmavým shlukem, jsou dobře pozorovatelné a průhledné (neobsahuje-li střevo zbytky potravy).



Obr. I–8: Perloočky nakažené mikrosporidiální infekcí. Infekci lze pozorovat jako tmavý shluk podél střeva. Zbytek těla perloočky je průhledný. Na obrázku vpravo lze dobře rozeznat průhledné úseky střeva, které nezakrývá masa spor. V těchto úsecích lze pozorovat spory mikroparazita *Caullerya mesnilli* (červené šipky).

Metodika

Vzorky zooplanktonu pro vyšetření přítomnosti mikroparazitů u perlooček r. *Daphnia*

Vzorky zooplanktonu, které byly odebrány na přehradních nádržích v rámci projektu „Hybridní zóny v pelagiále nádrží: faktory zodpovědné za lokální dominanci mezidruhových hybridů perlooček r. *Daphnia*“ byly využity k několika studiím, a proto byly přímo na místě odběru fixovány třemi způsoby. Vzorky pro genetickou analýzu byly zamrazeny v tekutém dusíku. Vzorky pro kvantitativní analýzu (abundance zooplanktonu) byly fixovány ve 4% formaldehydu. Vzorky pro morfologickou analýzu a pro analýzu mikroparazitů byly fixovány v 96% etanolu (metodika viz práce: Sed'a et al. 2007a, Petrusek et al. 2008a). Pro mou diplomovou práci jsem z 11 etanolových vzorků zooplanktonu z přehradní nádrže Vír a Vranov v laboratoři náhodně vybírala po 100 perloočkách, které jsem vyšetřovala pomocí stereomikroskopu Olympus SZX12 (se zvětšením: objektiv 1,5 krát a zoom 85,5 krát) na přítomnost 4 skupin mikroparazitů.

Výskyt hnědých perlooček ve fixovaných vzorcích z přehradních nádrží Vír a Vranov

Poté, co jsem ve svých vzorcích začala rozeznávat neobvykle vypadající perloočky, které byly svým hnědým zabarvením a šedými strukturami uvnitř těla napohled téměř k nerozeznání od mikrosporidiální infekce, jsem se začala zabývat otázkou, zda se tyto perloočky vyskytují ve vzorcích z obou odebíraných přehradních nádrží (Vír a Vranov) a zda ve všech měsících. K porovnání jsem zvolila vzorky z lokality „střed“. Ze všech odběrových termínů jsem náhodně vybrala 20 dospělých samiček perlooček, u kterých jsem zaznamenala přítomnost a míru hnědého zabarvení.

Výskyt hnědých perlooček ve fixovaných vzorcích z jiných lokalit

Dalším krokem jsem se snažila zjistit, zda se hnědé perloočky vyskytují jen ve vzorcích zooplanktonu z přehradních nádrží Vír a Vranov nebo jsou přítomné i ve vzorcích z jiných lokalit. V této době byly na katedře ekologie PřF UK dostupné vzorky zooplanktonu z řady evropských lokalit. Vyhodnotila jsem proto několik vzorků z následujících severských jezer: Siplejtjønn, Sortedam, Ericadam, Lo Je Sø, Brededam, Agnetedam, Nyefosdam (Dánsko) a jezero Hiidenvesi (Finsko). Tyto vzorky byly odebrány v červenci a v listopadu v roce 2004 a fixovány v etanolu.

Výskyt hnědých perlooček v živých vzorcích bez fixace

Také mne zajímalo, zda lze tmavé zbarvení těla pozorovat i u živých jedinců, protože během mého studia perlooček neměl žádný z oslovených expertů (mezi nimi Jiří Vávra, Dieter Ebert, Ellen Decaestecker) jednoznačnou představu, čím by mohl být tento vzhled perlooček způsobený. Někteří odhadovali, že by se mohlo jednat o nějakou bakteriální infekci. Během června a července v roce 2012 jsem odebírala na několika místech v Praze (Hamerský rybník, rybníky u zámku Krč, rybník Šeberák, vodní nádrž Hostivař, Košíkovské nádrže, Olšanský rybník) vzorky zooplanktonu. Tyto vzorky jsem nefixovala a rovnou jsem je v den odběru prohlížela pomocí stereomikroskopu. Pro lepší pozorování rychle se pohybujících perlooček jsem na podložní sklíčko vložila mezi perloočky vatová vlákna.

Vliv etanolu na vzhled perlooček

Při prohlížení poledních živých vzorků z pražských lokalit jsem nedopatřením místo vody přidala na podložní sklíčko etanol. Vlivem fixace se ihned začaly zdravé průhledné perloočky zbarvovat do tmavě hnědé barvy a jejich hemolymfa začínala měnit strukturu a vytvářela šedé shluky, zejména v oblasti hlavy. Výsledný vzhled fixovaných perlooček byl stejný jako u vzorků výše. Zjistila jsem tedy, že neobvyklý vzhled perlooček je zřejmě artefaktem fixace, způsobeným náhlým ponořením živé perloočky do 96% etanolu. Naskytla se tedy otázka, zda by tento negativní efekt na pozorované vzorky neovlivnila jiná koncentrace fixačního média.

Vliv rozdílné koncentrace etanolu na vzhled perlooček

Vliv rozdílných koncentrací fixačního činidla na vzhled perlooček jsem porovnávala na perloočkách z rybníku Nad Zátěším - Novodvorská (Praha) a z rybníku Smyslov (Blatná). Vzorky byly odebírány 14. 7. a 4. 12. 2012. U obou vzorků se vyskytovaly perloočky nakažené bakterií *Spirobacillus cienkowskii*. Tato bakterie napadá hemolymfu a způsobuje růžové zbarvení perloočky. Tyto perloočky byly výborným vzorkem pro porovnávání vlivu různé koncentrace fixačního činidla na vzhled infikovaných perlooček. Živé perloočky měly růžovou hemolymfu, jejich střevo bylo díky zbylé potravě zelené a vajíčka měly oranžové tukové kapénky.

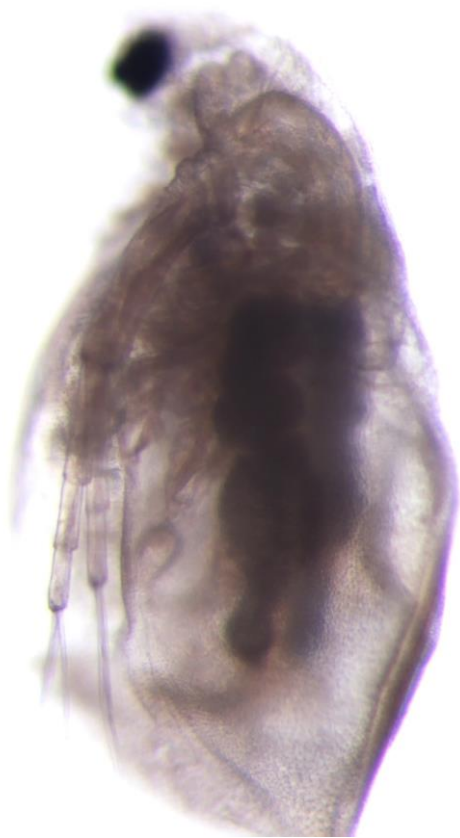
- Do každé ze čtyř 25 ml zkumavek jsem náhodně vybrala 5 živých perlooček z daného odběru. Následně jsem v každé zkumavce změnila poměr přefiltrované rybníční vody a fixačního média (96% etanol).
 1. zkumavka: 5 perlooček + 96% etanol
 2. zkumavka: 5 perlooček + 1 (voda) : 1 (etanol)
 3. zkumavka: 5 perlooček + 2 (voda) : 1 (etanol)
 4. zkumavka: 5 perlooček + 3 (voda) : 1 (etanol)
- Tyto série jsem ještě jednou zopakovala, ale po 10 minutách jsem obsahy roztoků ve všech zkumavkách nahradila 96% etanolem
- Poslední sérii jsem připravila do uzavíratelných 25 ml lahviček. Perloočky z této série jsem pozorovala po třech měsících od data fixace vzorků.

Rozeznání mikrosporidií a vajíček

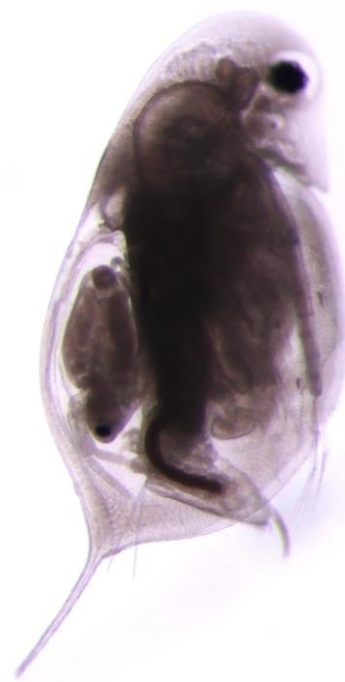
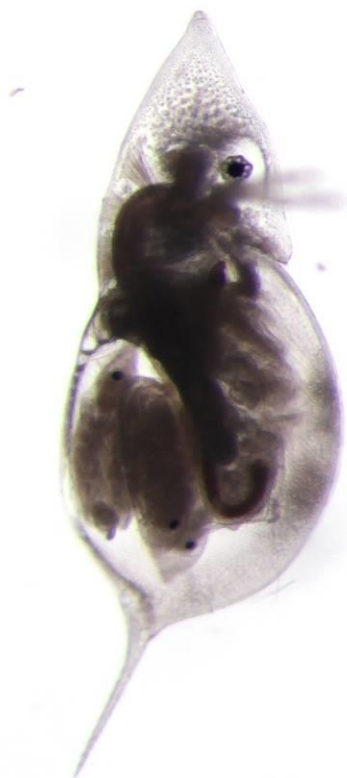
Poté, co jsem zjistila, jaký vliv má etanol na vzhled fixovaných zdravých i infikovaných perlooček, jsem se mohla vrátit ke svým původním vzorkům z přehradních nádrží Vír a Vranov. Znovu jsem vyšetřovala prvotní vzorky s jistotou, že hnědé perloočky neznamení přítomnost mikrosporidiální infekce a že ve většině případů se jedná o zdravé jedince, jejichž vzhled byl změněn v důsledku fixace. Během své práce jsem však narazila na další problém, který mě opět vrátil na začátek a byl důvodem, proč jsem několik vzorků prohlížela během své práce třikrát.

Některé perloočky, u kterých jsem určila mikrosporidiální infekci, ve skutečnosti parazitované nebyly. Perloočky nakažené mikrosporidií jsou rozpoznatelné podle tmavé masy parazitických spor. Spory však nejsou pod stereomikroskopem pozorovatelné. Tmavá masa spor se většinou začínala vyskytovat v dorzální části těla a rozšiřovala se podél střeva do oblasti filtračního aparátu nebo do oblasti hlavy. Podél střeva se také vyskytují vaječníky perlooček. Pokud byly plné vajíček, fixace etanolem způsobila jejich zhnědnutí a vytvoření stejně tmavé masy podél střeva jako u mikrosporidií (obr. I-9 a I-10). U mnoha perlooček nešlo bez pitvy rozeznat zda, se jedná o infekci či vliv fixace na vaječníky.

Jako dobrá metoda pro správné rozlišení mikrosporidiální infekce od tmavého shluku tvořeného fixovanými vajíčky ve vaječnicích se osvědčilo prohlížení perlooček na tmavé látce s bočním bodovým osvětlením. To mi umožnilo vidět mikrosporidiální infekci jako mléčný shluk uvnitř těla perloočky (P. J. Juračka, os. sdělení). Pozorováním infikovaných perlooček v temném poli pomocí stereomikroskopu jsem nedosáhla takového efektu zviditelnění mikrosporidií jako při využití tmavé tkaniny.



Obr. I-9: Vlevo zdravá perloočka, u které lze na obou stranách podél střeva rozpoznat vaječníky a vpravo také zdravá perloočka, u které lze vaječníky zaměnit s mikrosporidiální infekcí, protože vlivem fixace vytváří jeden tmavý masivní shluk.



Obr. I-10: Zdravé perloočky s tmavou masou uprostřed těla. Jedná se o vliv fixace na vaječníky perlooček. Od mikrosporidiální infekce těžce rozeznatelné.

Zesvětlení hnědých perlooček

Během práce s perloočkami, jsem se také snažila nalézt vhodnou metodiku pozorování, která by ulehčila rozeznávání mikrosporidiální infekce od hnědých perlooček zejména, nejsou-li pro laboratorní práci k dispozici živé vzorky perlooček a pitva již fixovaných hnědých perlooček není možná (z důvodu nutnosti zachování vzorků pro další práci). Byla mi doporučená metoda, která umožňuje i u těchto perlooček docílit průhledného vzhledu a zviditelní mikrosporidiální infekci v podobě mléčného shluku. Perloočky postačí vložit nejméně na 3 dny do Petriho misky do směsi glycerinu (jiný index lomu světla) smíchaného se 70% etanolem (pro lepší promísení fixovaných etanolových vzorků s glycerinem a rychlé odpařování) v poměru 1 : 1 (J. Vávra, os. sdělení). Tuto metodu jsem úspěšně vyzkoušela na několika hnědých perloočkách a na perloočkách, u kterých jsem s jistotou určila mikrosporidiální infekci.

Fotodokumentace

Rozdíly ve vzhledu u zdravých, hnědých a infikovaných perloočkách jsem se pokusila zdokumentovat pomocí stereomikroskopu a digitálního zrcadlového fotoaparátu CANON EOS 650D.

Výsledky

Výskyt hnědých perlooček ve fixovaných vzorcích z přehradních nádrží Vír a Vranov

Při porovnávání jednotlivých vzorků z přehradních nádrží Vír a Vranov (stanoviště „střed“) bylo evidentní, že nejčastěji se vykytovaly neobvykle vypadající perloočky v jarních a letních měsících (tab. I–1). V těchto vzorcích byly perloočky velmi tmavé a počítání vajíček ve snůšce (kterých bylo v jarním období nejvíce) bylo velmi obtížné. Zajímavé bylo, že ostatní pěkně průhledné perloočky, které byly zjevně bez infekce, měly většinou jen 1 – 2 vajíčka ve snůšce. Naopak na podzim a v zimě se ve vzorcích vyskytovaly perloočky méně tmavé a spíše převažovaly průhledné perloočky bez zjevné infekce či nestandardního zbarvení. V tomto období měly vybrané perloočky daleko méně vajíček (0 – 2) než v letním období.

Datum	Počet hnědých perlooček z 20		Míra hnědého zbarvení
	Vranov	Vír	
6. 5. 2009		10	***
7. 5. 2009	15		***
9. 6. 2009		13	**
9. 6. 2010		17	***
10. 6. 2009	15		***
10. 6. 2010	14		***
22. 7. 2009	17		***
27. 7. 2010		6	**
1. 10. 2010	11		**
2. 11. 2010		1	*
3. 11. 2010	3		*
10. 12. 2010	14		**
15. 12. 2009	1		*

Tab. I–1: Výskyt „hnědých“ perlooček ve vzorcích z jednotlivých odběrů ze stanoviště „střed“. Data odběru jsou seřazeny podle měsíců (sezón) bez ohledu na rok (2009, 2010). Čísla ve sloupcích značí počet „hnědých“ perlooček z 20 náhodně vybraných. Počet * značí úroveň hnědého zbarvení:

*** = perloočky byly velmi tmavé. Jednotlivé tělní struktury bylo obtížné rozeznat. Nešlo spolehlivě určit, zda se nejedná o mikrosporidiální infekci.

** = oblast hlavy a oblast ventrální části karapaxu obsahovaly hnědé struktury. Dalo se lépe rozeznat, že se nejedná o mikrosporidiální infekci.

* = perloočky vypadaly jako zdraví jedinci, mírný náznak hnědého zbarvení karapaxu.

Výskyt hnědých perlooček ve fixovaných vzorcích z jiných lokalit

Po prohlédnutí zooplanktonu pod stereomikroskopem jsem zjistila, že i tyto fixované vzorky ze severských jezer obsahují tmavé perloočky se stejným vzhledem, jaký jsem pozorovala u svých vzorků, a že je jejich výskyt poměrně častý.

Výskyt hnědých perlooček v živých vzorcích bez fixace

Ve všech odebraných vzorcích zooplanktonu z pražských lokalit byly perloočky zjevně zdravé a průhledné. Žádnou hnědou perloočku jsem v živých vzorcích nepozorovala.

Vliv rozdílné koncentrace etanolu na vzhled perlooček

Rozdílná koncentrace fixačního činidla měla stejný vliv na vzhled perlooček jak z letního odběru, tak ze zimního odběru. Perloočky, které byly ve zkumavce s 96 % etanolem, byly ihned tmavé, jejich karapax i oblast hlavy měly našedlou barvu, tukové kapénky vajíček a střevo ztratily svou původní barvu a hemolymfa byla také tmavá. Po tomto způsobu fixace nešlo rozeznat původně zdravé perloočky od perlooček s infikovanou hemolymfou. Při použití koncentrací 1 : 1 a 2 : 1 (voda : etanol) byl výsledný vzhled perlooček nepatrně lepší. Některé infikované perloočky měly sraženou hemolymfu a při bedlivém prohlížení se již dalo lépe poznat infikovanou a neinfikovanou perloočku. Perloočky ze zkumavky, kde byl poměr 3 : 1 (voda : etanol), vypadaly nejlépe. Střevo i tukové kapénky vajíček měly zachovanou původní barvu. Těla perlooček byla pěkně průhledná a bez hnědého zbarvení či šedých struktur v oblasti hlavy. U nakažených perlooček se hemolymfa mírně srazila, zůstala však růžová a jasně bylo poznat, které perloočky byly infikované.

U série zkumavek, ve kterých byl po 10 minutách vyměněn obsah fixačního média za 96% etanol, vypadaly všechny perloočky stejně. Ztratily původní barvu, zhnědly a nešlo rozlišit infikované a zdravé jedince.

Perloočky ze série zkumavek pozorovaných až po 3 měsících od fixace byly hnědé, se ztrátou původních barev a nešlo rozlišit infikované jedince. Pouze u zkumavky s poměrem 3 : 1 (voda : etanol) měly perloočky zachovanou původní růžovou barvu hemolymfy a byly průhledné bez hnědého zbarvení.

I když perloočky ze série zkumavek s nejnižší koncentrací etanolu vypadaly nejlépe, nebyla jsem s výsledkem fixace spokojená tak, abych ji mohla doporučit jako nejvhodnější fixační poměr etanolu a vody ke zpracování vzorků zooplanktonu. U těchto perlooček byl zachován původní vzhled, ale byly velmi křehké a náchylné k deformaci. Lehké promáčknutí či protrhnutí karapaxu ztěžovalo práci při prohlížení perlooček s entomologickou pinzetou či preparační jehlou.

Bylo zajímavé, že některé perloočky po vložení do vyšších koncentrací etanolu nezměnily svou barvu a v jejich těle nevznikly sražené struktury. Toto mne také zaujalo u fixovaných vzorků z přehradních nádrží Vír a Vranov. I když jsem prohlížela vzorky, u

kterých převažovaly perloočky se silně hnědým zbarvením, vždy se našly některé, které měly typický průhledný vzhled. Zajímalo mne, jak k tomu mohlo dojít, protože všechny perloočky z daných odběrů byly fixovány stejným způsobem a ve stejný moment. Během vkládání živých perlooček z rybníčních vzorků do 96% etanolu jsem zjistila, že po fixaci zůstaly průhledné právě ty perloočky, které se zdály být mrtvé již před fixací.

Alternativní způsob fixace

Jako nejlepší způsob fixace zdravých i infikovaných perlooček se mi však osvědčila „fixace postupným přikapáváním“. Tímto názvem mám na mysli fixaci postupným a pomalým přikapáváním 96% etanolu na sklíčko s vyšetřovanou perloočkou, dokud není perloočka usmrcena. Pokud přidáváme vysoce koncentrovaný etanol po kapkách, nedochází k tak výraznému osmotickému šoku a prudké kontrakci těla perloočky. Tělo perloočky reaguje na každou kapku stáhnutím schránek k sobě, ale životní projevy ustávají pomalu a nedochází k výrazným morfologickým změnám. Tento postup je sice pomalý a pro velký počet pozorovaných perlooček nevhodný. Pokud však potřebujeme pro krátkodobé účely či fotodokumentaci pozorovat infikované perloočky jednotlivými skupinami parazitů, je tato metoda výborná, protože fixované perloočky vypadají stejně jako před fixací, jednotlivé symptomy infekcí lze snadno pozorovat a je zachována pevnost karapaxu.

Diskuze

Při určování mikroparazitů u perlooček z druhového komplexu *Daphnia longispina* ve vzorcích určených pro mou diplomovou práci jsem objevila vzhledově odlišné perloočky. Tyto perloočky měly tmavě hnědé zabarvení těla a podobaly se perloočkám s rozvinutou mikrosporidiální infekcí. Tyto neobvykle vypadající perloočky se také vyskytovaly ve fixovaných vzorcích zooplanktonu z jiných lokalit, naopak v živých vzorcích zooplanktonu jsem je neobjevila. Při práci v laboratoři jsem nedopatřením zjistila, že tmavé zabarvení těla a vznik šedých struktur v hlavové oblasti se začaly objevovat ihned poté, co jsem živé perloočky vložila do 96% etanolu.

Několik odborných prací a příruček je věnováno tématu fixace zooplanktonu a porovnávání vlivu různých fixačních činidel na výsledný vzhled fixovaných organismů. V žádné práci jsem ovšem nenašla podobný popis morfologických změn u perlooček, který jsem po fixaci 96% etanolem pozorovala, a který v této práci podrobně popisují. Pouze práce autorů Haney a Hall (1973) naznačují možnou pigmentaci perlooček, které jsou fixovány ve více jak 70% alkoholu. Žlutého zabarvení u perlooček z etanolových vzorků si všímají i Black a Dodson (2003). Autoři uvádějí, že perloočky vložené do formaldehydu byly průhledné, ve srovnání s různými koncentracemi etanolu (Black & Dodson 2003). Detailnější popis etanolových vzorků zde však není uveden. Z toho by mohlo vyplývat, že volba formaldehydové fixace by mohla zachovat původní vzhled perlooček a být vhodnější metodou při hledání symptomů jednotlivých skupin mikroparazitů.

Tito autoři si ovšem všímají další důležité změny v morfologii perlooček - křehkost karapaxu a náchylnost k deformaci těla během manipulace. Perloočky z 95% etanolu měly pevnější schránky a byly odolnější k deformaci, naopak perloočky z formaldehydu byly křehčí (Black & Dodson 2003). Křehkost těla perlooček je důležitá vlastnost, která ztěžuje práci při určování jednotlivých skupin mikroparazitů. Jednotlivé skupiny jsou pozorovatelné pod různým zvětšením a infikují různé části těla perloočky. Pro identifikaci je nutné perloočku otáčet či s ní jinak manipulovat pomocí preparační jehly či entomologické pinzety. Křehké perloočky se lehce rozpadnou nebo promáčknou. Gotze a Jungbluth (2013) ve své práci porovnávali fixaci zooplanktonu pomocí acetonu a 95% etanolu a také zaznamenali větší pevnost schránek u etanolových vzorků. Křehkost karapaxu nezpůsobuje jen fixace formaldehydem či acetonem, ale také fixace méně než 96% etanolem (Steedman 1976). To se shoduje i s mým pozorováním perlooček fixovaných v různém poměru voda : 96% etanol. Perloočky ze série s fixačním médiem 3 : 1 (voda : 96% etanol) měly zachované všechny

původní barvy, byly průhledné bez hnědého zbarvení nebo šedých struktur v oblasti hlavy a karapaxu. Pro určování mikroparazitů byla tedy nízká koncentrace etanolu výhodná. Tyto perloočky byly ovšem (ve srovnání s perloočkami z 96% etanolu) velmi křehké, manipulace s nimi byla náročná, protože se při uchopení rozpadaly. Schránky karapaxu perloočky byly doširoka rozevřené (odstávaly od těla) a abdomen byl „vyhřezlý“ směrem ven z těla a zahnutý směrem k rostru. Pokud je schránka perlooček takto deformovaná, z plodové komůrky perlooček se během fixace vysypou vajíčka či embrya a nelze je počítat.

Takto vypadající perloočky jsou popsány i v práci autorů Haney a Hall (1973). Termínem „*balloned animals*“ označují perloočky s vyboulenými a rozevřenými schránkami karapaxu, postabdomenem vyčnívajícím ven a většinou ztraceným obsahem plodové komůrky (Haney & Hall 1973). Tomuto „nabobtnání“ perlooček lze podle autorů předejít použitím vodného roztoku 4% formaldehydu s 40 g/l sacharózy (Haney & Hall 1973). Ke snížení křehkosti etanolových vzorků může být také nápomocné přidání 2-5% propylenglykolu (Dhargalkar & Veclecar 2004).

Z výše uvedených studií i mého pozorování tedy vyplývá, že použití fixačních činidel: acetonu, formaldehydu a etanolu s nižší koncentrací nevede k zásadním změnám v průhlednosti a zbarvení perlooček, ale fixování jedinci jsou křehčí, náchylní k deformaci a vyboulený karapax vede k vysypání obsahu plodové komůrky. Tyto vlastnosti jsou tedy nevýhodné pro analýzu plodnosti perlooček a pro manipulaci s perloočkami při identifikaci mikroparazitů. Formaldehydové výpary jsou navíc zdraví škodlivé. Naopak použití 95% etanolu umožní zachovat pevnost karapaxu perlooček i jejich tvar a ztráty vajíček jsou menší (Black & Dodson 2003). Vysoká koncentrace etanolu a prudká osmotická změna ovšem vede k hnědému zbarvení perlooček a ke vzniku šedých sražených struktur v jejich těle. Zařazování mikroparazitů perlooček do jednotlivých skupin na základě pouhého pozorování symptomů pomocí stereomikroskopu může být v případě použití 96% etanolu velice obtížné, protože tmavé zbarvení dané fixací se velmi podobná symptomům mikrosporidiální infekce.

I pokud fixace 96% etanolem nezpůsobí tak výrazné ztmavnutí těla perlooček, které by mohlo být zaměnitelné s masou parazitických spor, lze mikrosporidiální infekci ještě zaměnit s vaječníky. Vaječníky perlooček se nachází podél střeva v oblasti, kde byla většinou rozšířená i mikrosporidiální infekce. Pokud byly vaječníky plné vajíček, způsobil etanol jejich ztmavnutí do takové míry, že bez pitvy perloočky nebylo možné rozeznat, zda se jedná o infekci či vajíčka. Nežádoucího vlivu fixace na vzhled vajíček/ embryí si všimli i Black a Dodson (2003). Ti ve své práci uvádějí, že i když zůstaly perloočky po fixaci etanolem průhledné, embrya v plodové komůrce (obzvláště ty na začátku vývoje) ztratila průhlednost a

ztmavla. To ztěžuje určování embryí do jednotlivých stádií vývoje či počítání vajíček (Black & Dodson 2003).

Další možností fixace vzorků pro laboratorní prohlížení zooplanktonu je použití narkotik. Hlavním účelem narkotik je zabránit prudké kontrakci těla a zkrácení fixovaných vzorků (Steedman 1976), proto by měla být narkotika dávkována po kapkách (Dhargalkar & Veclecar 2004). Steedman (1976) ve své práci uvádí, že jako narkotikum lze použít i 95% etanol, který je přidáván k živému planktonu po kapkách. Autor uvádí, že „vhodný poměr etanolu pro jednotlivé exempláře by měl být nalezen metodou pokus/omyl“. Tento popis se přesně shoduje s mým postupem „postupného přikapávání“ 96% etanolu k živým perloočkám. Tato metoda je časově náročná, proto ji nedoporučuji při práci s velkým množstvím vzorků. Pokud je však potřeba vyšetřit malé množství perlooček nebo je použit k fotodokumentaci mikroparazitů, je tento postup fixace výborný. Perloočky zůstanou průhledné bez zhnědnutí či sražených struktur a jejich schránka si zachová pevnost bez deformačních změn. Střevo se zbytky potravy, tukové kapénky vajíček či nakažená hemolymfa si také zachovají původní barvy. U takto fixovaných vzorků lze snadno a rychle rozpoznat symptomy jednotlivých infekcí, zejména mikrosporidiální infekce je rozpoznatelná jako tmavý shluk uprostřed těla perloočky.

Závěrem bych chtěla uvést ještě jedno pozorování, které popisují u fixovaných vzorků s hnědými perloočkami z přehradních nádrží Vír a Vranov. Nejčastěji se tyto hnědé perloočky vyskytovaly v jarních a letních měsících, kdy měly ve snůšce velký počet vajíček nebo měly dobře vyvinutá embrya. Naopak na podzim a v zimě převažovaly ve vzorcích průhledné a zdravé perloočky s 0 – 2 vajíčky. Naskytá se tedy možné vysvětlení, že by tento vzhled perlooček mohl také souviset s fyziologickým stavem samic perlooček. Pro tuto domněnku jsem však nenašla potvrzení či relevantní informace v odborné literatuře. Tato otázka tedy může sloužit jako námět dalšího studia.

Metodická doporučení pro identifikaci mikroparazitů ve vzorcích perlooček rodu *Daphnia*

Z uvedených výsledků mého pozorování a odborných prací navrhuji jednotlivé kroky, které mohou usnadnit práci při identifikaci mikroparazitů a vést ke správnému odhalení mikrosporidiální infekce u perlooček:

1. Nejlépe lze mikrosporidie (a mnohé jiné mikroparazity) pozorovat na živých vzorcích perlooček s omezením pohybu díky vatovým vláknům.
2. Pokud potřebujeme použít perloočky k fotodokumentaci mikroparazitů, doporučuji provést fixaci živých vzorků postupným přikapáváním 96% etanolu. Tento postup nemění vzhled perlooček a např. mikrosporidie lze snadno rozpoznat.
3. Jestliže již máme perloočky fixované v etanolu a jejich vzhled odpovídá mému popisu hnědých perlooček, je nejspolehlivější perloočky rozpitvat pod mikroskopem a zjistit, zda se v těle nenachází typické hruškovité spory mikrosporidie.
4. Není-li ovšem pitva hnědých perlooček možná z důvodu nutnosti zachování vzorků pro další práci, lze i u těchto perlooček docílit průhledného vzhledu. Postačí je vložit nejméně na 3 dny do směsi glycerinu a 70% etanolu v poměru 1 : 1. Následně lze mikrosporidiální infekci rozpoznat jako mléčnou masu uprostřed těla.
5. Pokud máme fixované perloočky bez hnědého zabarvení, ale přesto nelze dobře rozlišit, zda se jedná o mikrosporidii či vliv fixace na vaječníky, může být nápomocné prohlédnutí perloočky z dorzální strany: mikrosporidiální infekce většinou obklopila střevo v daném místě ze všech stran. Tmavá masa způsobená fixací vaječníků byla rozšířena pouze na bočních stranách střeva.
6. Další pomůckou, jak odhalit mikrosporidie ve fixovaných vzorcích, může být jejich pozorování stereomikroskopem na sklíčku položeném na černé husté tkanině s bočním osvětlením (bodový zdroj). Pokud má perloočka mikrosporidiální infekci, lze ji pozorovat jako mléčný shluk uvnitř těla.

PŘÍLOHA II

Seznam vzorků a naměřené charakteristiky vody

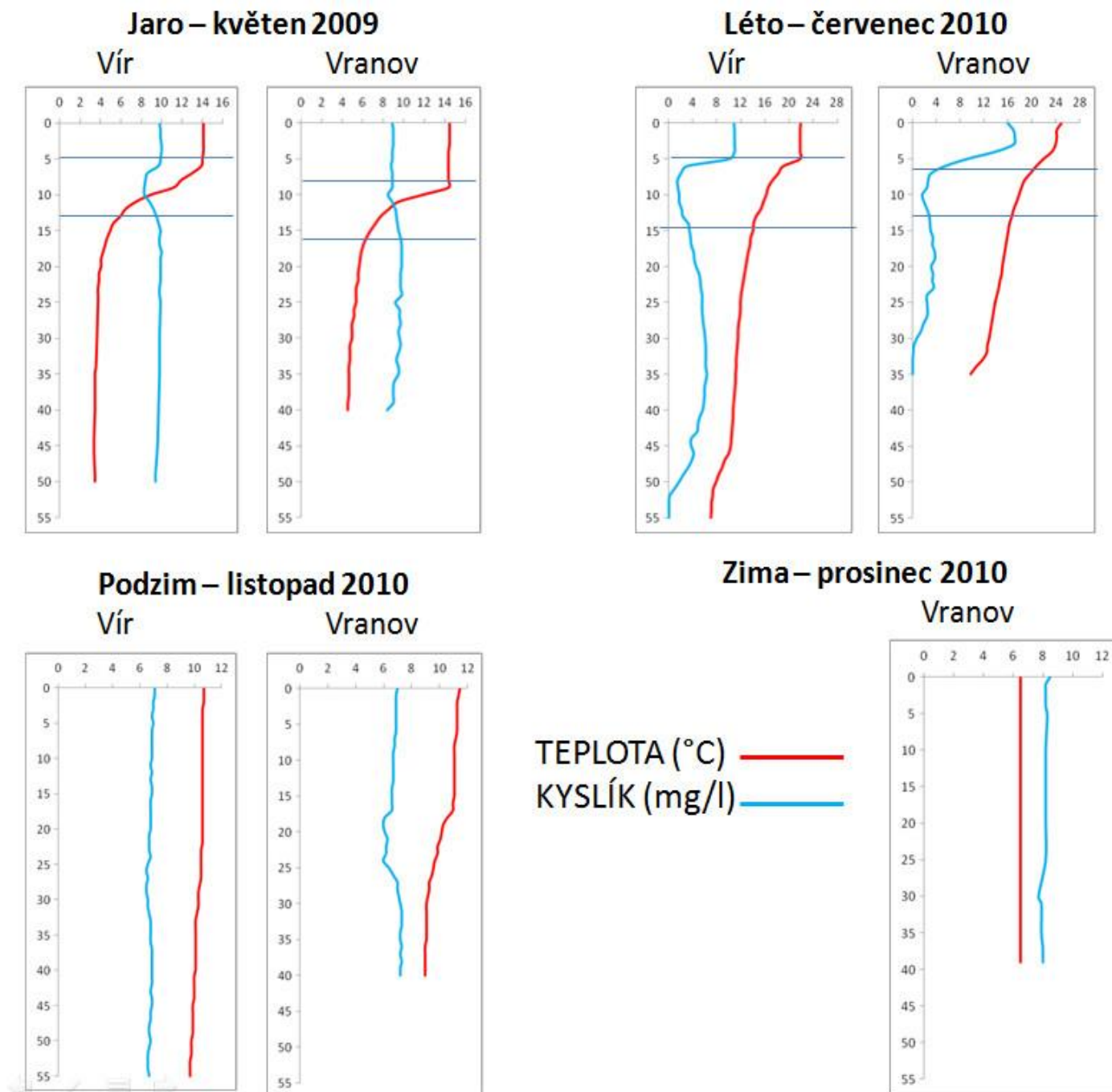
Přehrada	Datum	Stanoviště	T - ve středu epi. (°C)	O ₂ - ve středu epil. (mg/l)	Průhlednost (cm)	P total (μg/l)	Chl-a total (μg/l)	Potrava [PCA1 × (-1)]
Vír	6.5.2009	přítok	12,6	9,8	170	48,7	23,27	0,09
		střed	13,3	9,8	200	31,3	12,53	-0,48
		hráz	14,1	9,9	210	30,3	10,40	-0,57
	27.7.2010	přítok	20,5	8,9	95	65,2	148,40	2,61
		střed	20,8	9,8	150	51,6	30,01	0,33
		hráz	21,8	11,0	160	39,3	24,29	0,00
	2.11.2010	přítok	10,3	8,8	220	35,0	2,31	-0,66
		střed	10,6	7,2	280	34,5	1,44	-0,94
		hráz	10,7	7,0	290	36,7	0,80	-0,95
Vranov	7.5.2009	přítok	15,1	12,0	40	104,1	109,85	2,87
		střed	14,0	11,0	90	43,3	56,08	0,85
		hráz	14,4	8,9	400	49,9	1,32	-1,19
	10.6.2009	přítok	20,0	16,4	40	127,0	120,43	3,41
		střed	19,1	10,8	400	22,5	13,27	-1,45
		hráz	19,5	12,0	550	14,4	4,58	-2,34
	22.7.2009	přítok	21,2	10,0	90	121,2	34,29	1,77
		střed	chybí	chybí	190	45,5	33,61	0,12
		hráz	21,9	9,0	370	35,3	16,61	-1,06
	10.6.2010	přítok	21,3	11,1	90	66,6	35,04	0,90
		střed	22,6	8,3	370	23,5	3,47	-1,46
		hráz	20,7	9,7	590	21,0	5,18	-2,39
	21.7.2010	přítok	24,0	13,2	60	135,0	94,41	3,05
		střed	24,7	12,1	190	34,2	33,88	-0,06
		hráz	24,2	12,2	190	20,1	30,33	-0,34
	1.10.2010	přítok	14,3	9,7	110	153,2	61,92	2,63
		střed	15,8	6,6	300	54,1	9,80	-0,57
		hráz	15,9	5,7	380	49,3	4,03	-1,07
	3.11.2010	přítok	10,1	8,4	280	70,8	20,92	-0,05
		střed	10,9	6,7	395	58,8	1,65	-1,02
		hráz	11,3	6,9	380	58,8	1,90	-0,95
10.12.2010	přítok	0,7	13,4	chybí*	73,2	4,91	-0,13	
	střed	5,0	9,3	250	58,3	3,35	-0,40	
	hráz	6,5	8,2	chybí*	51,2	1,67	-0,54	

Tab. II-1: Seznam vzorků a naměřené charakteristiky vody. Na všech stanovištích byla měřena průhlednost a v každém metru hloubky teplota a množství rozpuštěného kyslíku. Proměnná „potrava“ byla získána pomocí analýzy hlavních komponent z předchozích třech uvedených proměnných (viz kap. Vyhodnocování dat).

* Pro účely PCA analýzy byla pro lokality přítok a hráz (Vranov 10. 12. 2010) zvolena stejná průhlednost jako pro lokalitu střed, tj. 250 cm.

PŘÍLOHA III

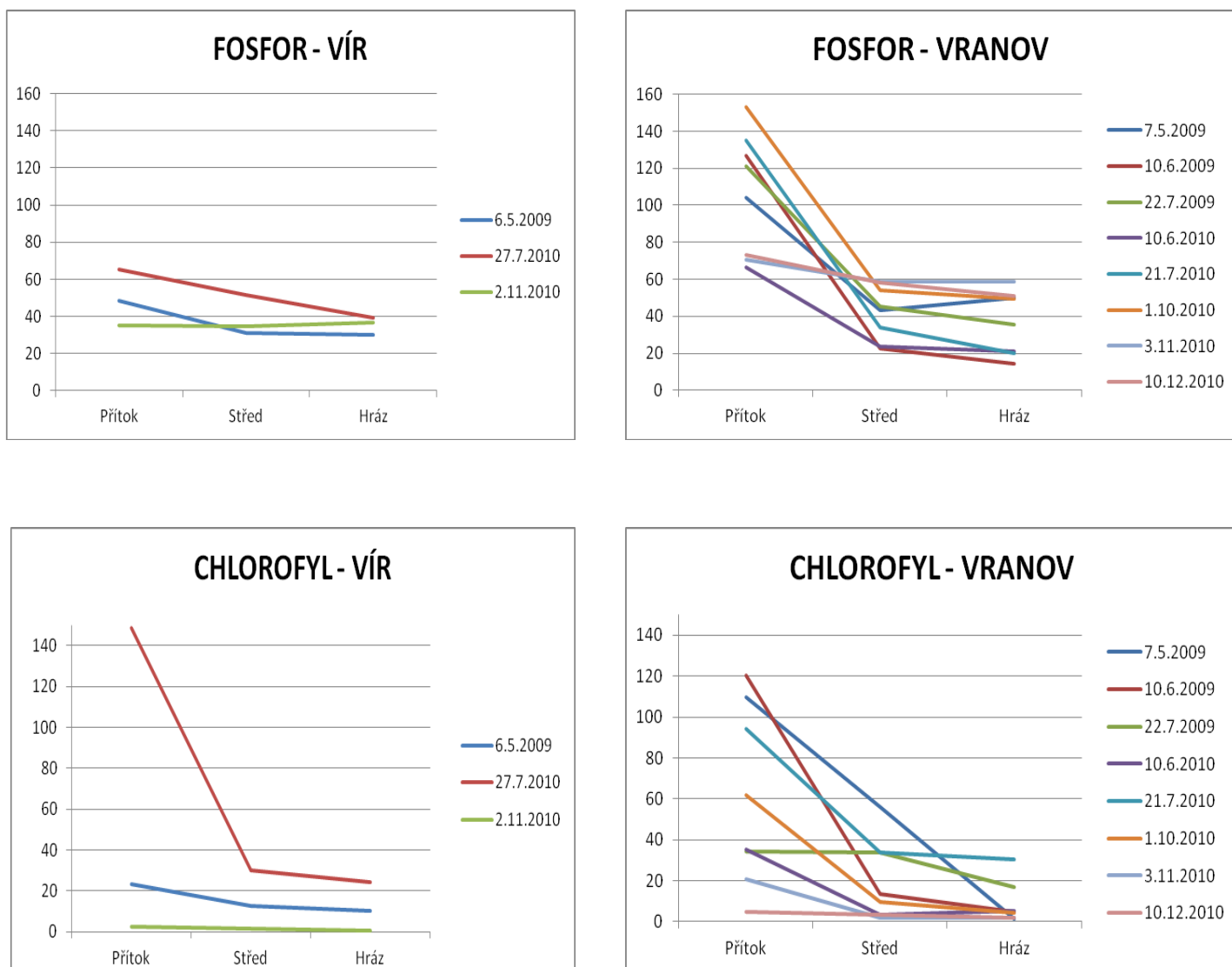
Vývoj teplotní stratifikace



Obr. III-1: Vývoj teplotního gradientu a množství rozpuštěného kyslíku během roku v přehradní nádrži Vír a Vranov ze stanoviště hráz. Vyhodnocovány jsou pouze data z odběrných termínů, které byly totožné pro obě přehradní nádrže, tj.: květen 2009, červenec 2010, listopad 2010. V prosinci 2010 byla vzorkována pouze přehradní nádrž Vranov. U grafů ze sezony jaro a léto jsou vodorovnou čarou vyznačeny hranice vrstev epi-, meta- a hypolimnia.

PŘÍLOHA IV

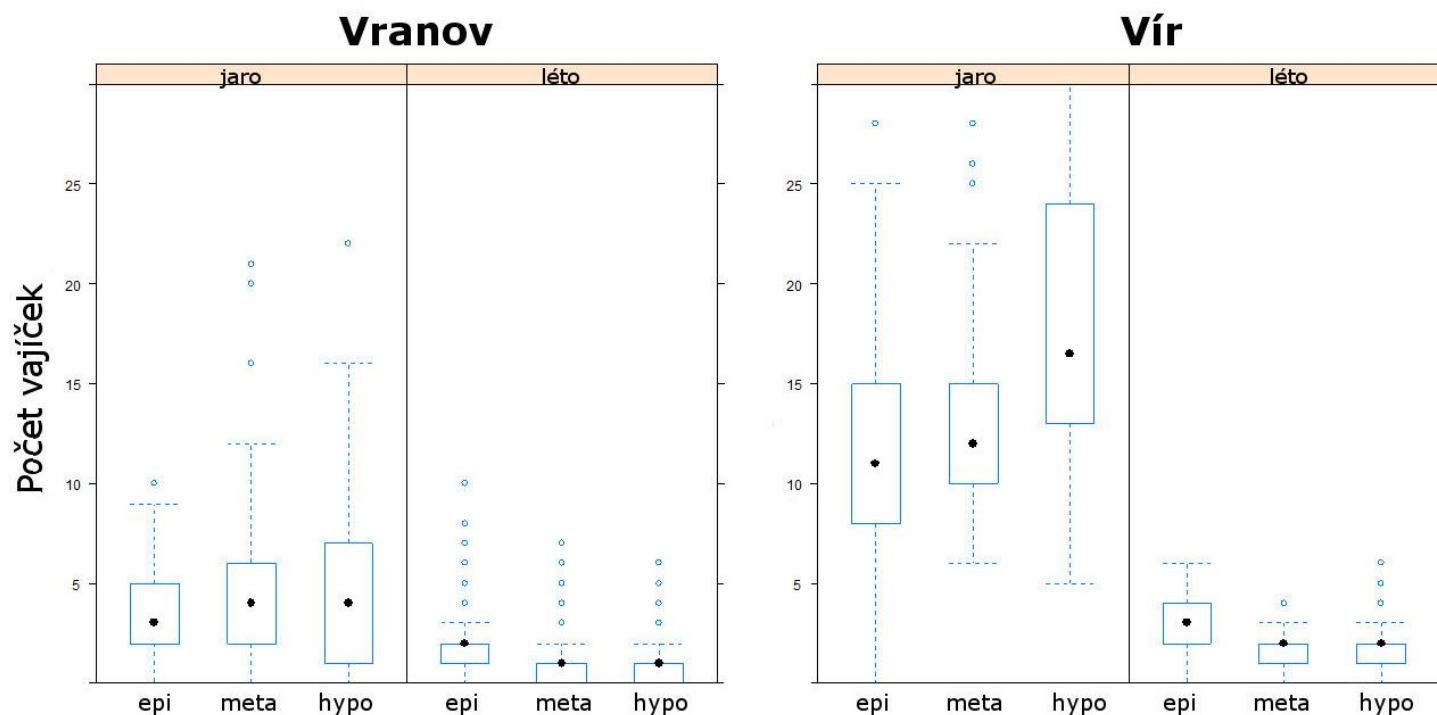
Množství chlorofylu a a celkového fosforu



Obr. IV-1: Naměřené hodnoty chlorofylu a ($\mu\text{g/l}$) a celkového fosforu ($\mu\text{g/l}$). Naměřené hodnoty jsou ze všech 11 odběrů z přehradních nádrží Vír a Vranov v letech 2009 a 2010 ze stanovišť přítok, střed a hráze.

PŘÍLOHA V

Plodnost perlooček na vertikálním profilu



Obr. V–I: Krabicové diagramy porovnávající plodnost perlooček (osa y) na stanovišti hráz v přehradních nádržích Vranov a Vír z odběrových termínů na jaře 2009 a v létě 2010. Počet vajíček u perlooček je porovnáván v závislosti na jejich výskytu ve vertikálním profilu přehradní nádrže (osa x). Vysvětlivky: **epi** = epilimnion, **meta** = metalimnion, **hypo** = hypolimnion. Černé body reprezentují medián, horní a dolní okraje obdélníků kvartily, přerušovanou čarou je vyznačen rozsah hodnot (s vyloučením odlehlých hodnot, které jsou vyznačeny kroužkem). Vzorky zahrnuté do analýzy: Vír - květen 2009, červenec 2010 + Vranov - květen, červen, červenec 2009 a červen, červenec 2010.

Faktor	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměr čtverců	F hodnota	p hodnota
přehrada	1	7114	7114	999.47	$< 2 \times 10^{-16}$
přehrada:sezona	2	14238	7119	1000.13	$< 2 \times 10^{-16}$
přehrada:sezona:pozice	8	1035	129	18.18	$< 2 \times 10^{-16}$

Tab. V–1: Výsledky hierarchické analýzy rozptylu (h-ANOVA) plodnosti perlooček na vertikálním gradientu v rámci studovaných nádrží.

PŘÍLOHA VI

Výskyt mikroparazitů v přehradní nádrži Želivka

3. - 5. 8. 2009	<i>Caullerya mesnili</i>	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	<i>Oomycety</i>	<i>Mikrosporidie</i>	Počet nemoc. perlooček	Počet zdravých perlooček
Přítok	6	0	0	8	14	86
Vojslavice	23	8	0	4	35	65
Zahrádka	20	3	1	2	26	74
Střed	17	2	0	1	20	80
Most	2	2	0	0	4	96
Hráz	0	0	1	0	1	99

Tab. VI-1: Výskyt jednotlivých skupin mikroparazitů u perlooček rodu *Daphnia* ze vzorků odebíraných 3. – 5. 8. 2009 z přehradní nádrže Želivka. Z každého stanoviště bylo vyšetřeno na přítomnost mikroparazitů 100 perlooček.