

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Metody odchovu sladkovodních mlžů pro účely
záchranných programů**

Bakalářská práce

Autor práce: Věra Plechingerová

Vedoucí práce: Ing. Karel Douša, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Metody odchovu sladkovodních mlžů pro účely záchranných programů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Karlovi Doudovi za pomoc a rady při psaní bakalářské práce a Mgr. Ondřejovi Simonovi za umožnění se podílet na experimentu v Dobré na Šumavě a za poskytnutí dat, které využívám v mé práci.

Metody odchovu sladkovodních mlžů pro účely záchranných programů

Souhrn

Práce je napsána formou přehledu o problematice chovu sladkovodních mlžů. Na začátku práce nejprve zhodnocuji celkový stav populací v České republice a poté ve světě. Dále popisuji anatomii a biologii mlžů, zejména reprodukci, která je klíčová pro odchov juvenilních jedinců v laboratorních podmínkách či polopřirozeném prostředí. Navrácení populací mlžů do ekosystémů vod je problematické z hlediska neustálých změn biotopu, zejména antropogenními vlivy a málo vhodných hostitelských ryb, bez kterých glochidie nemohou dokončit svůj vývoj. Aby se zabránilo úplnému vyhynutí některých druhů, vyvinuly se různé metody odchovu, které napomáhají navrácení životaschopných populací do přirozeného prostředí vod. Metody odchovu zde také popisuji. V experimentální části posuzuji typy detritů, které mají různé vlivy na přírůstky mlžů. Pro experiment byla vybrána perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*), jejichž populace je velmi ohrožená. Sladkovodní mlži jsou důležitými bioindikátory ekosystémů vod, kde mají nenahraditelnou funkci, proto je důležité obnovit jejich populace a celkový stav biotopů.

Klíčová slova: *Margaritifera margaritifera*, *Anodonta anatina*, *Anodonta cygnea*, *Unio tumidus*, *Unio crassus*, *Unio pictorum*, *Pseudanodonta complanata*, *Dreissena polymorpha*, marsupium, glochidia, *Mytilus edulis*.

Freshwater mussels breeding methods for the purpose of conservation programs

Summary

Bachelor thesis is written in an overview form of problems breeding freshwater mussels. At the beginning of the thesis I first evaluate the overall status of the populations in the Czech Republic and then in the world. Next I describe the anatomy and biology of mussels, especially their reproduction, which is crucial for rearing juveniles in the laboratory or seminatural environment. The return of mussel population into the waters ecosystems is problematic in terms of ongoing changes in the biotope, particularly because of the anthropogenic influences and too few suitable host fish, without which it can not complete its glochidia development. To prevent the complete extinction of some species, there have been researched different methods of rearing, which help recover viable populations in the natural water environment. Methods of rearing are also described in this thesis. In the experimental part of the thesis I evaluate types of detritus that have different effects in length gain of mussels. For the experiment was selected freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*), whose population is highly endangered. Freshwater mussels are an important bio-indicator of waters ecosystems, where they have an irreplaceable function, so it is important to regenerate their populations and the overall condition of the biotopes.

Keywords: *Margaritifera margaritifera*, *Anodonta anatina*, *Anodonta cygnea*, *Unio tumidus*, *Unio crassus*, *Unio pictorum*, *Pseudanodonta complanata*, *Dreissena polymorpha*, glochidia, *Mytilus edulis*, freshwater mussel.

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce.....	9
3	Přehled literatury.....	10
3.1	Rozdělení a charakteristika skupiny velkých mlžů.....	10
3.2	Populace sladkovodních mlžů v České republice, Moravě a Slovensku ...	11
3.3	Populace sladkovodních mlžů ve světě.....	12
3.4	Anatomie mlžů.....	13
3.4.1	Stavba a charakteristika schránek	13
3.4.2	Glochidium	13
3.4.3	Růst a proces vývoje nohy	14
3.4.4	Růst dospělců.....	14
3.5	Biologie z hlediska chovů.....	15
3.5.1	Reprodukce	15
3.5.2	Testování vhodných rybích hostitelů.....	16
3.5.3	Ovlivňování ryb glochidii během infekce	17
3.5.4	Vliv teploty	17
3.5.5	Nemoci a parazité sladkovodních mlžů	18
3.5.6	Potravní zdroje.....	19
3.5.7	Testy toxicity	20
3.6	Účely chovů	21
3.6.1	Záchranné programy	21
3.6.2	Produkční využití.....	22
3.7	Metody reprodukce a chovu.....	23
3.7.1	Kompaktní systém odchovu juvenilních jedinců.....	24
3.7.2	In vitro.....	24
3.7.2.1	Příprava glochidií.....	25
3.7.2.2	Kultivace	25
3.7.2.3	Juvenilové	25
3.7.2.3.1	Genetické a ekologické důsledky při reintrodukcii mlžů z laboratoří.....	26
3.7.3	Polopřirozený odchov	26
3.8	Materiál a metody	27
3.8.1.1	Bioindikace detritu	27
3.8.1.2	Výsledky	29
3.8.1.3	Závěr experimentu	30
4	Závěr	31

5	Seznam literatury.....	32
6	Přílohy.....	38

1 Úvod

V této práci se zabývám ochranou sladkovodních mlžů, kteří patří mezi nejohroženější živočišné skupiny a zároveň jsou klíčovou funkční složkou pro udržení kvality vodních ekosystémů. Zaměřuji se na metody odchovu v Evropě, které mají potenciál napomoci strategiím ochrany mlžů v České republice. Každá lokalita vyžaduje individuální přístup s ohledem na místní podmínky. Vývoj plánu pro jakýkoliv druh, by měl zahrnovat požadavky druhu na stanoviště a nápravu podmínek na lokalitě, před uvolněním odchovaných juvenilních jedinců.

Hlavní důvodem ochrany není jen zachování druhů, ale sladkovodní mlži jsou důležitými indikátory jakosti vody a filtrátoři. Mezi negativně působící faktory patří ztráta přirozeného prostředí, eutrofizace vod, rybářské hospodaření, populace rybiho společenstva, predace a ubývání organického materiálu, který slouží jako potrava. S problematikou souvisí i nedostatečná informovanost veřejnosti o těchto druzích.

Práce je formulována jako ucelený přehled o stavu populací a popisuje různé metody odchovu a jejich efektivnost se zaměřením na produkci juvenilních jedinců, kteří jsou základem pro budoucí generace mlžů. Zároveň poukazují na současnou problematiku spojenou s odchovem jedinců, kde má důležitý vliv teplota, pH vody, filtrace vody, krmení a další faktory. Pro větší ucelenost se nejprve zabývám anatomií a biologií mlžů, zvláště důležitá je reprodukce a vlivy hostitelských ryb a nakonec metodami odchovu, které se používají. S touto problematikou je úzce spojen celkový ekosystém vod, který je antropogenními vlivy neustále měněn, lidské úpravy vedou k poklesu druhové bohatosti, biomasy a změnám druhového složení.

2 Cíl práce

V mé bakalářské práci se zabývám celkovou problematikou odchovu sladkovodních mlžů, která je v současné době stále zkoumána. Mezi hlavní důvody kritického poklesu populací je přeměna vodních ekosystémů. Aby bylo možné navrácení a zvýšení počtu těchto živočichů, je nezbytné znát jejich biologické požadavky, které se mohou lišit v rámci různých druhů. Proto jsem moji práci pojala jako souhrn důležitých aspektů zejména pro ohrožené druhy a následně popsala metody odchovu, které se používají. V experimentální části posuzuji přírůstky perlorodek, za určitý čas dle typů detritů.

3 Přehled literatury

3.1 Rozdělení a charakteristika skupiny velkých mlžů

Naši zástupci velkých mlžů, patří do nadřádu Palaeoheterdonta řádu Unionoida. Jsou rozděleny do dvou čeledí perlorodkovití (Margaritiferidae) a velevrubovití (Unionidae), (Beran, 1988).

Jsou filtrátoři, kteří mají jedinečnou životní strategii. Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*) a ostatní mlži jsou úzce vázáni na rybí hostitele oligotrofních vod, bez kterých nejsou schopni se reprodukovat. Populace perlorodek obývají zejména měkké vody s nízkým pH. Byly evidovány i v řekách s vyšší tvrdostí vody ve Walesu a vápenatých vodách v Irsku, ale v současné době, jsou tyto populace téměř vyhynulé. (Preston et al., 2010). K posílení jejich populací je nezbytně nutné aktivně chránit a formou řízené péče optimalizovat příslušná přírodní společenstva jednotlivých povodí. Zvláště perlorodka říční je zkoumána pro zachování říčních ekosystémů a splňuje koncept kritérií: vlajkový druh, bioindikátor a deštníkový druh (Geist, 2010). Bioindikátory označujeme jako organismy či jejich společenstva, jejichž životní funkce jsou těsně spojeny s faktory prostředí a mohou tak sloužit jako ukazatele daného biotopu (Boháč, 1999). Bioindikační význam skupiny je specifický zejména dlouhověkostí jedinců. Například zástupci rodu *Margaritifera* patří mezi nejdéle žijící známé bezobratlé živočichy, často dosahující stáří i přes 100 let (Fernandez et al., 2009).

Věk je variabilní mezi populacemi a závisí na tempu růstu. Čím rychleji perlorodka roste, tím má kratší život a naopak. Intenzita růstu je závislá na teplotě. Se zvyšující se polohou od severního Španělska k polárnímu kruhu je pomalejší růst, zatímco velikost a věk je vyšší. Vysvětluje se to úzkým vztahem mezi stálým růstem a metabolismem. Vlivem teploty se metabolismus zpomaluje a následně i růst. V neposlední řadě ovlivňuje růst i prostředí, například vlivem dusičnanů nebo eutrofizace vod (Bauer, 1992).

3.2 Populace sladkovodních mlžů v České republice, Moravě a Slovensku

Populace sladkovodních mlžů byly v minulosti bohaté v mnoha potocích a řekách (Labe, povodí Odry a Dunaje v České republice) ve střední Evropě. Do 21. století mlži často vyhynuli v nižších a středních polohách a současné populace se pouze blíží k horní hranici jejich přirozeného výskytu. Značný pokles těchto populací je ovlivněn intenzivním zemědělstvím, průmyslem, odpadními vodami, změnami populací vhodných hostitelských ryb aj. Všechny tyto vlivy mají za následek selhání reprodukčního cyklu mlžů. Například u perlorodky říční se poslední významná skupina juvenilních mlžů usadila přibližně před 30-40 lety, proto je tento druh považován za kriticky ohrožený, reprodukce u ostatních druhů se v České republice nezastavila. Zachování populací je stále hlavním cílem ochrany, za tímto účelem probíhá od roku 1984 záchranný program, který má zlepšit věkovou strukturu mlžů. První fáze spočívala zejména ve vypuštění infikovaných ryb miliony glochidii na dvou lokalitách a druhý představoval vypuštění 53 000 juvenilních jedinců (stáří 3-5 let) v sedmi lokalitách. Určitou úspěšnost dosáhl pouze druhý přístup, kde byli pozorováni jedinci na povrchu sedimentu. I přes současnou snahu obnovit stanoviště mlžů v průběhu posledních 25 let, k úspěšné reprodukci v České republice nedochází. Proto je tedy klíčová obnova oligotrofních toků. V současné době je *Margaritifera margaritifera* ohroženým druhem v legislativách Evropské unie a je chráněna v rámci soustavy Natura 2000 (Simon et al., 2014).

Přítomnost perlorodky říční byla v jižních Čechách potvrzena v devíti faunistických mapovacích čtvrcích v povodí Vltavy až k Lipenské přehradě, řece Blanici až do Čichtice a řece Malši do Skoronice. Izolovaní jedinci byli také nalezeni ve středních úsecích Blanice a řeky Malše. Populace jsou méně početné než v minulosti (Matasová et al., 2013). V České republice se dále vyskytují zástupci čeledi velevrubovití, mezi které patří velevrub malířský (*Unio pictorum*), velevrub nadmutý (*Unio tumidus*), velevrub tupý (*Unio crassus*), škeble rybničná (*Anodonta cygnea*), škeble říční (*Anodonta anatina*) a škeblička plochá (*Pseudanodonta complanata*). Na Moravě se vyskytují tyto stejné druhy kromě perlorodky říční, kde je tento druh pravděpodobně vyhynulý (chybí potvrzení výskytu déle než 30 let). Na Slovensku se všechny druhy z čeledi velevrubovití vyskytují. Perlorodka říční se zde nevyskytuje. Na všech třech území se vyskytuje nepůvodní druh škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*), která může mít potencionální hrozbu pro tyto původní druhy, protože je schopná parazitovat na různých druzích ryb. (Horsák et al., 2010).

K získávání údajů o výskytech mlžů se používají vizuální metody, odběry vegetace či sedimentu za pomoci kuchyňského cedníku (průměr 20 cm, velikost ok 0,5-1 mm). Dospělí jedinci mlžů se hledají pohmatem na písčítých až bahnitých místech (Beran, 2011).

3.3 Populace sladkovodních mlžů ve světě

Sladkovodní mlži mohou tvořit až 90 % bentické biomasy v řekách (McIvor, 2004). Unionoida jsou celosvětově rozděleni do 6 čeledí a 165 rodů (Bogan, 1993). Z hlediska početnosti druhů má Severní Amerika největší rozmanitost sladkovodních mlžů ve světě, téměř 300 druhů, nicméně zde patří mezi nejvíce ohrožené skupiny zvířat (Jones et al., 2005). Skupina mlžů je více než ze 70 % původních druhů ohrožená nebo je předmětem zvláštní pozornosti. Za příčiny nebo faktory poklesu populace jsou považovány změna a znečištění životního prostředí, introdukce exotických druhů, odlov, nemoci, predace (Augspurgen et al., 2003). Mezi introdukované druhy patří slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) z řádu Veneroida, která se svými byssovými vlákny přichycuje k pevnému povrchu včetně schránek ostatních druhů mlžů a tím znemožňuje příjem potravy a pohyb (Baker and Levinton, 2003). Je pravděpodobné, že slávička mnohotvárná má i podobné potravní nároky jako původní druhy, za tímto účelem proběhla studie v Americe, výsledky uvádím v kapitole o potravních zdrojích. Významný úbytek bentické biomasy, může mít za následek velké a funkční změny v ekosystému (Vaughn and Hakenkam, 2001).

3.4 Anatomie mlžů

3.4.1 Stavba a charakteristika schránek

Schránka mlžů je tvořena dvěma souměrnými lasturami, které jsou na horní straně vyklenuté ve vrcholy a spojeny pružným konchinovým vazem. Vaz je umístěn směrem dozadu od vrcholů, tak lze zjistit přední a zadní stranu lastur (Ložek, 1956). Schránka měkkýšů je vylučována kožním záhybem, který se nazývá plášť. Stěny schránek se skládají z několika vrstev. Vrchní vrstva se nazývá periostrakum, která je tvořena konchinem a je nositelem zbarvení, které se odvíjí od přijímání pigmentů z potravy. Základní barva a vzor jsou dány geneticky pro každý druh, její proměnlivost je závislá na okolním prostředí. Pod konchinem se nachází dvojité vrstva tvořena uhličitanem vápenatým, která především u velkých mlžů nejvíce souvisí s tvorbou perel (Beran, 1998).

Sladkovodní mlži vykazují vysokou vnitrodruhovou morfologickou variabilitu a některé morfologické rysy schránek, které jsou spojovány s již zmíněnými podmínkami prostředí. Není známo, zda a které z těchto ekofenotypových rozdílů reflektují zásadní genetickou diferenciaci anebo jsou výsledkem fenotypové plasticity. Proběhl například výzkum velevruba malířského (*Unio pictorum*) na řece Temže ve dvou různých typech přírodních stanovišť. Nebyly nalezeny žádné významné genetické rozdíly mezi těmito stanovišti, což naznačuje, že morfologické rozdíly ve stupni prodloužení schránky a tvaru lastury jsou způsobeny fenotypovou plasticitou (Zieritz et al., 2010).

3.4.2 Glochidium

Glochidia jsou malá larvální stádia s dvoudílnou schránkou uložená ve vaku zvaném marsupium, která vypouští oplodněné samice mlžů (Pekkarién, 1996). Velikost glochidií je druhově specifická (délka schránky je v rozmezí okolo 0,05-0,45 mm). Analýzy ukazují, že velikost glochidií je rozhodující složkou ve spojitosti s vývojem reprodukčních strategií v rámci řádu Unionoida. Zástupci jednoho konce jako jsou perlorodky s malými glochidii, vysokou plodností, dlouhou parazitární fází, delším růstem na specifickém hostiteli. A jsou také vysoce specializovaná s ohledem na prostředí. Naopak, většina druhů škeblí má velká glochidia, nízkou plodnost, krátkou parazitární fází bez růstu, široké spektrum hostitelů a žijí v různých stanovištích (Bauer, 1994).

3.4.3 Růst a proces vývoje nohy

Noha je dominantním orgánem, signalizuje jasný znak raného juvenilního přežití a dokončení proměny. Metamorfózu glochidií lze pozorovat i v podmínkách in-vitro v rybí plazmě, která se používá jako jedna z metod odchovu.

U škeble rybníčné (*Anodonta cygnea*) tvorba nohy zahrnuje několik rostoucích etap od dvou malých symetrických a zahnutých laloků, kde se juvenilní noha bude nacházet. Tyto laloky se rozvíjí do větších a dobře definovaných struktur v jeden pevný základ, který roste směrem nahoru. Poté se dva laloky spojí a vytvoří definitivní nohu s dlouhou řasou. Schránka juvenilů roste během prvních sedmi dnů v přední části, rostoucí linie ji protahují. Nová schránka roste směrem k háčku, kde tvoří mírnou prohlubeň. Tito juvenilové rostou 70 μm do šířky v nové periostrakum. Plášť hraničí s novou schránkou a primitivní žábry jsou obě pokryty ciliemi. Nakonec 15 den vyrostou o 425 μm a přibývá nová část periostraka, zejména v laterální a zadní části také spojené se značným ukládáním vápníku (Lima et al., 2006).

3.4.4 Růst dospělců

Velcí mlži žijí v různých typech prostředí a jejich růst ovlivňují především teplotní a živinové podmínky, ačkoli jsou výjimky, které poukazují na dodatečné faktory, které mohou mít vliv (Hastie et al., 2000). Například byla zjištěna menší velikost schránek u perlorodek, které se vyskytovaly v tvrdých vodách (Preston et al., 2010). Po rozříznutí vazy lze u dlouhověkých mlžů pozorovat jednotlivé přírůstkové vrstvy, určuje se tím počet let (Beran, 1998).

Dle (Zieritz, 2011) je samičí populace mlžů více „nadmutá“ než samci. Je pravděpodobné, že ke změně šířky růstu dochází, když je samice oplozená. Schránky samic mají tendenci být méně silné. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v rychlosti růstu obvodu u samců a samic mlžů. Investování energie do velikosti než do tloušťky může být výhodné, ukazuje se, že opakovaná plodnost zvyšuje velikost Unionoida.

Podmínky stanoviště mohou podstatně ovlivnit optimální růst mladých mlžů a následnou dobu života a reprodukční schopnost populace. Obnova vybraných povodí by měla umožňovat pomalý růst a dlouhou dobu přežívání (Hruška, 1999).

3.5 Biologie z hlediska chovů

3.5.1 Reprodukce

Aby byla produkce mlžů v chovných systémech efektivní, je nezbytné znát, jak probíhá reprodukce v přirozeném prostředí a poté se znalosti uplatní i při produkci i v umělém nebo polopřirozeném odchovu. Reprodukci vysvětlují dále na perlorodce říční, která je v současnosti nejčastějším druhem v odchovných programech.

Populace perlorodky říční (*M. margaritifera*) silně poklesla v Evropě a je tedy prioritním druhem ochrany (Geist, 2010).

Reprodukce mlžů nastane, když samec vypustí gamety do vodního sloupce a samice filtrováním fytoplanktonu pasivně přijme spermie. Oplození se odehrává uvnitř specializované dutině v žaberních listech samice (masurpium), kde začíná zrání glochidií (Galbraith and Vaughn, 2009).

Životní cyklus zahrnuje obligátní fázi vývoje larev glochidií, které potřebují vhodné hostitelské ryby. Mezi ně patří pstruh potoční (*Salmo trutta*), nebo losos obecný (*Salmo salar*). V létě jsou glochidia samicí vypuštěny do vody, kde se pasivně proudem vody přichytí na hostitele. Glochidie zůstávají infekční po dobu několika dní a na krátké vzdálenosti od místa kde se uvolnila. Po vdechnutí se glochidium přichytí na žábřácích a obalí se cystou, epiteliární buňkou hostitele. Během pobytu uvnitř cysty se glochidie přibližně 6-10 zvětší a přemění do juvenilního stádia. Na začátku měří glochidium 0,07mm poté měří 0,4-0,5mm. Na hostiteli parazitují až 11 měsíců, poté se excystují a zahrabou do substrátu na dně řeky (Gum et al., 2011). Doba parazitování na rybích hostitelích je u mlžů rozdílná, může trvat několik dnů až měsíců (Douda et al., 2012). Například metamorfóza *Unio crassus* trvá v laboratorních podmínkách 6-14 dní (Reis et al., 2014).

Asi po 5 letech se juvenilní jedinci perlorodek objevují na povrchu substrátu a živí se jako filtrátoři. Během té doby jsou závislí na stabilním substrátu s vysokou kvalitou sedimentu a intenzivní výměnou mezi volně proudící vodou a intersticiální vodou. Vhodnost různých druhů a populací rybích hostitelů mlžů není zcela známa, výzkum stále probíhá. Pohlavní zralost perlorodek nastává mezi 10-20 rokem. Tato pozdní zralost je kompenzována počtem glochidií, přičemž jedna samice vypustí 1- 4 miliony glochidií (Thomas et al., 2010). Význam vlivu teplot je nezbytně důležitý pro odchovy a zpětnou reintrodukci. Znalost o vývoji parazitární fáze je zvláště důležitá pro umělý odchov a ochranná opatření. Aby se zabránilo vyhynutí prioritních populací perlorodky, několik evropských zemí zahájilo opatření a polopřirozené odchovné programy (Gum et al., 2011).

Stejně jako u většiny sladkovodních mlžů je u perlorodky pohlaví většinou oddělené, ale byly pozorovány samice, které se staly hermafrodity, kvůli malé hustotě populace (Bauer, 1987). Perlorodky jsou velice závislé na životaschopných rybích populacích.

3.5.2 Testování vhodných rybích hostitelů

Problematika znalosti vhodných rybích hostitelů je důležitá z hlediska minimalizace úmrtnosti a k následné produkci především ohrožených druhů mlžů, jako je perlorodka říční. Testování vhodných hostitelských ryb stále probíhá. Hostitelsko-parazitární vztahy umožňují stanovit priority ochrany, jsou proto důležité.

Douda a Beran (2009) z prvních výsledků analýz hostitelských ryb z České republiky ukazují, že nelze primárně přejímat vhodné hostitelské ryby z jiných oblastí. V našich podmínkách může dojít k rozdílnostem. Různé hostitelské ryby mohou také poskytovat odlišně vitální juvenilny. Vhodný hostitel umožňuje zacystování glochidií a následnou metamorfózu v juvenilního jedince. Při testování je vhodné použít mladé ryby 0+, zde je předpoklad že nemají vyvinutou imunitní reakci při infekci glochidii (Thomas et al., 2010).

V České republice proběhl výzkum velevruba tupého, kde hlavním cílem bylo stanovit vhodné hostitelské ryby a následně posoudit jejich populace v řekách. Bylo hodnoceno 27 druhů ryb, které byly z líhní nebo z přirozených stanovišť a nebyly doposud infikovány mlži. Výsledky ukazují, že primárními hostiteli jsou střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*) a vranka obecná (*Cottus gobio*). Tito dva primární hostitelé jsou citliví na antropogenní vlivy a jejich populace je klíčovým zdrojem pro tyto mlže (Douda et al., 2012). Výzkum velevruba tupého proběhl i v Německu, kde byli jako nejvhodnější hostitelé vyhodnoceny střevle potoční a jelec tloušť (Taeubert et al., 2012). Jedním z oslabení populací vhodných hostitelů jsou migrační bariéry pro rybí hostitele eliminující přirozené procesy disperze juvenilních jedinců (Douda a Beran, 2009).

Jako u předchozích studií Douda et al. (2013) potvrdili, že škeble říční má schopnost parazitovat na téměř každém domácím druhu ryb, který je vystaven infekci glochidii. Tento výsledek souvisí se širokou specífitou hostitelských ryb u většiny druhu Anodontinae. Naproti tomu úspěch přichycení na nepůvodních hostitelích je podstatně menší. Genetická diferenciacie druhů v celém území je dalším potencionálně důležitým faktorem, který ovlivňuje vztahy hostitelských přírodních populací. Vzhledem k vysoké genetické rozdílnosti napříč Evropou mohou existovat lokální specifické adaptace na hostitelské ryby. Byly zjištěny rozdílnosti ve schopnosti infekce jednotlivých rybích hostitelů v rámci sousedních populací

velevruba tupého (Douda et al., 2014). Další důležitou skutečností je, že laboratorní experimenty ukazují pouze částečný pohled na přírodní svět, který se může lišit rychlostí infekce, prostorovým uchycením glochidií, podmínkami prostředí, které zahrnují možné dopady způsobené použitím uměle odchovaných ryb (Kostow, 2004). Uměle odchované ryby nelze vypustit v chráněných územích, je zde možná jen přirozená reprodukce ryb (Hruška, 1999).

3.5.3 Ovlivňování ryb glochidii během infekce

Parazitické druhy mohou mít vliv na chování hostitele různými způsoby. Horký et al. (2014) zkoumali parazitické behaviorální účinky. Předmětem sledování byla *Anodonta anatina* a jelec tloušť. Zkoumání změn v hostitelském chování proběhlo v laboratoři a dvěma terénními experimenty za použití pasivního integrovaného transpondéru a radiotelemetrie. Infikované ryby byly obecně méně aktivní v laboratoři a v terénu méně rozptýleny daleko proti proudu. Kromě-toho radiotelemetrie ukázala posun stanoviště, kdy infikované ryby byly nalezeny dál od břehu. Naznačují, že vyvolané změny na rybách, které jsou vyvolané glochidii neusnadňují rozptýlení mlžů na dlouhou vzdálenost, ale spíše způsobují snížení aktivity ryb a nepatrné posunutí stanovišť.

Podobného výsledku dosáhla také další studie na perlorodce říční, kde byl zkoumán její vliv na pstruha obecného. Výsledky studie podporují názor, že glochidia způsobují respirační potíže u lososovitých ryb. Proto nejspíše není nejlepším řešením příliš infikovat ryby mnoho glochidii, aby nebyla narušená celková zdatnost hostitelů (Thomas et al., 2014).

3.5.4 Vliv teploty

Mlži jsou náchylní ke změnám životního prostředí, zejména na teplotní stres. Rostoucí teploty vody, způsobené vypouštěním z průmyslových závodů a změnami ve využití území nebo změna klimatu ohrožují skupinu Unionoida (Pandolfo et al., 2009).

Dle Galbraith et al. (2012) výsledky ukazují, že nedávná tepelná minulost ovlivňuje tepelnou toleranci, kombinace stresorů životního prostředí mohou ovlivňovat tepelnou toleranci a ta se liší u různých druhů. Pochopení teplotní tolerance druhů je také důležitá z hlediska změn v ekosystému. Znalost závislosti vývoje parazitární fáze na faktorech prostředí, kterými se řídí úspěšnost vývoje juvenilních mlžů je zvláště důležité a teplota je jedním z nich. Tato problematika však ještě stále není popsána. Například u perlorodky říční se dlouhodobě uvádělo, že potřebuje pro dokončení proměny přesáhnout po několik dní teplotu alespoň 15°C (Hruška, 1992).

Nedávná studie z Německa ale dokumentuje, že pro dokončení proměny může proběhnout i při stálé teplotě 11-12 °C. Ve standardizovaném laboratorním experimentu se, doba odpadnutí juvenilních jedinců ze pstruha obecného pohybuje mezi 1700 a 3400 denními stupni. Průměrná teplota mezi infekcí a začátkem odpadávání juvenilů (od září do února) byla 11,5°C. Během doby odpadnutí (únor až červenec) byla průměrná teplota vody 11,8 °C. Detailní načasování doby odpadnutí je důležité kvůli kontrole juvenilních jedinců. Tento poznatek může optimalizovat umělý chov perlorodky říční. Byl zaznamenán začátek odpadávání juvenilních jedinců mezi 18 dny po napadení a 11 měsíců po napadení v přirozených teplotních podmínkách (Taeubert et al., 2013)

Podrobněji byla tato problematika zkoumána u *Unio crassus*. Byly použity čtyři režimy teploty (12°C, 17°C, 20°C, 23°C). Byl zkoumán úspěch metamorfózy velevruba tupého na střevečli potoční (*Phoxinus phoxinus*). Nejprve se zkontrolují glochidie v masurpiu opatrným otevřením schránek samic (10). Samice se poté chovají při teplotě 17 °C a každý den probíhá výměna vody a kontrola uvolněných glochidií. Uvolnění glochidií proběhlo v rozmezí 3-5 dnů. Nejprve než se při pokusech přejde na samotnou infikaci ryb, je důležité vyhodnotit životaschopnost glochidií, vezme se jejich vzorek a pozoruje se pod mikroskopem reakce glochidií na NaCl, která způsobí jejich uzavírání. Všechny potencionální budoucí hostitelské ryby, byly při infikaci (~ 1000 glochidii) udržovány při teplotě 12° C. Infikace probíhala 40 minut za stálého míchání a okysličování. Střevečle potoční se poté rozdělily do skupin, přičemž počáteční teplota u všech byla zmíněných 12 °C a každý den se postupně zvyšovala o 3-4°C. Nejvyšší metamorfóza a zároveň nejnižší mortalita ryb byla zaznamenána při 17 °C. Teplota hraje důležitou roli ve vývoji mlžů i u ostatních druhů a nesmí být opominuta i v umělých chovech (Taeubert et al., 2014).

3.5.5 Nemoci a parazité sladkovodních mlžů

Sladkovodní mlži se v zajetí chovají zejména pro produkci perel a zvýšení populací. Nicméně infekčními onemocněními se věnovalo málo pozornosti. Eukaryotní organismy, zejména motolice, roztoči a *Conchophthirus* spp. jsou běžní parazité *Unionodia*, kteří mají potenciální schopnost snížit jejich zdatnost. Bylo izolováno několik potencionálních patogenních bakterií, ale jejich role v nemocnosti nebyla stanovena. Důkaz o virovém onemocnění bylo zjištěno u jednoho druhu sladkovodních mlžů, čínského *Hyriopsis cumingii* (velevrub goliáši). Potenciální větší působení patogenů nebylo adekvátně zhodnoceno (Grizzle and Brunner, 2009).

Mlži jsou mezihostiteli motolic, ale determinanty těchto infekcí zůstávají neznámé. Studie proběhly v severovýchodním Polsku. Výsledky ukazují, že motolice *Rhipidocotyle Campanula* a *Phyllodistomum* sp. hrají významnou roli u různých mlžů z hlediska reprodukčního úspěchu mezihostitelů. Výsledky prokázaly, že tlak těchto hlístic je spojen s věkem a pohlavím jejich hostitelů (Muller et al., 2015).

3.5.6 Potravní zdroje

Jak již bylo dříve zmíněno, mlži jsou filtrátoři, kteří se živí tím, že přečerpávají vodu přes žábry a odstraňují částice, které jsou jejich potravou. Filtrují potravu z vodního sloupce a sedimentu (Vaughn et al., 2008). Eulamellibranchia (kteří zahrnují Unionoidae) mají páry žaberních lupenů, které jsou zavěšeny na hřbetní straně těla uvnitř dutiny pláště. Žábry se skládají z řady vláken, které jsou propojeny tkáňovými křížovatkami a vedou k ústům.

Voda vstupuje do dutiny pláště přes inhalační sifon, odtud je voda čerpána do žaberní dutiny pomocí bočního pásu cilií. Částice z vody zachycují cílie nebo úponky, které procházejí mezi vlákna žaber. Cílie přenášejí zachycené částice na čelní úseky vláken, které přenášejí částice na ventrální a dorsální okraj žaber. Zde jsou částice buď začleněny do hlenového provazce, nebo přeneseny koncentrovaně dopředu do labiálních palpů. Zde jsou částice vytríděny. Částice vybrané pro požití jsou předány do ústního otvoru a nepotřebné jsou obaleny hlenem a vyloučeny. Rozdílnost ve struktuře a uspořádání cilií může rozdělovat u druhů potravinové zdroje (Vaughn et al., 2008) a mění se i velikost zachycovaných částic. *Anodonta anatina* a *Unio pictorum* mohou udržet více než 90 % částic o průměru větší než 4 μm (McIvor, 2004). Perlorodka říční je schopná pozřít i částice o velikosti 15 μm (Thomas et al., 2010).

Studie se zaměřením na potravní zdroje perlorodek ukazují, že v zaživacím traktu převládá jemný anorganický a rostlinný detrit a plankton. Ve výkalech byl nejvíce odbouraný rostlinný detrit. Detritus nevzniká jen v přírodním společenství, ale i v hospodářství jako organogenní detrit, v některých případech může působit na mlže až toxicky, nebo je naopak využíván jako potravní zdroj. Tento detrit je většinou výživnější a dochází tím ke zvýšení látkové výměny a následně k rychlejšímu růstu perlorodek. Rychlejší růst, ale zkracuje průměrný věk. Tento poznatek je nezbytné brát na vědomí v polopřirozených a umělých odchovech (Hruška, 1999).

Dle (Vaughn and Hakenkamp, 2001) bychom neměli předpokládat, že všechny druhy mlžů mají podobné mechanismy krmení a chování. Mlži mohou využívat různé potravinové zdroje v různých stanovištích. Nakonec bakterie může být důležitý potravní zdroj v prostředí,

kde se plankton vyskytuje jen ojediněle, například nedochází k jeho produkci ve stínu nebo kalných řekách, to není důležité pro jezera a rybníky kde se fytoplankton vyskytuje hojně. Na využití bakterií je právě závislá perlorodka říční. Filtrační rychlost se zvyšuje s teplotou, protože dochází k rychlejšímu metabolismu a také ji ovlivňuje koncentrace částic a rychlost proudu.

Některí mlži si mohou vzájemně konkurovat v potravních zdrojích či nárocích na hostitelské ryby. Ke konkurenci zejména dochází při invazi nepůvodních druhů, jako je například *Dreissena polymorpha* v Americe. Studie, které porovnávaly potravní nároky perlorodky říční a slávičky mnohotvárné ukazují, že za experimentálních podmínek oba druhy preferují stejnou velikost sinic (*Mycrocystis*), která byla 4 μ m, než u dalších druhů fytoplanktonu, které měly velikost > 6 μ m. Tento výsledek ukazuje patrnou konkurenci o potravní zdroje (Baker and Levinson, 2003).

3.5.7 Testy toxicity

Testy toxicity jsou nadále intenzivně řešenou problematikou, protože koncentrace látek jsou nedílnou součástí podmínek pro přežití populací. Především je zde důležitá tolerance a mezní hodnoty, které pak vymezují vhodné lokality. Zatímco mlži se jeví jako poměrně tolerantní k některým organickým rozpouštědlům a pesticidům, časná vývojová stádia patří k necitlivějším vodním organismům testovaných na dopady anorganických chemických látek, zahrnující chlór, kovy a amoniak. Amoniak je přírodní produkt rozkladu, dusíkatých organických látek a jeho významným zdrojem je průmyslový odpad, komunální čistírny odpadních vod a zemědělský odtok vody. Koncentrace amoniaku je obvykle vyšší u sedimentu než v nadložních povrchových vodách, proto zaslouží hlavní pozornost při vyhodnocování účinků látek na mlže. Toxicita amoniaku se mění s teplotou a pH (Augspurger et al., 2003).

Pro testy toxicity se používají všechna stádia mlžů, ale primárně juvenilní jedinci odchovaní v laboratorních podmínkách o různém věku. Například byly testovány zralé glochidia škeble říční, získané z oplozených samic. Glochidie se nejdříve několikrát propláchnou, aby se odstranily nečistoty a poté, se udělá zkouška životaschopnosti. Z testovaných kovů byla nejtoxičtější měď a nejméně zinek. Toxicita se zvyšuje s dobou expozice (Hansten et al., 1996).

3.6 Účely chovů

3.6.1 Záchranné programy

Záchranné programy se v současné době specializují na celkové zachování druhů, zejména těch ohrožených. Z našich zástupců velkých mlžů existuje záchranný program pouze pro perlorodku říční pod záštitou AOPK ČR (www.zachranneprogramy.cz). *Margaritifera margaritifera* je zahrnuta v seznamu UICN, červené listině jako ohrožený druh. V dodatku je tento druh uveden v příloze II a ve směrnici o stanovištích v příloze V (směrnice 92/43/EHS). Podle právních předpisů EU (směrnice 92/43/EHS, směrnice 97/62/EHS) členské státy mají za povinnost zachovat příznivý stav populace perlorodky. V Anglii, Skotsku a Walesu jsou perlorodky chráněné podle dodatku 5 zákona o volně žijících živočichů a venkova, nařízení z roku 1981 je trestný čin vzít, zabít nebo poranit perlorodku. V severním Irsku je podle 7 zákona z roku 1985 trestným činem prodej výrobků z nich udělaných nebo i samotné živé jedince (Preston et al., 2007). V roce 1978 světový fond na ochranu přírody ve Finsku a finské muzeum přírodní historie založily skupinu „Margaritifera working“. Během posledních 18 let, byly populace perlorodky kontrolovány ve více než 60 řekách různých částí Finska a některých řek ruské Karelie a Estonska. Celkem bylo inventarizováno okolo 2000 km protnutých výzkumných povodí. Nejlepší způsob obnovení populace perlorodky říční je ochrana stávající populace. Celkem jedenáct řek s perlorodkami patří do nové finské soustavy Natura 2000. V posledních desetiletích hlavní hrozbou pro perlorodku bylo odvodňování rašelinišť a lužních lesů. Jedním ze způsobů zabránění toku bahna do řek, je vytvoření bazénů kde se bahno ukládá. Chov pstruha duhového v přírodních řekách vede k částečnému snížení původního pstruha obecného a následně ke ztrátám glochidií, protože nemohou vyvíjet na pstruhu duhovém (Valovirta, 1998).

Až do první poloviny 20. století byl velevrub tupý považován za nejhojnější druh v Evropě. Dnes je *Unio crassus* považován za vysoce ohroženého v několika evropských státech a je uveden v přílohách II a IV EC stanoviště. Například v Německu je tento druh kriticky ohrožený a je jen několik málo nedotčených populací (Taeubert et al., 2012).

Sladkovodní ekosystémy obývá mnoho vzácných a ohrožených druhů, které jsou v současné době pod tlakem lidské činnosti. Znalost celkové biologie je pro tyto druhy zásadní, aby bylo možné zachovat jejich stanoviště (Quinlan et al., 2015).

3.6.2 Produkční využití

Získávání sladkovodních perel bylo široce rozšířeno v Evropě až do konce 19. století. V současnosti je lov perlorodek k získání perel považován za porušení zákona o ochraně přírody a krajiny č. 114/1992 Sb. (www.zachranneprogramy.cz).

Itálie je jedním z největších producentů kde chovají slávky jedlé (*Mytilis edulis*) a další mořské druhy, zatímco sladkovodní mlži nejsou běžně využíváni k aktivnímu hospodaření. Nicméně sladkovodní mlži se používají k jídlu v některých asijských zemích. V některých státech Indie se sladkovodní mlži používají jako potrava a krmení pro zvířata. Také by mohli částečně nahrazovat rybí moučku. Mlži se často používají jako bioindikační druhy pro jejich schopnost akumulace těžkých kovů. Mořský mlž slávka zelenousta (*Perna canaliculus*), přesněji její extrakt je používán v přírodní medicíně. Tyto účinky se zkoumají i u dalších druhů. Dalším využitím je produkce perel, některé přírodní perly byly nalezeny i u škeblice asijské. Nicméně hodnota sladkovodních perel je nízká (Sicuro et al., 2010). Nejvýznamnější velmocí pro produkci sladkovodních perel je především Čína. Pro celkový přehled informací o produkci perel se odkazují na práci Sommerová (2015), která se touto problematikou zabývá.

3.7 Metody reprodukce a chovu

Antropogenní a abiotické faktory způsobující dlouhodobou degradaci vodního prostředí, jsou považovány za hlavní příčinu neúspěchu zvyšování počtu mlžů Unionoida včetně perlorodky říční. Jedním z mnoha opatření, které lze uskutečnit v přírodě, je seskupování zbývajících malých skupin mlžů do oblastí, kde je dostatečně vysoká hustota vhodných hostitelských ryb, jako je například pstruh. Další možností, je vypuštění mladých ryb (do jednoho roku) v oblastech kde se mlži vyskytují v hojném počtu, protože mladé ryby nemají tendenci se pohybovat daleko během prvního roku. Toto opatření může zvýšit úspěšnost larvální infekce (Arvidsson et al., 2012). Opatření týkající se hostitelských ryb ale fungují pouze v případě funkčnosti biotopu.

Zkoumání reprodukčních schopností mlžů v přirozeném prostředí umožňuje větší informovanost a vytvoření vhodných podmínek pro samotný odchov v umělém prostředí. Aby byl odchov mlžů v umělých podmínkách efektivní, mělo by být dodrženo vhodné prostředí i pro hostitelské ryby. Chov v zajetí by mohl napomoci chránit kriticky ohrožené populace, ale současné metody odchovu je třeba optimalizovat. Oblasti s konkrétními potřebami výzkumu se týkají sběru a skladování životaschopných glochidií, vývoj efektivních systémů odchovu a přípravy potravy. Stejně tak nejde podceňovat stupeň vhodnosti hostitele, který do značné míry určuje úspěch reintrodukčních programů (Thomas et al., 2010).

Jak již bylo popsáno v kapitole reprodukce, glochidie se po přichycení obalí buňkami hostitele k vytvoření cysty. Nejlepší způsob dosažení zapouzdření glochidií, je chov oplozených samic společně s rybami v nádržích v líhni. Obvykle se používají ryby 0+, jinak mohou být rezistentní. Jako další alternativa metod je odlití nádrže s oplozenými perlorodkami do líhně, kde se chovají mladé lososovité ryby. Tímto způsobem může být infikována ryba větším počtem glochidii. K uvolnění glochidie se samice nejprve dají do chlazené dechlorované vody. K uvolnění glochidií, obvykle dochází v rámci 1 hodiny, když teplota vody stoupá na pokojovou teplotu. Umělé vyvolání je způsobeno tepelným šokem a dýchacím stresem. Životaschopnost glochidií je poté zkoumána jako schopnost zavírání schránky (NaCl). Obvykle se používají glochidia, která byla vypuzena ve stejný den. Použití uměle získaných glochidií představuje lepší kontrolu nad expozičních koncentrací, ale není známo jak, tato metoda ovlivňuje životaschopnost glochidií ve srovnání s přirozeným uvolněním. Juvenilové se dávají do nádrží, kde rostou do určité velikosti, aby poté mohli přežít ve volné přírodě. Režimy krmení hostitelských ryb se snižují, aby byl snadnější sběr v post-parazitární fázi. Alternativou k produkci juvenilů z infikovaných ryb nesoucí glochidie,

je odchov juvenilních mlžů in-vitro, ale je to dlouhodobý program, který vyžaduje odpovídající zařízení a personál (Thomas et al., 2010).

3.7.1 Kompaktní systém odchovu juvenilních jedinců

Od roku 2005 je používán kompaktní recirkulační systém pro odchov juvenilních jedinců v laboratorních podmínkách vytvoření na Missouri State University (USA), dle Banhart (2005).

Dva vnořené kbelíky rozdělují 18 litrů vody na horní a dolní oddělení. Voda se pohybuje od dolní do horní komory přes malé ponorné čerpadlo a vrací se do dolní, sítem uzavřené komory, ve které jsou juvenilové. Každý kbelíkový systém obsahuje 7 komor, z nichž v každé může být až 2000 jedinců. Nově přeměnění juvenilové z 8 druhů byli drženi v těchto systémech po dobu 9-12 týdnů a neustále se krmili monokulturou *Neochloris oleoabundans*. Průměrná rychlost růstu se pohybovala okolo 4,2 – 12,5 $\mu\text{m}/\text{den}$ při teplotě 22 °C. Přežití jedinců bylo obecně vyšší než u dříve používaných recirkulačních systémů, tempo růstu se nezměnilo. Tento odchovný systém může být obzvláště důležitý pro studium kvality vody a krmných režimů a neméně pro krátkodobé kultury při testování toxicity. Malá velikost juvenilních mlžů představuje obtížnou manipulaci v tekoucí vodě. Z mnoha studií vyplívá, že vytvoření substrátu, ve kterém se mohou ukrýt, zlepšuje růst a přežití. Předpokládá se, že naplavenina (bahno) slouží jak potrava, stejně jako substrát. Přítomnost sedimentu komplikuje údržbu, pozorování, manipulaci a může potencionálně přispět k růstu škodlivých organismů v kultivačním systému. Udržování dostatečného proudění v systému je důležité, protože juvenilové jsou dostatečně malí na to, aby se usadili v rozšiřující se mezní vrstvě, kde je jiná koncentrace kyslíku, amoniaku a potravy, proto je třeba udržovat rovnoměrný tok a dobrou kvalitu vody.

3.7.2 In vitro

Metoda in vitro je nová alternativa na způsob rybí infekce. Není tedy nutné používat hostitelské ryby, glochidie se chovají v miskách, viz níže. Tato metoda je levnější. Musí být splněny nutriční hodnoty každého media bez mikrobiální kontaminace. V průměru 99,99 % se glochidie nepřichytí na rybího hostitele. Obecně platí, že se kultivační metody snaží napodobovat přírodní podmínky, aby se juvenilové mohli dostat zpátky do řek, potoků a jezer (Lima et al., 2012). Pro přesný popis této metody uvádím odchov škeble rybníčné.

Nejprve jsou oplodněné samice škeble rybníčné shromážděny a aklimatizovány ve 150 litrové nádrži s provzdušňováním a bahnitým substrátem, který byl odebrán spolu se škeblami. Fotoperioda probíhá 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Dechlorovaná voda se udržuje při pokojové teplotě a pH 7,5-8. Krmení je zajištěno mikrořasami, aby bylo napodobeno přirozené prostředí. Oplodněné samice pro glochidiální extrakci se vybírají na základně aktivního otevírání schránek a vypuzování vody (Lima et al., 2006).

3.7.2.1 Příprava glochidií

Doporučuje se dát oplozené mlže do umělého prostředí nejpozději do 5 hodin, poté se rapidně zvyšuje mortalita. Z oplozených samic byly odstraněny nečistoty a řasy. Kleště jsou použity k nepatrnému otevření schránky, aby bylo možné pozorovat barvu marsupia, která indikuje fázi embryonálního vývoje. Glochidia byla sledována a vybírána ke kultivaci v umělém prostředí dle pravidelných uzavírání lasturek. Poté se glochidia proplachovala kvůli nečistotám (Lima et al., 2006).

3.7.2.2 Kultivace

Glochidia jsou kultivována v miskách, každá obsahuje umělé prostředí s 3,5 ml rybí plazmy. V každé misce je kultivováno 50-100 glochidií. Medium se obměňuje po 5 dnech, zvýší se tím procento přežití. Při manipulaci se musí co nejvíce zabránit mechanickému poškození. Kultivaci probíhá při teplotě $23 \pm 2^\circ\text{C}$ s okamžitou úspěšnou metamorfózou. Umělé medium obsahuje směs M199, běžnou kapří plazmu, antibiotika a antimykotika (0,5 ml). Všechny misky byly umístěny do inkubátoru se konstantními hodnotami 5 % CO_2 + 95 % pokojového vzduchu při 50 % vlhkosti. Kapr je vybrán kvůli svému velkému rozšíření. Po 15 dnech kontrolovaného krmení fytoplanktonem, došlo k prodloužení schránek s několika růstovými liniemi. Ultrastruktura brzkého vývojového stupně byla pozorována snímacím elektronovým mikroskopem až do juvenilního stádia. Glochidia mají zahnutou schránku se dvěma stejnými trojúhelníkovitými lasturami vytvořených z vápenaté vrstvy s četnými póry a kryté tenkou kutikulou z chitinu a keratinu. Kompletní vzhled nohy po 11 dnech in vitro kultur je považován za finální proměnu k juvenilnímu stádiu (Lima et al., 2006)

3.7.2.3 Juvenilové

Obvykle přeměna trvá 11 dní. Poté jsou opláchnuty a přendány do kádinky s 200-300 ml s nechlorovanou a okysličenou vodou. Krmí se třemi typy fytoplanktonu (*Chlamydomonas*

sp., *Monoraphidium sp.*, *Chlorella sp.*) Voda se mění denně a je nahrazována polovinou ze stejného zásobního roztoku. Krmení 15 dní (Lima et al., 2006).

3.7.2.3.1 Genetické a ekologické důsledky při reintrodukcí mlžů z laboratoří

Obecně platí, že pokud jde o genetické účinky reintrodukce, malé zakládající populace mohou vést ke snížení heterozygotnosti (snížené genetické variabilitě) v populaci a dále větší náchylnosti k vyhynutí. Programy chovu v zajetí mohou měnit genetické složení druhů vlivem úmyslného či neumyslného umělého výběru. Umělý chov, také může ovlivnit interakce jednotlivců stejného druhu nebo predátory změnou chování. Genetické problémy reintrodukovaných populací mají potencionální efekt na volně žijící populace, zejména redukce variability mezi populacemi stejných druhů a adaptace. Je zde také možnost, že nemoci, paraziti nebo exotické druhy se mohou rozšířit, když se populace přemístily nebo zvětšily (Hoftyzer et al., 2008).

3.7.3 Polopřirozený odchov

Velkou výhodou této metody je zachování z větší části přirozených vlivů, kde se mění skladba potravy v průběhu sezóny a teplotní cykly. Tento odchov se používá pro zachování genofondu perlorodky říční a také pro zlepšení věkové skladby a je používán pouze v chráněném území. Pro úspěšný odchov je důležitá revitalizace lokalit. Metodika má několik postupů, nejdříve se vyloví ryby, které se dají do nádrže s vodou s glochidii, poté se vrátí zpět do toku. Následující rok proběhne opět odlov ryb a rozdělí se na dvě skupiny. Infikované ryby z předešlého roku se drží v zařízení, než dojde k uvolnění juvenilních jedinců. Druhá skupina ryb je v zařízení než dojde ke zrání glochidií, aby mohly být invadovány a vráceny zpět do toku. Tento postup je používán při odchovu původní populace. Juvenilové se poté chovají ve šterkových klíčkách v upravených tocích, kde mají optimální podmínky. Chovají se zde, až přesáhnou velikost zrn písku. V případě odlišných populací perlorodek se mohou použít uměle odchované ryby. Po infekci jsou drženy v klecích v průtočné vodě přibližně měsíc. Poté jsou ryby vyloveny a postupně se zvyšuje teplota v akváriích, až dojde k metamorfóze glochidií. Tyto juvenilní jedinci se chovají 2-3 měsíce v nádržkách s řízeným krmením a výměnou vody. Po dosažení určité velikosti se přemístí do klíček. Po dosažení velikosti > 2 mm se perlorodky přemísťují do klíček s většími oky. Tyto klíčky jsou zavěšeny na kamenech ve volném proudu, tak si mohou perlorodky zvolit potravní zdroj. (Hruška, 1999).

3.8 Materiál a metody

Úspěšnost odchovů perlorodky říční a s tím spojené hodnocení podmínek prostředí je závislé na testování úživnosti krmného detritu. Z toho důvodu je do bakalářské práce zahrnut vlastní experiment, který se zabývá hodnocením úživnosti detritu z jedné lokality získaného různým způsobem.

3.8.1.1 Bioindikace detritu

Pro analýzu zhodnocení detritu byla vybrána lokalita meandr-Teplá Vltava nad Volarským potokem. Na bioindikaci jednotlivých typů vzorků, bylo použito vždy 6 perlorodek říčních. Celkový popis lokality je uveden v tabulce č. 1.

Odebrány byly 3 typy vzorků:

- deponovaný detrit v akumulacích na dně toku (DEPOZICE)
- detrit nasátý sondami v hyporeálu (HYPOREAL)
- plavený detrit nachytaný lapači DDP z proudu za jeden den (PLAVENÝ)

Kromě plaveného detritu byly vzorky filtrovány přes 100 μm síto na místě. Po přivezení do laboratoře byly vzorky drženy v chladu (4°C) a dekantací postupně převedeny do jedné uchovávací dózy.

Před nasazováním pokusu byly vzorky promíchány a byl odebrán plnými epruvetami za stálého míchání reprezentativní vzorek detritu. Ten byl filtrován beztlakově přes 40 μm .

Do každého typu nádob bylo pak napipetováno nebo odměřeno v odměrném válci příslušné množství detritu.

S ohledem na různou koncentrovanost vzorků, bylo při mikrometodě kontrolováno, zda detrit vytvoří v rohu nakloněné epruvety vrstvu alespoň 3 mm (kde se může perlorodka zahrabat), pokud bylo málo, bylo dopipetováno 0,5 ml (nejčastěji u plaveného detritu). Bioindikační nádoby byly doplněny vodou ze Spáleneckého potoka (povodí Blanice) na objem 10 ml u epruvety. Kultivace byla prováděna v teplotě 18 °C v termostatu s cirkulací vzduchu při přirozené fotoperiodě bez vlivu přímého slunečního svitu.

Výměna detritu a měření probíhala po 10 dnech.

Po uplynutí periody byla perlorodka přes sítko 300 μm odseparována od detritu, vyfocena 2x stejným způsobem jako na počátku expozice, a vrácena do nového detritu. Pokusná nádoba

byla pouze lehce vypláchnuta stříčkou (aby byl odstraněn krmný detrit), ale zůstal zachován postupně se rozvíjející biofilm.



Práce byly provedeny stejně jako při zakládání pokusu v chladné místnosti s teplotou do 20 °C. Po celou dobu pokusu byla v ochranné nádobě na epruvety měřena teplota záznamovým teploměrem HOBO Pendant.

Tab.1 Popis lokality v místech odběru vzorku pro experiment hodnocení úživnosti detritu. Rozdíly v přírůstech jedinců byly vyhodnoceny po skončení experimentu pomocí Pairwise-Wilcoxon testu ve statistickém softwaru (R Development Core Team 2013).

	PLAVENÝ	DEPOZICE	INTERSTICIÁL
rychlost proudu (1,2,3)	2	2	1
turbulence ve vodě (+,-)	+	-	-
substrát	-	jemný a hrubý písek, štěrk, valouny	jemný a hrubý písek, štěrk, valouny
množství detritu	3	3	-
barva detritu v terénu	hnědá	tmavohnědá	hnědá

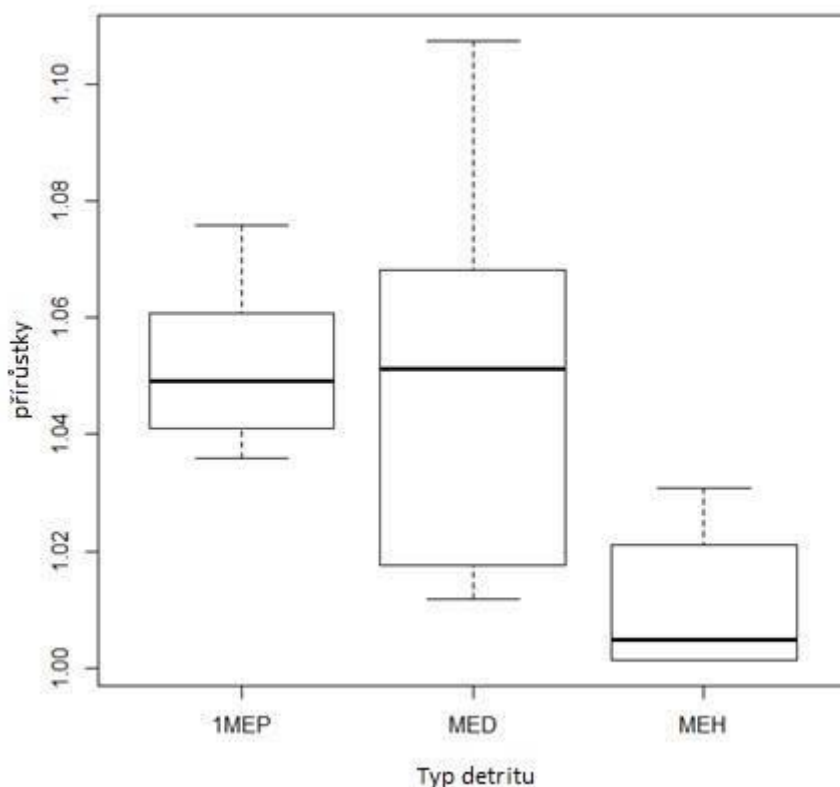
3.8.1.2 Výsledky

Tab.č. 2 Ukazuje naměřenou počáteční velikost perlorodek, která je v pixelech a dále hodnoty naměřené po 10 dnech. Dále je zde uveden přepočten na mikrometry a celkový přírůstek. Pro vyhodnocení fotek byla průběžně fotografována i referenční síťovina (Uhelon), která ve výsledném měření ukazuje, zda nedošlo během focení k nesrovnalostem ve zvětšení.

datum	18.7	μm	29.7	μm	přírůstek
uhelon	1236	–	1236	–	–
ME-D1	1335,145	831,7650891	1403,354	874,2578	1,051087
ME-D2	1382,548	861,2960842	1531,176	953,888	1,107503
ME-D3	1289,738	803,4775567	1377,663	858,2528	1,068173
ME-D4	1064,911	663,4154289	1083,744	675,148	1,017685
ME-D5	1188,924	740,6727185	1250,032	778,7416	1,051398
ME-D6	1492,343	929,695882	1509,861	940,6092	1,011739
uhelon	1236	–	1236	–	–
datum	17.7	–	–	–	–
uhelon	1236	–	1236	–	–
ME-P1	1196	745,0809061	1245	775,6068	1,04097
ME-P2	1476,217	919,6497492	1565,738	975,4193	1,060642
ME-P3	1172,826	730,6440291	1230,366	766,4901	1,049061
ME-P4		–		–	#####
ME-P5	1529,497	952,8419822	1584,55	987,1388	1,035994
ME-P6	1352,93	842,8447411	1455,527	906,7603	1,075833
uhelon	↕1236	–	↕1236	–	–
ME-H1	1182,061	736,3972249	1218,562	759,1365	1,030879
ME-H2	1363,149	849,2109466	1364,97	850,3454	1,001336
ME-H3	1331,105	829,2482605	1359	846,6262	1,020956
ME-H4	1062,61	661,9819579	1071,298	667,3944	1,008176
ME-H5	1220,421	760,2946359	1222,468	761,5699	1,001677
ME-H6	1497,478	932,8948706	1499,4	934,0922	1,001283
Uhelon	1236	–	1236	–	–

Graf 1. Velikost přírůstku juvenilních jedinců krmných detritem z různého zdroje

Graf znázorňuje porovnání mezi jednotlivými detrity. (MEP-plavený, MED-depozit, MEH-hyporeál, relativní přírůstek- podíl na počáteční velikosti po 10 dnech v růstovém experimentu).



3.8.1.3 Závěr experimentu

Cílem bylo porovnat velikost růstu perlorodek u jednotlivých vzorků detritu.

Signifikantně se liší velikost přírůstku mezi skupinami ME-P a ME-H ($p < 0,05$, Pairwise-Wilcoxon test).

Experiment potvrdil, že v rámci jedné lokality lze získat krmný detritus různé kvality v závislosti na odběrné metodě. Nejnižší rychlost růstu juvenilních jedinců ve skupině s detritem z hyporeálu lze vysvětlit větším podílem anorganické složky. Porovnání typů detritů je předmětem především pro laboratorní odchov, kde je řízené krmení.

Analýza složení detritů bude předmětem dalšího výzkumu.

4 Závěr

Celková problematika sladkovodních mlžů je stále zkoumána, zejména odchovy juvenilních jedinců, vhodnost hostitelských ryb či dostupnost potravních zdrojů pro mlže. Tato práce má napomoci při celkovém zhodnocení faktorů, které by neměly být opomenuty při těchto odchovech a následném vypuštění do přirozeného prostředí, které je třeba většinou vhodně upravit. Metody odchovu juvenilních jedinců se stále zdokonalují, díky mezinárodní spolupráci mezi malakology.

5 Seznam literatury

- Arvidsson, B. L., Karlsson, J., Osterling, M. E. 2012. Recruitment of the threatened mussel *Margaritifera margaritifera* in relation to mussel population size, mussel density and host density. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 22. 526-532.
- Augsburger, T., Keller, A. E., Black, M. C., Cope, W. G., Dwer. F. J. 2003. Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22. 2569-2575.
- Baker, S. M., Levinton, J. S. 2003. Selective feeding by three native North American freshwater mussels implies food competition with zebra mussels. *Hydrobiologia*. 505. 97-105.
- Barnhart, M. C. 2005. Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels. *Aquaculture*. 254. 227–233.
- Bauer, G. 1987. Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology*. 56. 691-704.
- Bauer, G. 1992. Variation in the life-span and size of the fresh-water pearl mussel. *Journal of Animal Ecology*. 2. 425-436.
- Bauer, G. 1994. The adaptive value of offspring size among freshwater mussels (Bivalvia, Unionoidea). *Journal of Animal Ecology*. 63. 933-944.
- Beran, L. 1998. Vodní měkkýši ČR. Metodika Českého svazu ochránců přírody č. 17. Vlašim. 113 s. ISBN: 80-902469-4X.
- Beran, L. 2011. Příspěvek k poznání vodních měkkýšů CHKO Křivoklátsko. *Bohemia centralis*, Praha. 31. 219-235.
- Bogan, E. A. 1993. Freshwater Bivalve Extinctions (Mollusca: Unionoidea): A Search for Causes. *Integrative and Comparative Biology*. 33. 599-609.

- Boháč, J. 1999. Organismy jako bioindikátory měnícího se prostředí. *Životné prostredie*. 33. 126-129.
- Douda, K., Beran, L. 2009. Ochrana velevruba tupého-současný stav, problémy a aktuality. *Ochrana přírody*. 2. 16-19.
- Douda, K., Horký, P., Bily, M. 2012. Host limitation of the thick-shelled river mussel: identifying the threats to declining affliat especies. *Animal Conservation*. 15. 536-544.
- Douda, K., Lima, M. L., Hinzmann, M., Machado, J., Varandas, S., Teixeira, A., Sousa, R. 2013. Biotic homogenization as threat to native affiliate species: fish introductions dilute freshwater mussel`s to host resources. *Diversity and Distributions*. 19. 933-942.
- Douda, K., Sell, J., Kubíková-Peláková, L., Horký, P., Kaczmarczyk, A., Mioduchowska, M. 2014. Host compatibility as critical factor in management unit recognition: population-level differences i mussel-fish relationships. *Journal of Applied Ecology*. 51. 1085-1095.
- Fernandez, C., Miguel, E. S., Fernandez-Briera, A. 2009. Superoxide dismutase and catalase: tissue activities and relation with age in the long-lived. *Biological Research*. 42. 57-68.
- Galbraith, H. S., Blakeslee, C. J., Lellis, W. A. 2012. Recent thermal history influences thermal tolerance in freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Freshwater Science* 31. 83-92.
- Galbraith, H. S., Vaughn, C. C. 2009. Temperature and food interact to influence gamete development in freshwater mussels. *Hydrobiologia*. 636. 35-47.
- Geist, J. 2010. Strategies fot the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia*. 644. 69-88.
- Grizzle, J. M., Brunner, C. J. 2009. Infectious Diseases of Freshwater Mussels and Other Freshwater Bivalve Mollusks. *Reviews in Fisheries Science*. 17. 425-467.

- Gum, B., Lange, M., Geist, J. 2011. A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 21. 743–751.
- Hansten, C., Heino, M., Pynnönen, K. 1996. Viability of glochidia of *Anodonta anatina* (Unionidae) exposed to selected metals and chelating agents. *Aquatic Toxicology*. 34. 1-12.
- Hastie, L. C., Young, M. R., Boon, P. J. 2000. Growth characteristics of freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (L.). *Freshwater Biology*. 43. 243-256.
- Hoftyzer, E., Ackerman, J. D., Morris, T. J., Mackie, G. L. 2008. Genetic and environmental implications of reintroducing laboratory-raised unionid mussels to the wild. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 65. 1217–1229.
- Horky, P., Douda, K., Maciak, M., Závorka, L., Slavík, O. 2014. Parasite-induced alterations of host behaviour in a riverine fish: the effects of glochidia on host dispersal. *Freshwater Biology*. 59. 1452-1461.
- Horsák, M., Juříčková, L., Beran, L., Čejka, T., Dvořák, L. 2010. Komentovaný seznam měkkýšů zjištěných ve volné přírodě České a Slovenské republiky. *Malacologia Bohemoslovaca*. 1. 1-37.
- Hruška, J. 1992. The freshwater pearl mussel in South Bohemia: evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population. *Hydrobiologia*. 126. 181-191.
- Hruška, J. 1999. Nahrungsansprüche der Flußperlmuschel und deren halbnatürliche Aufzucht in der Tschechischen Republik. *Heldia- International Congress on Palaearctic Mollusca Band 4. Sonderheft 6. München*. 69-79.
- Jones, J. W., Mair, R. A., Neves, R. J. 2005. Factors Affecting Survival and Growth of Juvenile Freshwater Mussels Cultured in Recirculating Aquaculture Systems. *North American Journal of Aquaculture*. 67. 210-220.

- Kostow, K. E. 2004. Difference in juvenil phenotypes an survival between hatchery stocks and a natural population provide evidence for modified selection due to captive breeding. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 61(4). 577-589.
- Lima, P., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Machado, J. 2006. In vitro culture of glochidia from the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Invertebrate Biologi*. 125(1). 34-44.
- Lima, P., Lima, M. L., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Owen, C., Machado, J. 2012. A review on the "in vitro" culture of freshwater mussels (Unionoida). *Hydrobiologia*. 691. 21-33.
- Ložek, V. 1956. Klíč československých měkkýšů. *Slovenská akadémie vied*. Bratislava. p. 437.
- Matasová, K., Simon, O. P., Dort, B., Douda, K., Bílý, M. 2013. Recent distribution of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) at historical localities in the upper part the Vltava River basin (Czech Republic). *Silva Gabreta*. 19(3). 139-148.
- McIvor, A. L. 2004. Freshwater mussels as biofilters. Dissertation submitted to the University of Cambridge for the degree of Doctor of Philosophy. Cambridge.
- Muller, T., Czarnoleski, M., Labecka, A. M., Cichy, A., Zajac, K., Dragosz-Kluska, D. 2015. Factors affecting trematode infection rates in freshwater mussels. *Hydrobiologia*. 742. 59-70.
- Pandolfo, T. J., Cope, W. G., Arellano, C. 2009. Heart rate as a sublethal indicator of thermal stress in juvenile freshwater mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology A-molecular & Integravite Physiology*. 154. 347-352.
- Pekkarien, M., Valovirta, I. 1996. Anatomy of the glochidia of the freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera* (L). *Archiv fur Hydrobiologie*. 137. 411-423.

- Preston, S. J., Harrison, A., Lundy, M., Roberts, D., Beddoe, N., Rogowski, D. 2010. Square pegs in round holes- the implications of shell shape variation on the translocation of adult *Margaritifera margaritifera* (L.). *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 20. 568-573.
- Preston, S. J., Keys, A., Roberts, D. 2007. Culturing freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*: a breakthrough in the conservation of an endangered species. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 17. 539–549.
- Quinlan, E., Gibbins, C., Malcolm, I., Batalla, R., Vericat, D., Hasite, L. 2015. A review of the physical habitat requirements and research priorities needed to underpin conservation of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 25. 107-124.
- R Development Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Development Core Team, Vienna, Austria.
- Reis, J., Collares-Pereira, M. J., Araujo, R. 2014. Host specificity and metamorphosis of the glochidium of the freshwater mussel *Unio tumidiformis* (Bivalvia: Unionidae). *Folia Parasitologica*. 61. 81-89.
- Sicuro, B., Mioletti, S., Abete, C., Amedeo, S., Panini, E., Forneris, G. 2010. Potential utilisation of farmed freshwater mussels (*Anodonta anatina* and *Unio mancus*) in Italy. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 44. 409-414.
- Simon O. P., Vaníčková, I., Bílý, M., Douda, K., Patzenhauerová, H., Hruška, J., Peltánová, A. 2014. The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. *Limnologica*. 50. 11-20.
- Taubert, J. E., El-Nobi, G., Geist, J. 2014. Effects of water temperature on the larval parasitic stage of the thick-shelled river mussel (*Unio crassus*). *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 24. 231-237.

- Taeubert, J. E., Gum, B., Geist, J. 2012. Host-specificity of the endangered thick-shelled river mussel (*Unio crassus*, Philipsson 1788) and implications for conservation. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*. 22. 36-46.
- Taeubert, J. E., Gum, B., Geist, J. 2013. Variable development and exystment of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) at constant temperature. *Limnologica*. 43. 319-322.
- Thomas, G. R., Taylor, J., de Leaniz, C. G. 2014. Does the parasitic freshwater pearl mussel-*M. margaritifera* harm its host? *Hydrobiologia*. 735. 191-201.
- Thomas, G. R., Taylor, J., Garcia de Leaniz, C. 2010. Captive breeding of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Endangered Species Research*. 12. 1-9.
- Valovirta, I. 1998. Conservation methods for populations of *Margaritifera margaritifera* (L.) in Finland. *Journal of Conchology*. 2. 251-256.
- Vaughn, C. C., Hakenkamp, C. C. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*. 46. 1431- 1446.
- Vaughn, C. C., Nichols, S. J., Spooner, D. E. 2008. Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*. 27. 409-423.
- Záchranné programy ohrožených druhů- Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*). Statut ochrany [online]. AOPK ČR. 2007. [cit. 2015-4-3]. Dostupné z <<http://www.zachranneprogramy.cz/index.php?docId=2336&parentId=2267&spec=zivocichove>>.
- Zeirtz, A., Aldridge, D. C. 2011. Sexual, Habitat-Constrained and Parasite-Induced Dimorphism in the Shell of a Freshwater Mussel (*Anodonta anatina*, Unionidae). *Journal of Morphology*. 272. 1365-1375
- Zieritz, A., Hoffman, J. I., Amos, W., Aldridge, D. C. 2010. Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater musel *Unio pictorum* (Mollusca: Unionoida). *Evolutionary Ekology*. 24. 923-938.

6 Přílohy



Obrázek 1. *Margaritifera margaritifera* (foto: Plechingerová Věra)



Obrázek 2. *Margaritifera margaritifera* (foto: Plechingerová Věra)