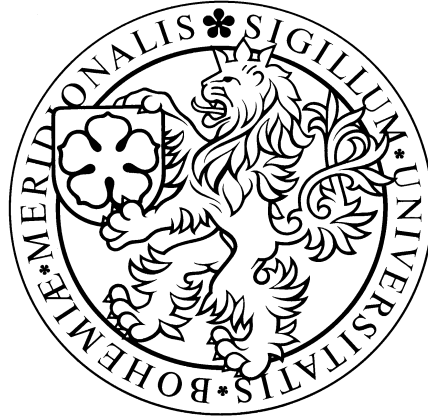


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



Prostorová heterogenita a druhová příslušnost trvalých vajíček rodu *Daphnia* v sedimentu nádrží

Ivana Vaníčková

Magisterská práce
2007

Vedoucí práce: RNDr. Jaromír Sed'a, Csc.
RNDr. Adam Petrušek Ph.D.

ANOTACE

Vaničková, I. (2007): Prostorová heterogenita a druhová příslušnost trvalých vajíček rodu *Daphnia* v sedimentu nádrží [Spatial heterogeneity and species distribution of *Daphnia* resting eggs in sediment of reservoirs], Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 41 p.

SHRNUTÍ

Cílem této studie bylo kvantifikovat množství a druhové složení banky trvalých vajíček komplexu *Daphnia longispina* v sedimentu nádrží. Na pěti vybraných přehradách (Brno, Seč, Vír, Vranov a Žlutice) byly v červenci roku 2004 a 2005 odebrány vzorky sedimentu z oblasti přítoku, hlubšího přítoku a hráze. Bylo potvrzeno, že množství trvalých vajíček je v hrázové oblasti vždy vyšší než v přítokové a druhové složení mezi stanovišti se liší. Data byla porovnána s populací ve vodním sloupci.

SUMMARY

The aim of this study was to analyze the amount and the species composition of *Daphnia gr. longispina* resting egg bank in reservoirs. Studied reservoirs (Brno, Seč, Vír, Vranov a Žlutice) were sampled in July 2004 and 2005 at three sites – tributary, deep tributary and dam area. It was confirmed that there are more resting eggs at dam area than at tributary one and species composition differs for studied sites.

Tato práce byla financována grantem GAČR č. 206/04/0190 a grantem Studentské grantové agentury Biologické fakulty č. 14/2005.

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou universitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

PODĚKOVÁNÍ

Chci poděkovat mým školitelům, že umožnili tento můj exkurs do studia hroznatčích sedélek a věnovali mi tolik času, aby předali ono báječné „nou hau“.

Za sedimentologické seance a porady děkuji Jakobovi Borovcovi a Dr. Hejzlarovi, za báječné vypilování RFLP metodiky Štěpánce Ruthové, za přemlouvání statistiky Simče Polákové.

Další poděkování letí (stovky kilometrů) k rodičům, přátelům a Michalovi, bez kterých by to prostě nešlo.

OBSAH

I. Úvod.....	4
II. Cíle práce.....	5
III. Literární přehled	6
IV. Materiál a metody	11
1. Výběr lokalit	11
2. Odběr vzorků sedimentu.....	11
3. Zpracování vzorků sedimentu	12
A. Analýza charakteru sedimentu, množství efípií, jejich délky a stavu vajíček	12
B. Analýza druhového složení.....	13
4. Zpracování výsledků	14
V. Výsledky	15
1. Charakter sedimentu – zvodnění a ztráta žíháním	15
2. Počet a distribuce efípií v sedimentu nádrže	16
3. Zachovalost vajíček v efípiích	18
4. Úspěšnost amplifikace	20
5. Druhové složení efípií a porovnání s populací ve vodním sloupci	20
6. Velikostní složení efípií	24
VII. Diskuse	29
1. Charakter sedimentu – zvodnění a ztráta žíháním	29
2. Počet a distribuce efípií v sedimentu nádrže	30
3. Zachovalost vajíček v efípiích	31
4. Druhové složení efípií a porovnání s populací ve vodním sloupci	33
5. Velikostní složení efípií	34
VII. Závěry.....	36
VIII. Seznam použité literatury.....	37

I. ÚVOD

Perloočky (Cladocera, Crustacea) jsou nedílnou složkou planktonu sladkovodních ekosystémů. Jsou schopné se za příznivých podmínek rychle namnožit díky asexuální partenogenezi, avšak v případě změny podmínek změni dráhu životního cyklu a začnou produkovat vajíčka, která pro svůj další vývoj vyžadují oplození. Vajíčka jsou uložena do struktury zvané efípium, které vzniká přeměnou části mateřského karapaxu (Zaffagnini 1987). Tento obal chrání vajíčka tak dokonale, že jsou schopna odolávat vyschnutí, pohřbení v sedimentu i na dlouhé období, a v neposlední řadě také průchodu trávicím traktem plaktivorů a jejich predátorů (Mellors 1975). Efípium hrotnatek rodu *Daphnia* obsahuje dvě trvalá vajíčka a celé se uvolní při svlékání matky.

Sezónní produkce efípií významně převyšuje ztráty (způsobené líhnutím, stárnutím, degradací či predací - Mellors 1975), čímž dochází k akumulaci efípií v sedimentu (pro *Daphnia* obvykle 10^4 - 10^6 efípií.m⁻², Brendock & De Meester 2003). Takzvaná „banka vajíček“ je „paměť“ druhového složení populace perlooček ve vodním sloupci, zásobárnou jejich genetické diverzity. Umožňuje přežívání druhů v nehostinných klimatických podmínkách (Edmondson 1995), za vysokého predančního tlaku (Hairston & De Stasio 1988), dlouhodobou koexistenci druhů bez kompetičního vyloučení (Cacéres 1998) a obnovu genetické variability populace (Rossi *et al.* 1998). Pokud je sediment promícháván, např. činností *Tubificidae* a *Chironomidae* (Kearns *et al.* 1996), pak mají i starší efípia šanci být vystavena stimulům pro líhnutí. Dochází tak neustálému kontaktu genotypů různého stáří, což může vést až ke zpomalení evoluce (Hairston & De Stasio 1988).

Pokud je sediment neporušen, postupným ukládáním efípií vzniká unikátní historický záznam vývoje populací perlooček ve vodním sloupci. Následné paleolimnologické studie testují rozdíly potencionálního a realizovaného složení populace vodního sloupce naznačující druhově specifické odlišnosti v produkci efípií a jejich líhivosti (Cacéres 1998), shodou historických záznamů a dat získaných z efípií (Jankowski & Straile 2003), či procesy probíhající v nádrži, jako změny trofie a rybí obsádky (Jeppesen *et al.* 1996, 2002). Studium efípií umožňuje doplnění dat o diverzitě druhového složení populace ve vodním sloupci během celé sezóny (May 1986, Mergeay *et al.* 2005, Vandekerkhove *et al.* 2005).

Recentní studie banky trvalých vajíček rodu *Daphnia* v ČR (resp. SR) byly provedeny na jezerech (Petrušek *et al.* 2003, Faustová *et al.* 2004, Marková *et al.* 2006) a efemerních kalužích (Hotový & Petrušek, in press). Jezerní ekosystémy se však liší od uměle vytvořených rybníků a přehrad, a to především stářím, historickým vývojem a využitím. S tím souvisí řada odlišných abiotických a biotických vlastností, která je nejvíce

patrná na příkladu dlouhých korytovitých nádrží. Jejich morfologie vytváří gradient přítok → hráz v řadě abiotických a biotických vlastností (Seďa & Devetter 2000). Lze očekávat, že všechny tyto faktory významně ovlivňují druhové složení a početnost planktonních perlooček a jimi vyprodukovaných efípií.

Nejpočetnějším taxonem perlooček ve společenstvu českých přehradních nádrží jsou obvykle zástupci druhového komplexu *Daphnia longispina*: *D. cucullata*, *D. galeata* a *D. longispina* (Brandl *et al.* 1989). Tyto druhy jsou blízce příbuzné (Schwenk *et al.* 2000), jejich mezidruhová hybridizace jsou běžně nalézány ve vodním sloupci (Wolf 1987, Spaak 1997, Schwenk *et al.* 2001, Hobæk *et al.* 2004, Seďa *et al.* in press). Vznik hybridů je vázán na sexuální rozmnožování, první generace hybridů tedy pochází pouze z efípií. Líhnivost hybridů bývá nižší než rodičovských druhů (Pfender & Deng 1998), ale i malý počet neonat může založit populaci, která bude významnou složkou společenstva zooplanktonu (Wolf 1987). Bylo prokázáno, že k hybridizaci dochází opakovaně (Hebert & Taylor 1997, Spaak 1997, Schwenk *et al.* 2001), studium efípií je tedy vhodným doplněním analýzy společenstva vodního sloupce nejen z pohledu porovnání zastoupení taxonů, ale také pro detekci vzniku hybridů.

II. CÍLE PRÁCE

Na vybraných korytovitých nádržích porovnat množství efípií ve vzorcích sedimentu z hrázové a přítokové části nádrže.

Vyhodnotit stav zachovalosti trvalých vajíček v efípiích a analýzou DNA určit jejich druhovou příslušnost.

Výsledky druhového složení efípií v sedimentu porovnat s daty o společenstvu *Daphnia gr. longispina* ve vodním sloupci (její studium je náplní samostatného projektu).

II. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Ve společenstvu perlooček vodních nádrží je obvykle nejpočetněji zastoupen druhový komplex *Daphnia longispina* – s druhy *D. cucullata* G. O. Sars, *D. galeata* G. O. Sars a *D. longispina* (O. F. Müller) (Brandl *et al.* 1989). Tyto druhy jsou běžné, s těžištěm výskytu palearktické oblasti (Benzie 2005), schopné přežívat v chladných refugiích ve vyšších nadmořských výškách i v Africe (*D. longispina*, Mergeay *et al.* 2005). V rámci rodu *Daphnia* jsou řazeny do skupiny *Hyalodaphnia* (Benzie 2005), považované za monofyletickou skupinu, která se vydělila zhruba před 100 mil. let (Schwenk *et al.* 2000). Následovalo oddělení dnešního druhového komplexu, v jehož rámci jako první došlo k odlišení *D. longispina* a později *D. cucullata* od *D. galeata* (Schwenk *et al.* 2000). Všechny tři taxony jsou si morfologicky velmi podobné a obývají stejnou niku – pelagiál nádrže (Hebert & Crease 1980). Absence vzájemného kompetičního vyloučení je vysvětlována neustálou variabilitou vlastností vodního prostředí, klonální diversifikací v prostoru niky (Hebert & Crease 1980) či sezónní sukcesí druhů (Cavarlho & Wolf 1989).

Za příznivých podmínek sezóny se perloočky r. *Daphnia* množí partenogeneticky, kdy velikost snůšky může být až v řádu několika desítek (Benzie 2005) a nově vylíhlí jedinci jsou pouze samičky (Zaffagnini 1987). V temperátní zóně období asexuální reprodukce může trvat až několik měsíců, v polárních oblastech nejvýše několik generací (Edmondson 1955). Přesmyk k sexuálnímu rozmnožování je ovlivněn částečně maternálně (Alekseev & Lampert 2001), řídící je především změna environmentálních podmínek. Mezi nejčastěji zmiňované patří zkracující se délka fotoperiody, nižší dostupnost potravy, přehuštní populace a predace planktivory (Ferrari & Hebert 1982, Carvalho & Hughes 1983, Kleiven *et al.* 1992, Hairston & De Stasio 1998, Alekseev & Lampert 2001). Intensita reakce závisí na kombinaci stimulů, na konkrétním druhu a geografickém původu populace (Kleiven *et al.* 1992, Ferrari & Hebert 1982), zmiňuje se i klonální variabilita (Carvalho & Hughes 1983).

V populaci se během krátké doby zvýší podíl samců (Kleiven *et al.* 1992, Rossi *et al.* 1998), samičky vyprodukují dvě haploidní vajíčka, která jsou po oplození uložena do speciální ochranné struktury zvané efípium, formující se z části karapaxu matky. Pokud vajíčka nejsou oplodněna, jsou resorbována ještě mateřským organismem, případně rychle v efípiu degradují (Zaffagnini 1987). Část efípií je tedy už od počátku prázdných, Cáceres (1998) uvádí nejméně 10 %. Ačkoliv je celá populace vystavena podmínkám stimulujících produkci efípií, jen část hrotnatek reaguje (15 % Ferrari & Hebert 1982, 10 % Cáceres 1998, 31 % v experimentu Schwenk *et al.* 2001). Některé klony mohou produkovat efípia výhradně partenogeneticky, jako např. *D. pulex* var. *tenebrosa* v polárních oblastech (Edmondson 1955).

Efípiium se do prostředí uvolní při svlékání matky. Efípiím podrodu *Hyalodaphnia* zůstává mateřská spina, která se však snadno odlomí (Mergeay *et al.* 2005). Většina efípií sedimentuje na dno nádrže (Carvalho & Wolf, 1989), mohou se ale také stát nástrojem disperse do nových habitatů. Možným vektorem je vítr (Maguire 1963), splach (Marková *et al.* 2006) a dále např. živočichové živící se submersní vegetací a efípii přichycenými na ni (Vandekerkhove *et al.* 2005), ryby a ichtyofágní druhy ptáků a savců (Mellors 1975).

Disperse by mohla fungovat také jako mechanismus úniku před dočasně nepříznivými podmínkami, je však pro sladkovodní perloočky nevhodná zejména kvůli nejistotě nalezení vhodného habitatu vzhledem k relativní izolovanost jednotlivých vhodných vodních ekosystémů (De Stasio 1989). Proto se u perlooček vyvinula schopnost diapausy, využívající dormantních vajíček v efípiu a umožňující překonat dočasně zhoršené podmínky přímo na místě. V řádu korýšů se schopnost „úniku v čase“ vyskytuje roztroušeně, v rámci *Branchiopoda* jsou touto adaptací vybaveni všichni zástupci (Fryer 1996). Umožňuje jim obývat i nestálé habitaty s neustálým rizikem příchodu letální situace, následné líhnutí dormantních stádií tedy může být chápáno jako migrace z minulosti (Hairston 1996). Délka dormance je určena trade-off mezi zisky z populačního růstu po vylíhnutí a pravděpodobnosti přežití - proto se v méně stabilních podmínkách líhne menší frakce diapausující populace a ve stabilnějších lze očekávat vyšší procento líhnutí, část jedinců vždy zůstává v dlouhodobé dormanci (De Stasio 1989).

Roční produkce dormantních stádií může dosahovat až hodnot 10^5 vajíček.m⁻² (Hairston *et al.* 1995, De Stasio 1989, Vandekerkhove *et al.* 2005). Produkce je silně variabilní, v každém případě však významně převyšuje zpětné líhnutí (př. *D. galeata mentodae* se líhne 1 % všech vajíček v povrchové vrstvě, Cacéres 1998). Akumulací dormantních stádií vzniká tzv. banka vajíček. Je ovlivňována procesy depozice, líhnutí, degradace mikrobiální a houbové (Carvalho & Wolf 1989), predace (Mellors 1975, Marcus & Schmidt - Gengenbach 1986), stárnutí, míchání sedimentu – průběh a intenzita těchto procesů závisí na lokalitě a hloubce (De Stasio 1989).

Každosezónním přibýváním vajíček do banky vzniká efekt překrývajících se generací (Cacéres 1998). Banka je tedy zásobárnou genetické a ekologické variability (De Stasio 1989), prostřednictvím líhnutí může zpětně ovlivňovat populaci, společenstvo i ekosystém a usnadnit adaptaci na změnu prostředí (Hairston 1996). Interakce mezi variabilitou prostředí a překrývajícími se generacemi (jako následek různé délky diapausy) vede k udržování biodiversity (Hairston 1996), jak druhové, tak genetické (Hebert & Crease 1980, Cacéres 1998). Na druhé straně neustálé promíchávání „nových“ a „starých“ genotypů může vést až ke zpomalení evoluce (Hairston & De Stasio 1998).

Ačkoliv maximální životnost dormantních stadií může dosahovat až stovek let (pro *Daphnia galeata mendotae* 125 let, Cáceres 1998), běžně zůstávají vajíčka životaschopná pouze několik let až dekád (Hairston 1996, De Stasio 1989).

Distribuce efípií v sedimentu vodního tělesa není rovnoměrná. Vyšší počty trvalých vajíček bývají nalézány ve středu než v příbřežních mělkých oblastech (Hairston *et al.* 1995, Cáceres 1998). To je vysvětlováno např. výškou vodního sloupce, sklouzáváním sedimentu po strmém dnu (Cavarlho & Wolf 1989), vlivem návětrné strany (Brendock & De Meester 2003), či transportem prouděním (De Stasio 1989). Množství efípií může také růst s hloubkou vrstvy sedimentu vzhledem ke zhutňování sedimentu a současnému rozkladu organického materiálu (Faustová *et al.* 2004). Často jsou ale nejvyšší abundance efípií v horních několika centimetrech (Marcus & Schmidt–Gengenbach 1986, Cavarlho & Wolf 1989, De Stasio 1989, Kearns *et al.* 1996, Cousyn & De Meester 1998).

Svrchní vrstva efípií, která může být vystavena stimulům iniciujícím líhnutí, se považuje za aktivní část banky vajíček (Cáceres & Hairston 1998). Pobídky pro započetí vývoje vajíčka a následné líhnutí jsou sezónně podmíněné, jako je změna délky fotoperiody, rostoucí teplota, kyslíkové poměry, případně opětovné zatopení vajíček (Schwartz & Hebert 1987, Pfrender & Deng 1998). Vajíčka obvykle reagují s různou intenzitou na kombinace těchto stimulů, nejsilněji na podmínky simulující jaro, kdy líhnutí z efípií je nejvyšší (Cáceres 1998). Přesné podmínky jsou ovlivněné geografickým původem populace (Schwartz & Hebert 1987: australský druh *D. lumholtzii* pro započetí vývoje vyžaduje vyschnutí efípia za relativně vysoké teploty 35 °C, zatímco *D. pulex* z polární oblasti Kanady je schopna líhnutí pouze v 7 °C vodě), dokonce i různé druhy ze stejné geografické oblasti mají stejné optimální podmínky pro líhnutí. Pro některé druhy (*D. pulicaria*) je vyšší míra líhnutí součástí životní strategie a mechanismem udržení na stanovišti (Cáceres 1998).

Ne všechna vajíčka izolovaná ze sedimentu jsou na stimuly k líhnutí stejně citlivá (Schwartz & Hebert 1987). Zdá se, že mělké, prohřáté a lépe prokysličené oblasti nádrží jsou pro líhnutí příznivější (Moritz 1987, De Stasio 1989, Cáceres 1998). V hlubokých částech nádrže je vývoj zpomalen minimálně absencí světla (Pfrender & Deng 1998) a nižší teplotou.

Připravenost k líhnutí se výrazně mění s hloubkou vrstvy uložení efípií. Hairston *et al.* (1995) uvádí, že ačkoliv vajíčka vypadala zachovale, žádné se z vrstev pod 19 cm nevylíhlo. Moritz (1987) dokonce sledoval výrazně sníženou schopnost líhnutí u vajíček uložených již pod 4 cm sedimentu. Nejvíce vajíček se tedy líhne ze svrchních vrstev sedimentu (Cavarlho & Wolf 1989). Cousyn & De Meester (1998) pozorovali, že vajíčka z povrchu sedimentu byla méně citlivá ke stimulům líhnutí, jako by vyžadovala alespoň krátkou dobu diapausy, zatímco Moritz (1987) nejvyšší sensitivitu vajíček sledoval u efípií

z vrstvy 0 - 1,5 cm, u hlubších (1,5 - 4 cm) již líhnutí trvalo déle (3 - 5 dny vs. 5 - 10 dní). Disturbance sedimentu mohou efípium vertikálně přemístit do zóny, kde bude jeho líhnutí iniciováno. Promíchávání sedimentu je způsobeno resuspensí během podzimního promíchávání (Porcalová 1991) či bioturbací *Tubificidae* a *Chironomidae* (Marcus & Schmidt-Gengenbach 1986) a může zasahovat do hloubky několika centimetrů (Cacéres 1998).

Při laboratorních testech líhnivosti efípií se dosažená míra úspěchu značně liší (14 % Cavarlho & Wolf 1989, 20 % De Stasio 1989, 10 - 50 % Hairston *et al.* 1995, 50 % Jankowski & Straile 2003, 50 - 52 % Rossi *et al.* 1998, 60 % Carvalho & Hughes 1983, 68 % Cousyn & De Meester 1998, 85 % v horním 1,5 cm Moritz 1987). Vajíčka se v načasování odpovědi na líhnoucí stimuly liší, některá zůstanou v dormanci i po gradaci podmínek a střídání experimentálních podmínek (Cavarlho & Wolf 1989). Obecně platí, že počet vylíhlých efípií roste s délkou inkubace (Schwarz & Hebert 1987), simulující stabilně příznivé podmínky pro život. Přežívání neonat je rozdílné (23 % Schwenk *et al.* 2001, 54 % Rossi *et al.* 1998 a 70 % Cousyn & De Meester 1998).

Je tedy zřejmé, že příspěvek efípií do populace ve vodním sloupci je do jisté míry omezený, Cáceres (1998) uvádí, že se líhne pouhé 1 % banky. U nádrží, které zcela vysychají nebo naopak zamrzají, je obnovení populace zcela závislé na efípiích, kdy jejich roční produkce významně ovlivní abundanci dosaženou následující rok (Edmondson 1955). I v relativně stabilních vodních tělesech má líhnutí svůj význam – každoročně se obnovuje klonální diversita (Rossi *et al.* 1998), líhnutím se do vodního sloupce dostává první generace hybridů.

Hybridní komplexy jsou známé v rámci všech podrodů *Daphnia*, křížení u *Daphnia gr. longispina* je běžným jevem (Hobæk *et al.* 2004). Bylo prokázáno, že hybridi nejsou ve společenstvu udržováni pouze partenogenezí, ale opakovaně vznikají nová hybridní efípia křížením rodičovských linií (Hebert & Taylor 1997, Spaak 1997, Schwenk *et al.* 2001). Samotná koexistence dvou blízce příbuzných druhů nemusí nutně vést k hybridizaci (Hebert 1985, Hobæk *et al.* 2004) a naopak se kříženci mohou vyskytovat jen s jedním z rodičovských druhů (Hebert 1985, Spaak 1997). Genomové analýzy odhalily, že druhy zůstávají geneticky izolované, ačkoliv často hybridizují (Schwenk *et al.* 2001). Schwenk *et al.* (2000) tuto skutečnost vysvětluje opakovanými cykly zalednění, kdy se přechodně oddělené druhy při opětovném kontaktu křížily a tato schopnost jim zůstala dodnes. *Daphnia galeata* hybridizuje s ostatními druhy z komplexu nejčastěji (Taylor *et al.* 2005), křížení rodičovských druhů však není náhodné, Schwenk *et al.* (2001) otestoval, že líhnutí kříženců *D. cucullata* x *D. galeata* je úspěšnější, pokud matkou byla *D. cucullata* (24 % vs. 2 %). Ačkoliv některé populace hybridů dosahují líhnivosti z efípií stejně jako rodičovské druhy (50 % Hebert 1985), častěji je schopnost započítí vývoje nižší (16 %

Pfrender & Deng 1998, 14 % Schwenk *et al.* 2001), úmrtnost prvního instaru je vysoká (77 % Schwenk *et al.* 2001). Přesto mohou být hybridy ve vodním sloupci poměrně početní, případně sezónně v populaci dominovat (Wolf 1987).

Úspěšnost uplatnění hybridních jedinců v populaci je možné díky intermediální kombinaci vlastností rodičů (Ferrari & Hebert 1982, Hebert 1985, Wolf 1987, Spaak & Hoekstra 1995, Schwenk *et al.* 2001) a je znásobena partenogenetickým způsobem rozmnožování, který limituje vliv inkompatibility genomu při sexuální reprodukci (Hebert 1985). Zmíněná inkompatibilita pohlavní rozmnožování nevyklučuje, hybridy druhé generace a zpětní kříženci jsou v nízkých frekvencích nalézáni (Wolf 1987, Hebert & Taylor 1997, Spaak 1997, Hobæk *et al.* 2004).

Možností, jak studovat hybridizaci rodu *Daphnia* je několik. U efípií se běžně se používá líhnutí a následná analýza dospělců. Hlavní nevýhodou této metody je nutná předchozí optimalizace líhnuoucích podmínek pro danou populaci, vysoká mortalita vajíček a neonat i doba trvání experimentu – tj. čekání na líhnutí (Rossi *et al.* 1998). Dospělce není možné spolehlivě určovat na základě morfologie. Nejčastěji se používá elektroforetické analýzy alozymů (Wolf & Mort 1986). Tato metoda umožňuje zpracovat velké množství vzorků, odhalí také hybridizaci vyšších stupňů a klonální variabilitu (Hebert & Taylor 1997, Sedá *et al.* in press). Pro alozymy je nutno použít čerstvé nebo zmrazené vzorky a dostatečné množství materiálu pro analýzu – přímo pro vajíčka či neonaty se tedy nehodí.

Naopak velice vhodné pro studium vajíček jsou molekulární metody založené na analýze DNA, obvykle mohou použít i etanolem konzervované vzorky a požadavky na objem izolátu jsou nižší (Hebert & Taylor 1997). Pro blízkce příbuzné druhy jako je komplex *Daphnia longispina* je nutné najít takovou oblast genomu, která bude dostatečně variabilní, aby již mohla být druhově specifická a současně přiměřeně konservativní, aby ji bylo možno amplifikovat. Analýza mikrosatelitů (Brede *et al.* 2006) není vzhledem k nákladům možná pro velké počty vzorků. Pro značný objem vzorků je vhodnější metoda ITS - RFLP (Billiones *et al.* 2004), která používá úsek na jaderné ribozomální DNA (rDNA) kódující podjednotku 5.8S a ITS (internal transcribed spacers) (Hebert & Taylor 1997, Schwenk *et al.* 2000). Na úseku ITS často dochází k bodovým insercím a delecím (Taylor *et al.* 2005) a proto byla nutná její revize a úprava postupu (Skage *et al.* in press). Částečnou nevýhodou ITS - RFLP je neschopnost detekce hybridů vyšších řádů, tj. F2 a B (Hebert & Taylor 1997).

IV. MATERIÁL A METODY

1. Výběr lokalit

Pro účel studie byly vybrány nádrže Brno, Seč, Vír, Vranov a Žlutice, jejichž základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1. Tyto nádrže splňují následující podmínky: (i) dominujícím taxonem perlooček je druhový komplex *D. longispina*, (ii) dostatečná délka nádrže (4 - 20 km), umožňující vyvinutí podélného ekologického gradientu - s ohledem na samostatné studium populace perlooček ve vodním sloupci byly vybrány nádrže s hloubkou u hráze alespoň 20 m a (iii) pokud je nádrž v kaskádě, je buď na prvním místě, nebo dostatečně daleko od předcházející, aby nedocházelo ke splachu perlooček a efípií.

přehrada	řeka	rok vzniku	plocha (ha)	hloubka (m)				délka (km)	vzdálenost stanovišť (km)	
				max	h	hp	p		h - p	hp - p
Brno	Svratka	1940	259	19	17,0	5,0	3,5	5,0	5,0	0,6
Seč	Chrudimka	1934	190	29	25,5	7,0	2,4	4,0	4,0	1,4
Vír	Svratka	1959	212	58	50,0	13,0	3,0	8,0	5,6	1,4
Vranov	Dyje	1939	760	46	40,5	5,3	4,5	18,0	18,7	1,0
Žlutice	Střela	1968	150	20	19,0	5,5	2,7	3,8	3,5	0,7

Tab. 1: Základní charakteristiky studovaných lokalit a odběrových míst. H = hráz, HP = hluboký přítok, P = přítok.

2. Odběr vzorků sedimentu

Vzorky sedimentu byly odebrány v červenci 2004 a 2005 pomocí gravitačního kóru s vnitřním průměrem trubice 5 cm (všechny nádrže 2004, Žlutice 2005), případně 6.2 cm (ostatní přehrady 2005). Vzorkován byl tedy povrch odpovídající 19.64 cm², případně 30.19 cm². Na každé přehradě byly obvykle odebrány dva kóry ze tří stanovišť - v roce 2004 u hráze a v přítokové oblasti (dále jako - H, P), a v místě, kde bylo možné předpokládat stálé zatopení (dále jako hluboký přítok - HP). Odběr HP na vybraných přehradách byl proveden v roce 2005, protože podle předběžné výsledky ukázaly, že počet efípií ve vzorcích z přítoku je velmi nízký.

Každý kór byl na břehu rozřezán do tří vrstev v intervalu 2 cm (0 - 2, 2 - 4, a 4 - 6 cm). Vzorky byly skladovány v plastických sáčcích v temnu při 5 °C.

Při odběrech byla změřena vzdálenost mezi stanovišti pomocí GPS (H - P, příp. HP - P), dále hloubka vody (H, P, HP), průhlednost (H, P), teplota (H, P), obsah kyslíku na hladině a u dna (H) sondou WTW (tab. 2). Chybějící údaje pro HP v roce 2005 byly doplněny daty z přítoku nebo středu nádrže.

přehrada	datum odběru	odebrané vzorky	H						P					
			hloubka (m)	Secchi (cm)	hladina		dno		hloubka (m)	Secchi (cm)	hladina		dno	
					T (°C)	O ₂ (mg/l)	T (°C)	O ₂ (mg/l)			T (°C)	O ₂ (mg/l)	T (°C)	O ₂ (mg/l)
Brno	20.7.2004	2xh, 2xp	17,0	180	23	18,8	12,4	0,2	3,5	-	22	-	17	-
Seč	14.7.2004	2xh, 2xp	25,5	380	19	10,0	11,2	0,2	2,4	55	16	-	13	-
Vír	15.7.2004	2xh, 2xp	50,0	-	19	13,2	4,6	8,7	3,0	100	16	-	12	-
Vranov	19.7.2004	2xh, 2xp	40,5	140	24	16,6	7,6	0,1	4,5	40	22	-	17	-
Žlutice	7.7.2004	1xh, 2xp	19,0	-	20	12,1	10,6	0,2	2,7	-	18	-	16	-

přehrada	datum odběru	odebrané vzorky	hloubka (m)	Secchi (cm)	hladina		dno	
					T (°C)	O ₂ (mg/l)	T (°C)	O ₂ (mg/l)
Brno *	26.7.2005	1xhp	5 (3,8)	40	20,1	16,6	15,2	9,1
Seč **	20.7.2005	2xhp	7 (11,0)	180	21,4	11,1	16,2	1,9
Vír *	21.7.2005	2xhp	13 (4,5)	120	18,3	10,0	14,5	9,8
Vranov *	25.7.2005	2xhp	5,3 (3,8)	400	21,4	15,7	20,1	6,7
Žlutice *	12.7.2005	2xhp	5,1 (2,1)	110	21,5	10,1	21,2	9,3
		1xh	18,5	160	22,0	12,6	9,5	0,7

Tab. 2: Schéma odebraných vzorků sedimentu a fyzikálních vlastností vody v době odběru pro rok 2004 (horní tabulka) a 2005 (dolní). Uvedeno je datum odběru, odebrané vzorky, hloubka na stanovišti, průhlednost vody měřená Secchiho deskou, teplota a obsah rozpuštěného kyslíku u hladiny a dna. Chybějící údaje pro HP v roce 2005 byly doplněny daty z nejbližší lokality, přítok* nebo střed** nádrže, v údajích o hloubce je uvedena hloubka hlubokého přítoku, v závorce hloubka náhradní lokality, pro kterou se vztahují následující údaje.

3. Zpracování vzorků sedimentu

A. Analýza charakteru sedimentu, množství efípií, jejich délky a stavu vajíček

V laboratoři byl každý vzorek zvážen a byly odebrány 2 podíly (obvykle 2,5 - 3g) pro stanovení obsahu vody (105 °C do konstantní hmotnosti) a ztráty žiháním (indikující obsah organického uhlíku; 550 °C, 2 hod). Zbylá část vzorku byla zpracována na analýzu efípií. Sediment byl odstátou vodovodní vodou promyt přes sítko (velikost ok 196 μm) a prohlédnut pod preparačním mikroskopem. Všechna efípia rodu *Daphnia* byla spočítána a vyfotografována (zvětšení 25x) pro pozdější změření délky (dorsální šev + spina).

Každé efípium bylo otevřeno preparačními jehlami, byl zaznamenán počet (2, 1, 0 – označeno jako N) a stav vajíček. Rozlišovány byly následující kategorie – zachované (označeno jako Y) a degradované vajíčko (označeno jako A). Tímto značením vzniklo 6 možných kombinací pro kódování stavu vajíček v efípiu - YY, AA, NN, YN, YA, a AN.

Část vajíček v efípiích byla nalezena v různém stupni vývoje – stimul pro vývoj byl považován za artefakt odběru (Pfrender & Deng 1998), a proto embrya byla zařazena do kategorie Y.

B. Analýza druhového složení

Dobře zachovalá vajíčka, případně embrya (kategorie Y) byla použita pro analýzu DNA. Vajíčko bylo rozdrčeno v 25 µl extrakčního pufru proteinázy K (Schwenk *et al.* 1998), inkubováno po nejméně 3 hod při 56 °C. Inkubace vzorku byla ukončena denaturací proteinázy v 92 - 96 °C po dobu 16 min. Vzorky byly skladovány v -18 °C do zpracování (do 2 let).

Vzorky DNA byly zpracovány v laboratoři PŘF UK Praha. Analyzován byl 1500bp úsek ITS (internal transcribed spacer) na jaderné ribozomální DNA (rDNA), který byl naklonován a následně rozstříhán restrikcími enzymy (metoda RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism). Výsledkem po separaci při agarózové elektroforéze jsou druhově specifické kombinace délek úseků DNA, umožňující také detekci hybridů.

Pro analýzu druhové příslušnosti vajíček byly použity pouze izoláty reprezentující jednotlivá efípia. Původně zamýšlené použití metodiky popsané Billiones *et al.* (2004) se ukázalo jako nevhodné. Použití restrikcími enzymů *Mwo* I / *Sau*96 I dávalo v některých případech nepřesné výsledky. Skage *et al.* (in press) poukázali na existenci bodové mutace v restrikcími místě - v některých populacích *D. galeata* se tak vyskytují jedinci, kteří jsou identifikováni jako *D. cucullata*. Křížením těchto jedinců s nositeli „normální“ alely pak vznikají falešní „hybridi“. Skage *et al.* (in press) současně navrhli nový forward primer a restrikcími enzymy, které byly použity pro zpracování izolátů. Metodika ITS - RFLP byla ověřena porovnáním morfologie, alozymových dat a analýzy DNA (mikrosatelity) na jedincích r. *Daphnia* přímo ze studovaných nádrží (Š. Ruthová, PŘF UK Praha) a lze ji tedy považovat za relativně spolehlivou pro dané lokality.

Pro amplifikaci úseku ITS byly použity tyto primery: ITS - F - New 5' - GGT AAC CGC TGA ACC TCC TTC - 3' (Skage *et al.* in press) a ITS - R 5' - CGG TGG TCG ACA CTT CGA CAC GC - 3' (Schwenk *et al.* 2000). Každá PCR reakce o objemu 10 µl obsahovala po 0,3 µM obou primerů a 1x GeneJet Fast PCR Master Mix (Fermentas). Amplifikace probíhala v termocycleru při reakčním cyklu – denaturace 95 °C po 60 s, pak 35 - 38x: 95 °C po 1 s, 52 °C po 5 s, 72 °C po 37 s, závěr cyklu 72 °C 20 s a chlazení na 10 °C do dalšího použití.

Úspěšnost amplifikace byla ověřena separací podílu PCR produktu (obvykle 1,5 µl) při elektroforéze (agarózový gel 1,4 %: 1xTBE pufr, agaróza, 1,5 µl etidium bromid; elektroforéza: 180 V, 25 min při 180 V).

Druhá příslušnost vajíčka byla určena metodou RFLP podle protokolu navrženém v Skage *et al.* (in press). Jedna reakční směs obsahovala 8 μ l PCR produktu, 1 jednotku obou restrikčních enzymů Mbi I a Eco52 I a 1x Eco52 I pufr (vše Fermentas). Inkubace probíhala při 37 °C po nejméně 5 hodin, a poté byly produkty restrikce separovány na 1,4% agarózovém gelu (elektroforéza 85 min). Kontrolou úspěšného rozstřihnutí je vždy 190bp úsek, restrikční vzor pro *D. galeata* je přítomnost fragmentu o délce 1430 - 1450bp, pro *D. cucullata* kombinace fragmentů 775bp a 650 – 660bp, pro *D. longispina* 895 - 930bp a 520 - 540bp, hybridy mají restrikční vzor obou rodičů (Skage *et al.* in press).

4. Zpracování výsledků

Data o početnosti zooplanktonu, druhovém a délkovém složení populace perlooček mi byla poskytnuta školitelem. Vzorky pro tato data byly odebírány současně se vzorky sedimentu. Odebraný materiál byl použit k taxonové analýze druhového komplexu *D. gr. longispina* metodou elektroforézy alozymů (Wolf & Mort 1986, Sedá *et al.* in press) a konfrontaci taxonomické detekce pomocí alozymů a analýzy ITS (Ruthová *et al.* in prep.)

Ke statistickému zhodnocení byl použit program Statistica ver. 6.0, za průkazné byly považovány výsledky na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Byly použity následující testy:

Analýza variance (ANOVA) a následné porovnání *Tukey HSD testem*: data o zvodnění, ztrátě žiháním, počtech efípií (ta byla navíc logaritmicky transformována), velikostní složení efípií, porovnání mezi jednotlivými přehradami, stanovišti a druhy (s výjimkou přítokové oblasti Vranova byla použity pouze délky efípií o známé druhové příslušnosti).

Log - lineární analýza frekvenčních tabulek: zachovalost a druhové složení vajíček v efípiích, porovnání složení populace ve vodním sloupci a druhového složení efípií.

Difference test: úspěšnost amplifikace DNA.

Distribution fitting: porovnání výběru délek určených efípií se všemi nalezenými efípií.

V. VÝSLEDKY

1. Charakter sedimentu – zvodnění a ztráta žiháním

Výsledky analýzy zvodnění sedimentu jsou uvedeny v tabulce 3. Spolehlivost dat o zvodnění vzorků z roku 2004 (P, H) je nižší následkem způsobu jejich hromadného převozu a skladování. Část vody byla ze sáčků „vytřesena“, změřený obsah vody v sedimentu je podhodnocen. Vzorky z roku 2005 (HP, H - Žlutice) byly převáženy jednotlivě ve dvojitých sáčcích a v plastových lahvičkách. Případná ztráta vody byla zachycena již v druhém sáčku, a proto tato data lze považovat za věrohodná. Za předpokladu, že zvodnění hrázového sedimentu je meziročně konstantní, dle porovnání vzorků H – Žlutice 2004 a 2005 byla ztráta vody převozem 2,4 - 5,2 %, ztráty ze vzorků řidších vrstev 0 - 2 cm byly pravděpodobně vyšší než z hlubších vrstev.

nádrž vrstva	Brno			Seč			Vír			Vranov			Žlutice		
	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h
0 - 2 cm	65,0	45,8	81,9	68,8	68,4	76,4	69,5	77,4	86,3	71,4	80,9	83,6	62,0	85,0	90,9
2 - 4 cm	55,8	38,0	77,7	64,7	62,4	84,1	67,4	72,4	84,7	54,2	79,4	81,3	51,2	81,6	89,0
4 - 6 cm	58,3	24,6	79,6	62,0	70,9	80,8	63,2	70,8	79,3	50,0	74,2	81,1	59,9	78,8	89,0

Tab. 3: Relativní zvodnění vzorků sedimentu, uveden je průměr hodnot ze dvou kórů (Brno – HP byl odebrán pouze jeden kór, Vranov – P data z druhého kóru byla ztracena, Žlutice H – uvedena jsou data pro kór odebraný v roce 2005)

Z výsledků je patrné, že obsah vody v sedimentu je značně variabilní. Byly prokázány rozdíly mezi jednotlivými přehradami (ANOVA: $df = 4$; $F = 17,33$; $p < 10^{-6}$) a také mezi stanovišti v rámci přehrady (tab. 4, ANOVA: $df = 2$; $F = 71,86$; $p < 10^{-6}$). Ačkoliv průkazná interakce přehrada x stanoviště (ANOVA: $df = 8$; $F = 12,09$; $p < 10^{-6}$) poukazuje na specifičnost každé z přehrad, lze všeobecně říci, že zvodnění sedimentu je vyšší v hrázové oblasti než v přítokové. Oblast hlubokého přítoku je na některých přehradách podobnější přítoku (Seč, Brno) nebo naopak hrází (Vranov, Žlutice), případně hodnoty zvodnění sedimentu jsou zhruba na střední hodnotě mezi přítokem a hrází (Vír).

	Brno	Seč	Vír	Vranov	Žlutice
P x HP	*			*	*
P x H	*	**	*	*	*
HP x H	*				

Tab. 4: Rozdíl ve zvodnění mezi jednotlivými stanovišti na přehradách. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny *, $\alpha = 0,06$ označeny **.

Snižující se obsah vody s hloubkou sedimentu indikuje, že dochází k jeho zhutňování. Tento trend ale není průkazný (ANOVA: $df = 2$; $F = 1,04$; $p = 0,36$), částečně také kvůli relativně krátké délce kóru (6 cm).

V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky ztráty žíháním, které jsou podobně variabilní jako relativní zvodnění a vykazují podobné trendy. Ztráta žíháním, indikující obsah organického uhlíku, se liší mezi přehradami navzájem (ANOVA: $df = 4$; $F = 64,82$; $p < 10^{-6}$), mezi stanovišti v rámci přehrady (tab. 6, ANOVA: $df = 2$; $F = 103,03$; $p < 10^{-6}$), a také interakce přehrada x stanoviště je průkazná (ANOVA: $df = 8$; $F = 14,53$; $p < 10^{-6}$). Obecně je ztráta žíháním vyšší u hráze než v horních částech nádrže. Rozdíl ve ztrátě žíháním mezi jednotlivými vrstvami nebyl prokázán (ANOVA: $df = 2$; $F = 0,17$; $p = 0,85$).

nádrž vrstva	Brno			Seč			Vír			Vranov			Žlutice		
	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h
0 - 2 cm	7,8	3,5	12,5	12,3	10,8	15,3	14,9	14,5	17,6	7,7	11,4	13,8	12,0	14,0	17,6
2 - 4 cm	8,7	2,6	14,0	15,9	12,3	19,6	15,1	14,9	18,9	6,5	12,0	15,0	10,2	13,4	17,5
4 - 6 cm	10,6	1,2	13,9	17,2	10,7	17,7	15,4	13,9	18,3	6,8	11,4	15,9	10,4	14,5	17,6

Tab. 5: Relativní ztráta žíháním vzorků sedimentu, uveden je průměr hodnot ze dvou kórů (Brno – HP byl odebrán pouze jeden kór, Vranov – P data z druhého kóru byla ztracena).

	Brno	Seč	Vír	Vranov	Žlutice
P x HP	*	*		*	
P x H	*			*	*
HP x H	*	*	*		*

Tab. 6: Rozdíl ve ztrátě žíháním mezi jednotlivými stanovišti na přehradách. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny *.

2. Počet a distribuce efípií v sedimentu nádrže

Celkem bylo nalezeno 2567 efípií (rok 2004 - 1711 efípií; rok 2005 - 856 efípií). Množství nalezených efípií se výrazně lišilo mezi jednotlivými přehradami a stanovišti. Vysoká variabilita mezi odebranými kóry (tab. 7), které se však průkazně neliší (T-test, $t = -0,50$; $df = 38$; $p = 0,62$), naznačuje na nerovnoměrnost distribuce efípií v sedimentu. Nulové hodnoty počtu efípií (v přítokové zóně) neznamenají nutně úplnou absenci efípií, denzita pod 2000 efípií.m⁻² odpovídá přibližně 1 - 3 nalezeným efípiím ve vzorku a takto nízké výsledné hodnoty jsou zatíženy náhodnou chybou.

		p		hp		h	
		variabilita kórů	průměr	variabilita kórů	průměr	variabilita kórů	průměr
Brno	0-2cm	3,24 - 4,90	4,07	-	1,52	7,93 - 11,35	9,64
	2-4cm	1,17 - 2,67	1,92	-	0,37	18,64 - 23,44	21,04
	4-6cm	0,56 - 5,72	3,14	-	0,00	18,88 - 19,83	19,36
Seč	0-2cm	1,68 - 2,05	1,86	5,13 - 13,85	9,49	41,31 - 50,15	45,73
	2-4cm	4,03 - 6,17	5,10	5,31 - 9,28	7,30	34,02 - 43,35	38,69
	4-6cm	2,06 - 15,40	8,73	3,30 - 19,04	11,17	90,18 - 98,42	94,30
Vír	0-2cm	0,69 - 2,59	1,64	6,70 - 8,03	7,36	31,93 - 38,06	35,00
	2-4cm	1,42 - 2,49	1,95	5,21 - 7,40	6,31	34,44 - 54,65	44,55
	4-6cm	1,22 - 1,90	1,56	1,14 - 2,24	1,69	72,47 - 84,04	78,25
Vranov	0-2cm	0,00 - 0,46	0,23	1,52 - 3,75	2,64	31,55 - 70,55	51,05
	2-4cm	-	0,00	2,15 - 3,34	2,75	39,36 - 110,73	75,04
	4-6cm	0,00 - 0,73	0,37	4,08 - 10,42	7,25	23,36 - 59,55	41,45
Žlutice	0-2cm	7,89 - 10,90	9,39	22,51 - 28,96	25,73	18,84 - 22,65	20,74
	2-4cm	1,52 - 3,50	2,51	30,66 - 39,96	35,31	37,41 - 68,32	52,86
	4-6cm	6,85 - 6,90	6,88	45,98 - 62,77	54,37	55,52 - 112,10	83,81

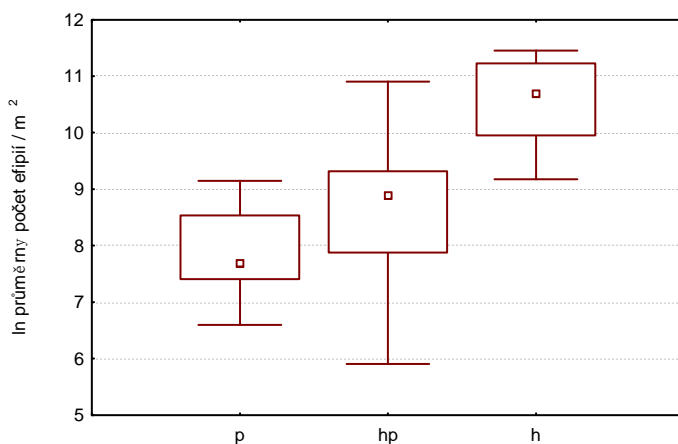
Tab. 7: Průměrný počet efípií x 10³ na 1m² (Brno – HP byl odebrán pouze jeden kór, Vranov – P data z druhého kóru byla ztracena).

Z hlediska počtu efípií se jednotlivé přehrady průkazně liší mezi sebou (ANOVA: df = 4; F = 15,14; p = 10⁻⁶), v rámci přehrady je průkazný vliv stanoviště odběru na počet nalezených efípií (ANOVA: df = 2; F = 101,97; p < 10⁻⁶). Celkově je distribuce efípií v nádrží odlišná pro každou přehradu a stanoviště (interakce ANOVA: df = 8; F = 6,51; p = 10⁻⁵).

Vzájemné porovnání stanovišť v přehradě je uvedeno v tabulce 8, množství efípií v sedimentu je vždy nižší v přítoku než u hráze (graf 1, ANOVA: df = 2; F = 28,26; p = 10⁻⁴). Oblast hlubokého přítoku vykazovala značnou variabilitu, na většině přehrad byla početnost efípií v porovnání s přítokem vyšší (Seč, Vír a Vranov). V hlubokém přítoku Žlutice se množství efípií blížilo hrázovým hodnotám a naopak jediný odebraný kór z Brna byl prakticky bez efípií.

	Brno	Seč	Vír	Vranov	Žlutice
P x HP				*	*
P x H	**	*	*	*	*
HP x H	*	*	*	*	

Tab. 8 Rozdíl počtu efípií na jednotku plochy mezi jednotlivými stanovišti na přehradách. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny *, $\alpha = 0,06$ označeny **.



Graf 1: Logaritmus průměrného počet efípií.m⁻² na jednotlivých stanovištích (hodnoceno pro všechny přehrady a vrstvy společně). Zobrazen je medián, oblast 25 % - 75 % hodnot a celkový rozsah .

Nejvyšší počet efípií v rámci kóru nikdy nebyl ve svrchní vrstvě sedimentu, ale ve spodních vrstvách, rozdíl mezi vrstvami ale není signifikantní (T-test pro vrstvy 0 - 2 cm a 4 - 6 cm, $t = -1,93$; $df = 13$; $p = 0,075$). Vzhledem k tomu, že ani pro sediment nebylo zhutňování prokázáno, data o efípiích byla pro pozdější hodnocení druhového a délkového složení sloučena podle lokalit a vrstvy již nebyly dále rozlišovány. Tento krok byl motivován především zvýšením počtu efípií (N) pro analýzy (s vědomím možné integrace faktoru času, tj. různého stáří efípií, především v hrázové oblasti).

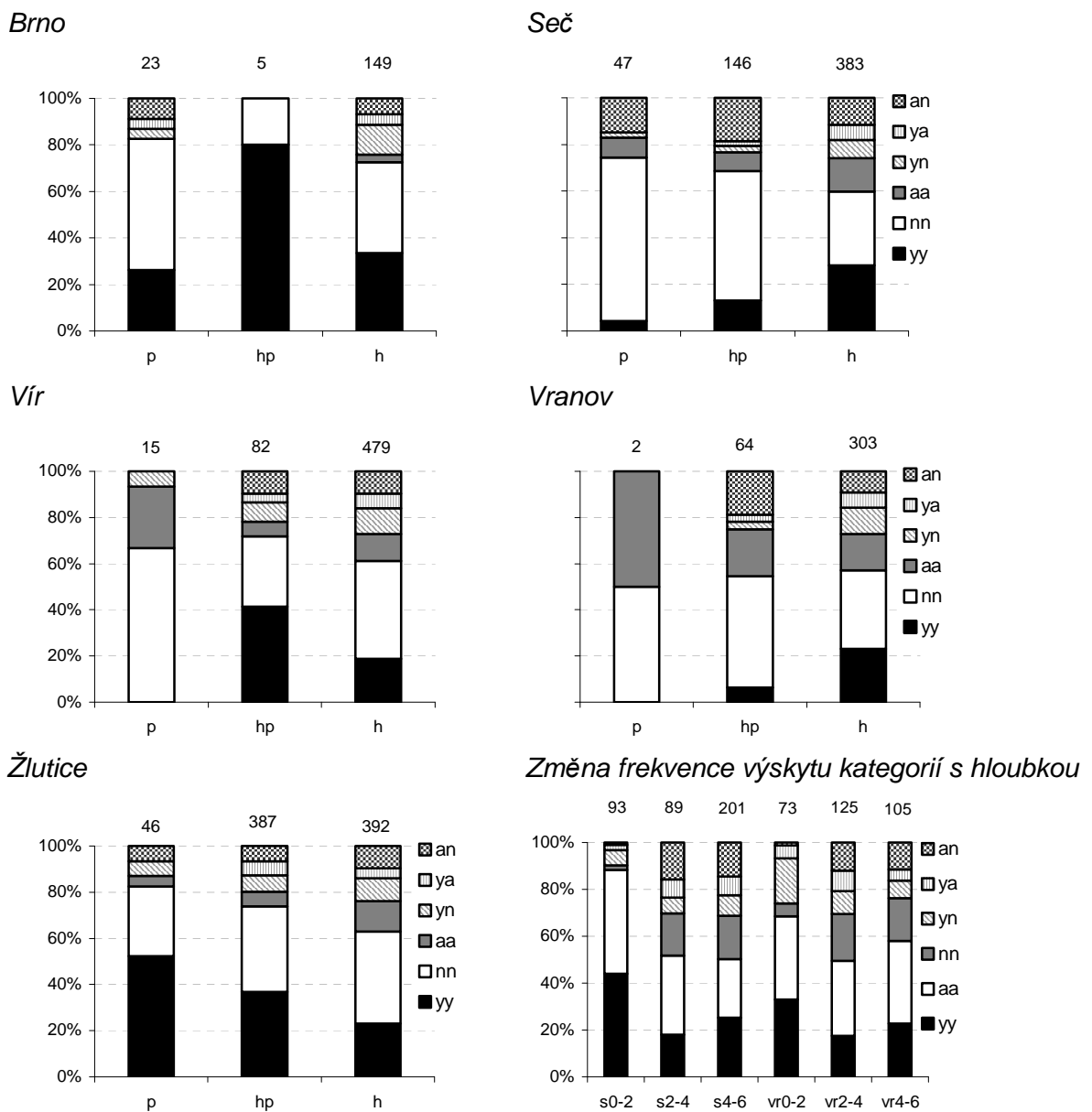
3. Zachovalost vajíček v efípiích

Nalezená efípia byla otevřena pro posouzení stavu zachovalosti vajíček, do analýzy bylo zahrnuto 2523 efípií (z celkového počtu 2567 bylo osm efípií ztraceno při zpracování a 36 efípií bylo odloženo k pozdějšímu zpracování po dosažení počtu 40 otevřených efípií na vzorek, pozdější zpracování nebylo možné kvůli líhnutí a degradaci vajíček). Rozlišovány byly tři kategorie: Y = zachované vajíčko / embryo, A = degradované vajíčko, N = vajíčko chybělo (následek líhnutí nebo neoplození). Tímto značením vzniklo 6 možných kombinací pro kódování stavu páru vajíček v efípiu - YY, AA, NN, YN, YA, a AN.

Relativní zastoupení jednotlivých kategorií stavu vajíček je uvedeno v grafu 2. Hrázové oblasti všech přehrad jsou si relativně podobné, stav obou vajíček byl přibližně ve ¾ efípií stejný (kategorie YY, NN, AA). Obě vajíčka (YY) byla zachovalá v 18 - 33 % efípií, prázdných (NN) bylo vždy více než zachovalých (31 - 42 %), obě vajíčka degradovaná (AA) byla v 5 – 15 % efípií. Kombinované kategorie tvořily menšinu z celkového množství efípií, nejčastější byla kategorie YN a AN. V přítokových sedimentech se stav vajíček výrazně lišil. Na Seči, Víru a Vranově bylo 50 - 70 %

nalezených efípií prázdných, naproti tomu 52 % efípií z přítoku Žlutice obsahovalo dobře zachovalá vajíčka.

Při bližším pohledu lze nalézt rozdíly v zastoupení jednotlivých kategorií také mezi vrstvami. U hráze byl v horní vrstvě sedimentu vyšší podíl kategorie YY. V hlubších vrstvách sedimentu sledovaných nádrží se zvýšil podíl abortovaných vajíček, zatímco podíl prázdných zůstal stejný. Tento trend byl nalezen v hrázových efípiích všech přehrad (graf 2 pro ilustraci uvádí Seč a Vranov) s výjimkou Brna, kde byl nejvyšší podíl poškozených a prázdných efípií ve vrstvě 2 - 4 cm, vrstva 4 – 6 cm se velice podobala horním 0 – 2 cm, tedy s minimem abortovaných vajíček a vysokým podílem zachovalých.



Graf 2: Stav zachovalosti vajíček v efípiích na jednotlivých přehradách. Pravý dolní graf porovnává stav zachovalosti pro jednotlivé hloubky (0 – 2 cm, 2 – 4 cm a 4 – 6 cm) pro přehradu Seč a Vranov. Uvedeno je relativní zastoupení kategorií a celkový počet prohlednutých efípií pro každé stanoviště.

Statisticky bylo prokázáno, že stav vajíček v přítokové a hrázové oblasti je různý a frekvence výskytu jednotlivých kategorií se v rámci přehrady také liší (tabulka 9).

	Brno	Seč	Vír	Vranov	Žlutice
Liší se stanoviště	*	*	*	*	*
Liší se kategorie		*	*	*	*

Tab. 9 Výsledky statistické analýzy rozdílu frekvenčního zastoupení jednotlivých kategorií zachovalosti efiípií. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny*. První test zjišťuje rozdíly zachovalosti vajíček mezi jednotlivými stanovišti. Druhý testuje homogenitu distribuce stavu zachovalosti vajíček v efiípiích v nádrži.

4. Úspěšnost amplifikace

Dohromady bylo z pěti přehrad připraveno 1410 izolátů DNA. Pro druhovou analýzu byly vybrány vzorky reprezentující jednotlivá efiípia, nejvýše však 40 - 50 pro každou vrstvu. Celkem bylo tedy zpracováno 764 izolátů. Procento úspěšnosti amplifikace příslušného úseku DNA bylo celkově 81 %, přehrady se vzájemně velmi lišily: nejčastěji byla amplifikace úspěšná na Žluticích (89 %), Brně (88 %) a Seči (85 %), nejméně na Víru (75 %) a Vranově (63 %).

Pravděpodobnost poškození DNA roste se stářím efiípia, což může být indikováno právě neúspěchem amplifikace. Rozdíl mezi stářím efiípií v jednotlivých vrstvách by mohl být vzhledem k pravděpodobné sedimentační rychlosti očekáván jen u hráze. Neúspěšnost přibližně roste s hloubkou (tab. 10), výsledky jsou ale neprůkazné (kvůli velmi nízkému počtu izolací).

nádrž	Brno			Seč			Vír			Vranov			Žlutice		
	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h	p	hp	h
0 - 2 cm	80	100	100	-	75	94	-	92	87	-	0	60	89	95	93
2 - 4 cm	-	100	86	100	25	94	0	58	62	-	0	84	100	97	83
4 - 6 cm	100	-	87	50	100	81	-	75	79	-	20	74	80	93	74

Tab. 10: Relativní úspěšnost amplifikace příslušného úseku DNA.

5. Druhové složení efiípií a porovnání s populací ve vodním sloupci

Z úspěšně amplifikovaných a rozstřížených vzorků DNA hrotnatek bylo určeno druhové složení společenstva uloženého v efiípiích (graf 3). V přítokové oblasti brněnské přehrady bylo do druhu určeno celkem jedenáct efiípií, většina (72 %) patřila *D. cucullata*,

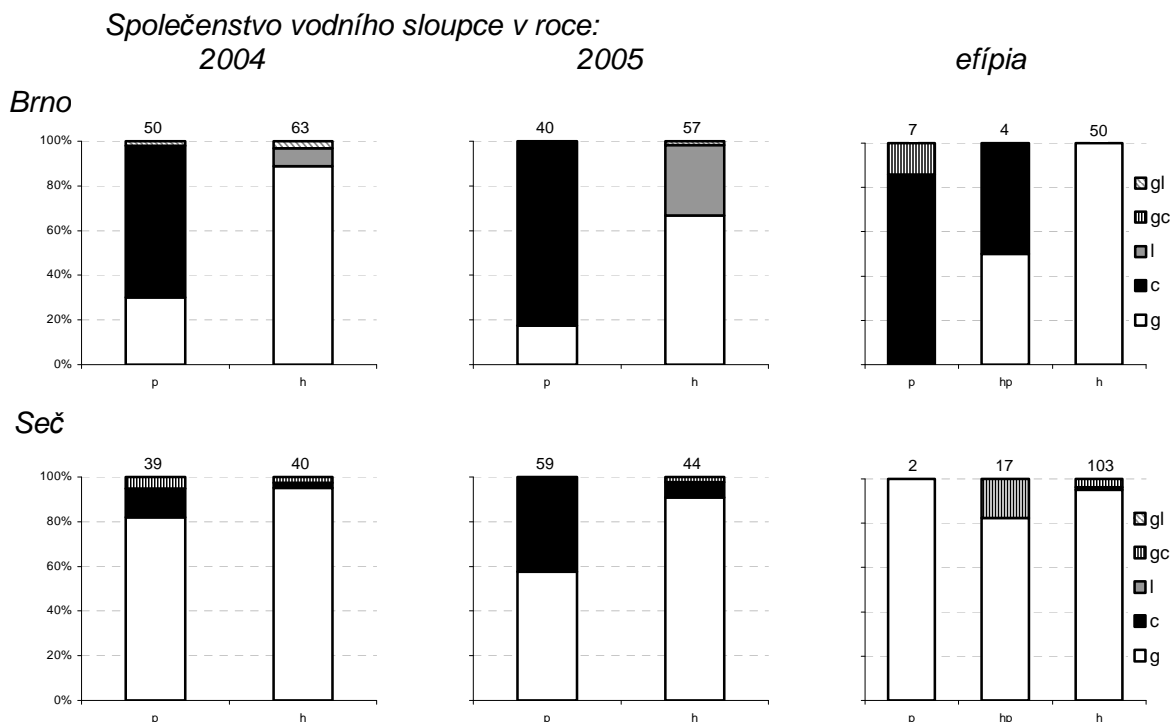
jedno efípium byl hybrid *D. cucullata* x *D. galeata*. U hráze byla všechna efípia určena jako *D. galeata*.

V horní části nádrže Seč byla většina z 19 určených efípií *D. galeata*, tři efípia byla hybridní *D. cucullata* x *D. galeata*. V dolní části nádrže bance vajíček dominovala *D. galeata* (95 %), *D. cucullata* byla určena pouze jednou, ale hybrid obou druhů tvořil 3 % dormantní populace.

Na přehradě Vír byly celkem nalezeny čtyři taxony, v oblasti hlubšího přítoku v efípiích převládala *D. galeata* (88 %) nad *D. cucullata* (12 %). U hráze byla situace obdobná (64 % a 15 %), navíc zde byla zastoupena *D. longispina* (14 %) a její hybrid s dominantním druhem (5 %).

Pro vranovský přítok se podařilo druhově určit pouze jediný z 11 isolátů, efípium pocházelo od *D. cucullata*. U hráze byly zastoupeny všechny tři taxony a dva z možných hybridů. Nejvíce efípií patřilo druhu *D. longispina* (70 %), dalšími druhy dle početnosti byly *D. galeata* (15 %), *D. cucullata* (6 %), hybrid *D. galeata* x *D. longispina* (4 %) a nejméně početným taxonem v efípiích byl kříženec *D. cucullata* x *D. galeata* (3 %).

Žlutická přehrada byla ve své horní části z pohledu banky vajíček osídlena výhradně *D. galeata*. Tento druh je dominantní také u hráze (69 %), druhým nejčastějším taxonem je *D. longispina* (28 %), minoritně byly nalezeny *D. cucullata* a hybrid *D. galeata* x *D. longispina* (1 %).

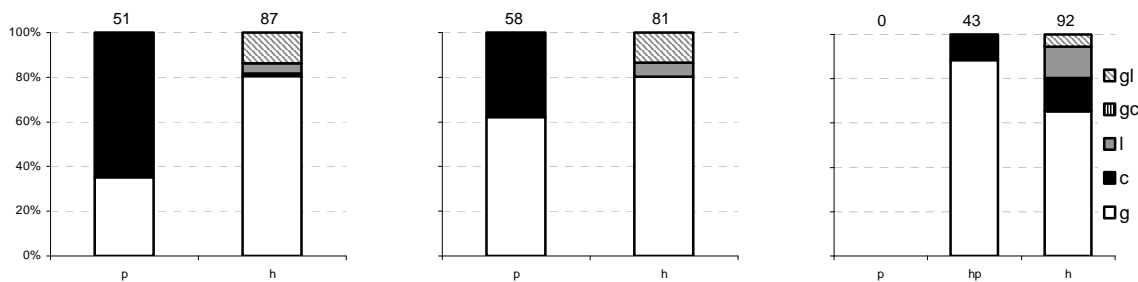


Společenstvo vodního sloupce v roce:
2004

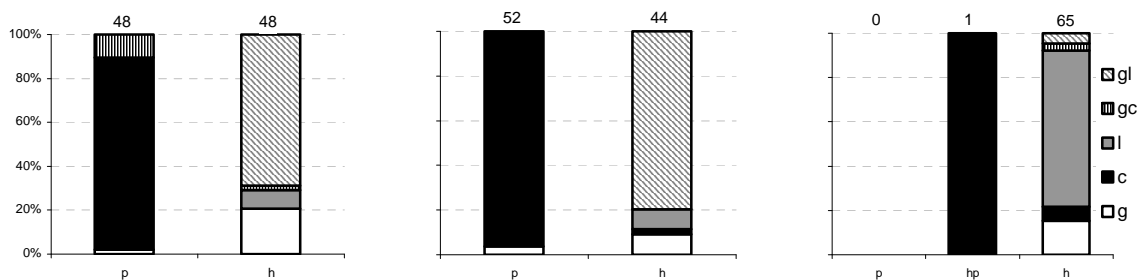
2005

efípie

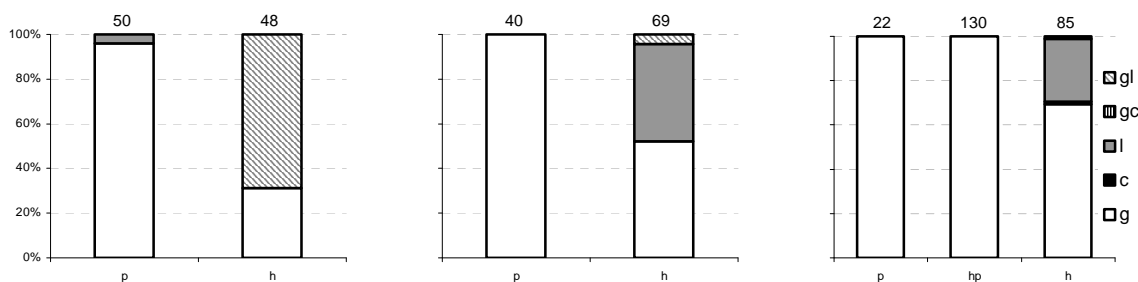
Vír



Vranov



Žlutice



Graf 3: Porovnání zastoupení jednotlivých taxonů *Daphnia gr. longispina* ve společenstvu vodního sloupce v letech 2004 a 2005 (levý a střední graf) a v efípiích (pravý graf, H+P 2004, HP 2005). Uvedeno je jejich relativní zastoupení a celkový počet analyzovaných jedinců / vajíček reprezentující efípie.

Výsledek testování odlišností druhového složení efípií je uveden v tabulce 11. Rozdíl druhového složení mezi přítokem a hlubokým přítokem byl signifikantní pouze na Seči. Na Víru a Vranově nemělo testování vzhledem k nulovým hodnotám smysl. Mezi hrází a přítokem (pro Vír a Vranov byla použita data pro HP) byly rozdíly druhového složení průkazné na všech přehradách. Distribuce jednotlivých druhů v nádrži se neshoduje - tento trend je průkazný na přehradách Brno, Seč a Vranov (tab. 11).

	Brno		Seč		Vír		Vranov		Žlutice	
	P x HP	P x H	P x HP	P x H	P x HP	HP x H	P x HP	HP x H	P x HP	P x H
Liší se stanoviště		*	*	*	0	*	0	*		*
Liší se druhy		*		*	0		0	*		

Tab. 11: Rozdíly v druhovém složení na nádržích. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny*. První otázka zjišťuje rozdíly druhového složení mezi jednotlivými stanovišti. Druhá testuje homogenitu druhového složení v nádrži.

Porovnání druhového složení efípií se společenstvem ve vodním sloupci po oba sledované roky je znázorněno v grafu 3.

Ve vodním sloupci přítoku Brna po oba roky (2004 a 2005) převažovala *D. cucullata* (68 % a 82 %), následována *D. galeata* (30 % a 17 %). V roce 2004 byl zachycen jeden hybridní jedinec *D. galeata* x *D. longispina* (2 %). V efípiích byla nalezena *D. cucullata* a v roce 2005 i *D. galeata*. Navíc byl v dormantní bance vajíček přítomen hybrid *D. cucullata* x *D. galeata*. U hráze se ve společenstvu perlooček vyskytovala *D. galeata* (2004 - 88 % a 2005 - 66 %) společně s *D. longispina* (8 % a 31 %), minoritně také hybridi obou druhů (do 3 %). U hráze byla nalezena pouze efípia druhu *D. galeata*.

Společenstvo hrotnatek sečského přítoku bylo tvořeno *D. galeata* (82 % a 57 %), dále *D. cucullata* (12 % a 42 %) a jejich křížencem (pouze 2004 – 5 %). V efípiích z horní části nádrže byl jako majoritní taxon určen druh *D. galeata*, v roce 2005 doplněn hybridem *D. cucullata* x *D. galeata*. Pelagiálu i efípiím u hráze přehrady dominovala *D. galeata*. Ve vodním sloupci se dále vyskytovala *D. cucullata* (2 % a 6 %) a hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* (2 % po oba roky). Druhým taxonem zjištěným v efípiích byl kříženec *D. cucullata* x *D. galeata* (17 %).

Dominantní druhem v přítoku Víru byla v roce 2004 *D. cucullata* (64 %), v roce 2005 byla vystřídána *D. galeata* (62 %). Žádné efípium nebylo druhové určeno pro oblast přítoku, data z hlubokého přítoku v roce 2005 kopírují stav ve vodním sloupci (převládá *D. galeata* doplněná *D. cucullata*). Zajímavější je situace u hráze, vodní sloupec byl obdobně osídlen po oba roky: *D. galeata* (80 %), *D. galeata* x *D. longispina* (13 %), *D. longispina* (4 - 6 %). V roce 2004 byla zjištěna jedna hrotnatka *D. cucullata* (1 %). Složení banky efípií se lišilo: nejpočetnějším taxonem zůstává *D. galeata*, následovaná *D. cucullata* a *D. longispina* (oba přibližně 15 %), nejmenší podíl patřil *D. galeata* x *D. longispina*.

Vranovský přítok byl během sledovaných let osídlen převážně *D. cucullata* (87 % a 96 %, pro jediné určené efípium 100 %). Dalšími taxony určenými ve vodním sloupci byl hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* (2004 - 10 %) a *D. galeata* (2004 - 2 % a 2005 - 4 %). U hráze se v aktivní populaci nejčastěji vyskytovala *D. galeata* x *D. longispina* (68 % a 79 %), dále *D. galeata* (20 % a 9 %) a *D. longispina* (8 % a 9 %). V roce 2004 byl zachycen jeden jedinec *D. cucullata* x *D. galeata*, v roce 2005 jedinec *D. cucullata*. Ačkoliv ve vodě u hráze byla *D. longispina* málo početná, patřila jí většina efípií (70 %). Druhým nejčastěji určeným taxonem byla *D. galeata*, ve frekvencích okolo 5 % se vyskytovala *D. cucullata* a oba hybridy.

V horní části přehrady Žlutice byla v efípiích i ve vodě zastoupena výhradně *D. galeata* (pouze v r. 2004 byla ve sloupci minoritně přítomna *D. longispina* - 4 %). Situace u hráze se v aktivním společenstvu meziročně změnila. První rok zde převládal hybridní taxon *D. galeata* x *D. longispina* (68 %), doplněný pouze druhem *D. galeata*.

V létě 2005 byl pelagiál sdílen druhy *D. galeata* a *D. longispina* (52 % a 43 %), jejichž hybrid byl prakticky potlačen (5 %). Data o efípiích byla sbírána v obou letech, v grafu 3 je presentován jejich průměr. V prvním roce byl podíl *D. galeata* v dormantním společenstvu 58 %, v druhém roce vzrostl na 90 %. Naopak podíl druhu *D. longispina* klesl ze 40 % na 10 %. Kříženec *D. galeata* x *D. longispina* byl zaznamenán pouze v roce 2004 v jediném efípiu.

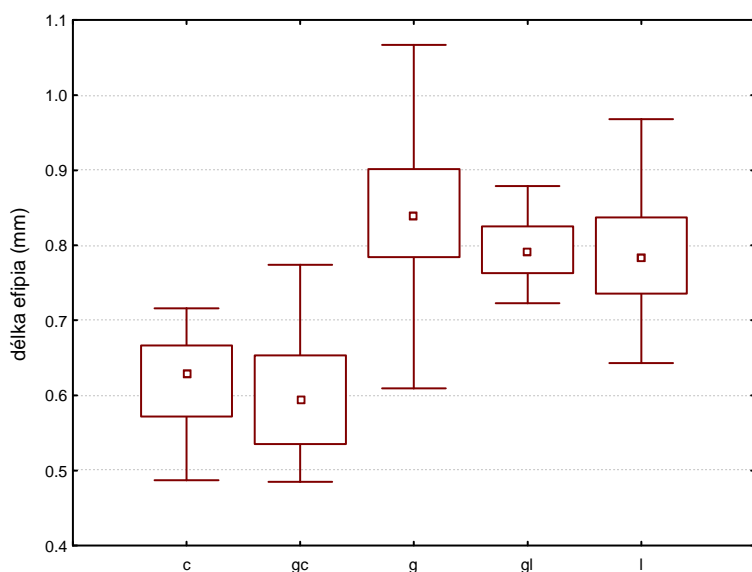
V tabulce 12 je uvedeno statistické porovnání distribuce taxonů v nádržích. Pro populaci vodního sloupce byl v obou letech rozdíl druhového složení mezi stanovišti průkazný a také druhy se na stanovištích vyskytovaly v průkazně jiných početnostech. Meziroční variabilita je nízká, v přítoku se oba roky z hlediska zastoupení taxonů neliší na žádné přehradě, u hráze se meziročně liší druhová skladba na Brně a Víru. Porovnání složení aktivní a dormantní populace perlooček na jednotlivých nádržích říká, že na Víru a Vranově bylo společenstvo vodního sloupce v daný okamžik odlišné od efípiálního společenstva v oblasti přítoku i hráze, na Žlutících v oblasti hráze, na ostatních přehradách nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl mezi společenstvy.

		Brno	Seč	Vír	Vranov	Žlutice
Daphnia 2004	Liší se stanoviště	*	*	*	*	*
	Liší se zastoupení taxonů H x P	*		*	*	*
Daphnia 2005	Liší se stanoviště	*	*	*	*	*
	Liší se zastoupení taxonů H x P	*	*	*	*	*
P	Liší se zastoupení taxonů <i>Daphnia</i> 2004 x 2005					
	Liší se zastoupení taxonů <i>Daphnia</i> x efípia 2004		*	*	*	
H	Liší se zastoupení taxonů <i>Daphnia</i> 2004 x 2005	*		*		
	Liší se zastoupení taxonů <i>Daphnia</i> x efípia 2004			*	*	*

Tab. 12: Statistické porovnání distribuce taxonů v nádržích. Testy *Daphnia* 2004 a 2005 testují homogenitu distribuce hrotnatek vodního sloupce v rámci nádrže. Testy P a H testují pro jednotlivá stanoviště z hlediska meziroční variability aktuálního složení společenstva vodního sloupce a jeho shody se společenstvem v efípiích. Pro test P byl pro efípia použit součet dat P a HP. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny *.

6. Velikostní složení efípií

Délka efípií jednotlivých druhů hrotnatek ze všech přehrad se liší (ANOVA: $df = 4$, $F = 49,39$; $p < 10^{-6}$). *D. cucullata* a hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* jsou průkazně menší než ostatní taxony (graf 4), hybrid *D. galeata* x *D. longispina* se svými rozměry neliší od *D. galeata* ani *D. longispina* (tab. 13).



Graf 4: Délka efiípií jednotlivých taxonů. C = *D. cucullata*, GC = *D. cucullata* x *D. galeata*, G = *D. galeata*, GL = *D. galeata* x *D. longispina* a L = *D. longispina*. Zobrazen je medián, oblast 25 % - 75 % hodnot a celkový rozsah .

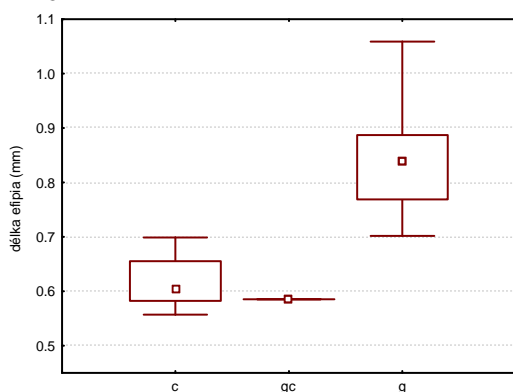
taxon	c	gc	g	gl	l
gc			*	*	*
g	*	*			
gl	*	*			
l	*	*			
N	22	10	480	8	93

Tab. 13: Rozdíly v délce efiípií pro taxony ze všech přehrad. C = *D. cucullata*, GC = *D. cucullata* x *D. galeata*, G = *D. galeata*, GL = *D. galeata* x *D. longispina* a L = *D. longispina*. Výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny *.

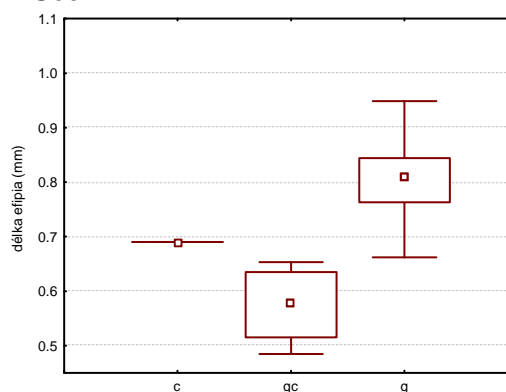
V brněnské přehradě se délka efiípií liší u hráze od přítokové oblasti ($N_H = 49$; $N_{P+HP} = 11$; ANOVA: $df = 1$; $F = 42,49$; $p < 10^{-6}$). Tento rozdíl souvisí s druhovým složením (ANOVA: $df = 2$; $F = 32,73$; $p < 10^{-6}$). Průkazně jiné délky mají *D. cucullata* x *D. galeata* ($N_g = 81$; $N_c = 8$; $p = 10^{-3}$), délka *D. galeata* a *D. cucullata* x *D. galeata* se také liší, hybrid byl zachycen pouze v jednom efiípiu ($N_{gc} = 1$; $p = 10^{-4}$, graf 5)

Na Seči se délka efiípií v hrázové a přítokové oblasti neliší ($N_H = 103$; $N_{P+HP} = 19$; ANOVA: $df = 1$; $F = 42,49$; $p < 10^{-6}$). V rámci celé přehrady se liší délky jednotlivých taxonů (graf 5, ANOVA: $df = 2$; $F = 36,36$; $p < 10^{-6}$). Hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* je průkazně menší než *D. galeata* ($N_g = 114$; $N_{gc} = 7$, $p = 10^{-4}$). Druhová příslušnost k *D. cucullata* byla určena pouze v jednom efiípiu, i proto se jeho velikost neliší od ostatních dvou druhů hrotnatek.

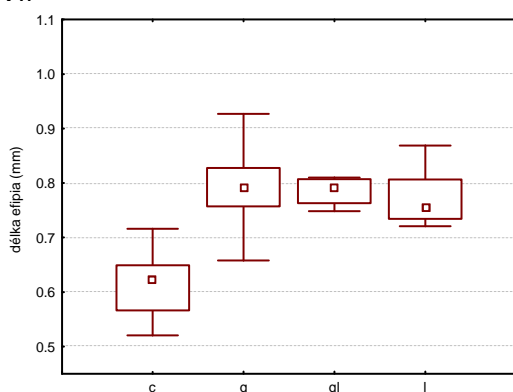
Brno



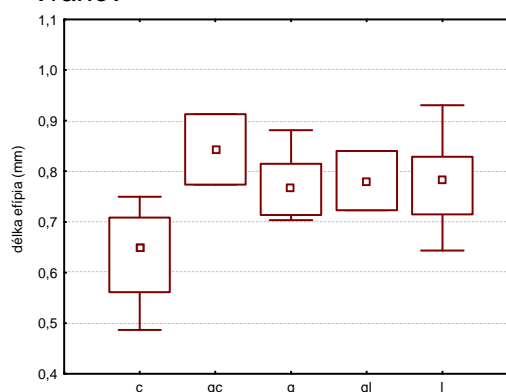
Seč



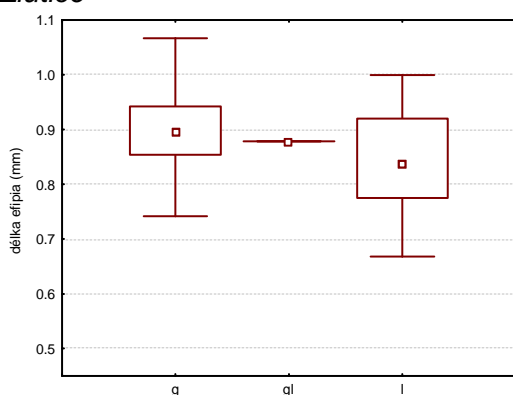
Vír



Vranov



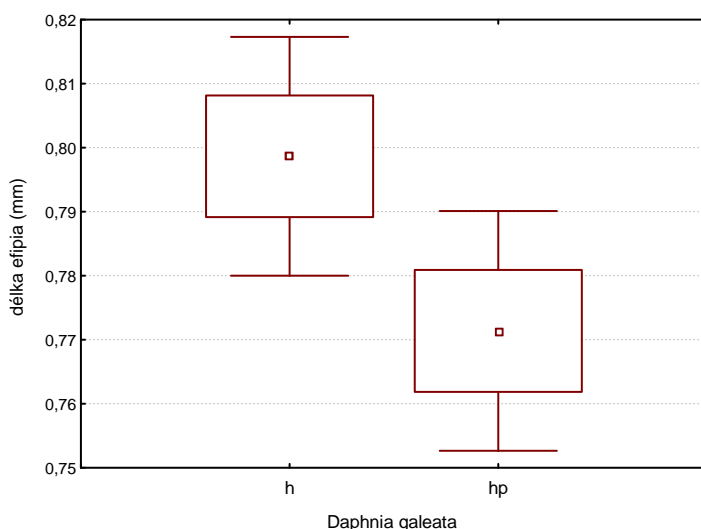
Žlutice



Graf 5: Porovnání délek efiípa taxonů komplexu *D. longispina* pro jednotlivé přehrady:

C = *D. cucullata*, GC = *D. cucullata* x *D. galeata*, G = *D. galeata*, GL = *D. galeata* x *D. longispina* a L = *D. longispina*
Zobrazen je medián, oblast 25 % - 75 % hodnot a celkový rozsah .

V přehradě Vír je délka efiípi se průkazně odlišná u hráze a hlubokého přítoku ($N_H = 92$; $N_{HP} = 42$; ANOVA: $df = 1$; $F = 5,04$; $p = 0,027$). Rozdíly jsou i v délkách efiípi jednotlivých druhů (graf 5, ANOVA: $df = 2$; $F = 19,23$; $p < 10^{-6}$). *D. cucullata* ($N_c = 19$) je menší než všechny ostatní taxony ($p_{g,l} = 10^{-6}$, $p_{gl} = 10^{-4}$), které se velikostně překrývají ($N_g = 97$; $N_{gl} = 5$, $N_l = 13$). Populace *Daphnia galeata* na této přehradě je dostatečně početná pro porovnání velikosti efiípi na podélném gradientu ($N_H = 60$; $N_{HP} = 37$). Ačkoliv efiípa v přítoku jsou menší a variance jejich délek je nižší (graf 6), oba výsledky nejsou průkazné (velikost: T-test: $df = 95$; $t = 1,91$; $p = 0,059$; variance: T-test $F = 1,61$; $p = 0,13$).



Graf 6: Velikost efípií druhu *D. galeata* u přítoku a hráze nádrže Vír. Zobrazen je medián, oblast 25 % - 75 % hodnot a celkový rozsah .

Z přítokové oblasti Vranova se podařilo druhově určit pouze jediné efípium (*D. cucullata*, $L = 0,64$ mm), pro hodnocení velikostního složení byly použity délky efípií bez známé druhové příslušnosti ($N_H = 64$; $N_{P+HP} = 62$). Obě oblasti se průkazně liší (T-test: $df = 124$; $t = 8,27$; $p < 10^{-6}$), průměrná velikost přítokových efípií je 0,62 mm, lze tedy předpokládat, že se převážně jedná o efípia *D. cucullata* a hybridu *D. cucullata* x *D. galeata*. Pět taxonů perlooček bylo určeno v efípiích z hrázové oblasti ($N_l = 45$; $N_g = 10$; $N_c = 4$; $N_{gl} = 3$, $N_{gc} = 2$), druhy se v délce efípia vzájemně neliší (graf 5, ANOVA: $df = 4$; $F = 1,39$; $p = 0,25$).

Množství efípií v sedimentu přehrady Žlutice ($N_H = 85$; $N_{HP} = 130$; $N_P = 22$) a nejvyšší průměrná míra úspěšnosti amplifikace DNA umožnila při hodnocení rozlišovat všechna tři stanoviště odběrů. Délka efípií není rozdílná na podélném gradientu nádrže (ANOVA: $df = 2$; $F = 0,42$; $p = 0,66$). V sedimentu byla nalezena efípia tří taxonů (*D. galeata*, *D. longispina* a jejich hybrid), jejichž délka je prakticky totožná (graf 5, $N_g = 211$; $N_l = 25$; $N_{gl} = 1$; ANOVA: $df = 2$; $F = 0,08$; $p = 0,93$). Podobně nebyl nalezen rozdíl v délce druhu *D. galeata* mezi jednotlivými vzorkovanými stanovišti na nádrži (ANOVA: $df = 2$; $F = 0,75$; $p = 0,47$).

Porovnání výběru délek druhově určených efípií komplexu *D. longispina* se všemi nalezenými efípií (tj. určenými i neurčenými) pro danou lokalitu je zobrazeno v tabulce 14. Délka druhově určených efípií byla na všech přehradách stejná nebo větší. Tento trend nebyl statisticky významný pouze na Vranově H a Žluticích H a HP.

		druhově určená efípia			všechna efípia			Chi-Square	p
		N	průměr	variance	N	průměr	variance		
Brno	H	49	0,8393	0,0066	108	0,8162	0,0082	7,22	0,02702
	HP	11	0,6545	0,0101	26	0,6187	0,0059	-	-
Seč	H	103	0,7998	0,0086	335	0,7592	0,0091	26,21	0,00000
	P+HP	19	0,7586	0,0053	143	0,7224	0,0321	-	-
Vír	H	210	0,7704	0,0117	266	0,7707	0,0120	21,78	0,00002
	HP	42	0,7520	0,0061	82	0,7300	0,0106	15,06	0,00177
Vranov	H	64	0,7694	0,0100	194	0,7667	0,0095	1,93	0,16503
Žlutice	H	84	0,8792	0,0069	253	0,8692	0,0089	7,85	0,09727
	HP	192	0,8749	0,0072	214	0,8683	0,0088	5,27	0,07166
	P	22	0,9213	0,0073	150	0,9000	0,0054	-	-

Tab. 14: Porovnání délek výběru druhově určených efípií a délek všech nalezených efípií. Uvedena je hodnota testovacího kritéria, výsledky průkazné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou označeny tučně. V přítoku Vranova bylo do druhu určeno jediné efípium, Brno, Seč a Žlutice nebylo možné testovat kvůli nízkému počtu hodnot (-).

VII. DISKUSE

Běžné důvody a účely studia banky vajíček shrnují Brendock a De Meester (2003): taxonomie a biogeografie (Nilssen *et al.* in press), evoluční ekologie (Schwenk *et al.* 2001) a studia efípií jako vektorů toku genů (Mergeay *et al.* 2005b, Vandekerkhove *et al.* 2005), ekologie společenstev (Cáceres 1998), conservační a restaurační ekologie – např. možnost autogenní obnovy populace perlooček po acidifikaci jezera (Faustová *et al.* 2004, Marková *et al.* 2006), druhové diversity společenstva (May 1986, Mergeay *et al.* 2005a) a v neposlední řadě také paleolimnologie a rekonstrukce historického vývoje (Jeppesen *et al.* 2002, Jankowski & Straile 2003).

Cílem této studie bylo kvantifikovat množství a druhové složení banky trvalých vajíček v sedimentu dlouhých a korytovitých nádrží. Na pěti vybraných přehradách byly v červenci roku 2004 odebrány vzorky sedimentu z oblasti přítoku a hráze, doplněné oblastí hlubšího přítoku v r. 2005. Zpracováním sedimentu byla získána data o jeho charakteru (obsah vody a ztráta žiháním) a distribuci trvalých vajíček komplexu *Daphnia longispina* uložených v sedimentu nádrže. U vajíček uložených v efípiích byla hodnocena jejich zachovalost, určena druhová příslušnost pomocí metody ITS-RFLP a změřena délka dorsálního švu efípie. Tato data byla porovnána se společenstvem hrotnatek ve vodním sloupci.

1. Charakter sedimentu – zvodnění a ztráta žiháním

Měřené vlastnosti sedimentu poukázaly na specifičnost každé z přehrad, kdy konkrétní hodnoty obsahu vody a ztráty žiháním byly individuální charakteristikou dané nádrže. Obecným trendem bylo průkazně nižší zvodnění a nižší ztráta žiháním (po přepočtu odpovídající obsahu org. C) přítokového sedimentu v porovnání s hrázovým.

Porovnání zvodnění jednotlivých vrstev nepřineslo průkazné výsledky dokládající zhutňování sedimentu s hloubkou, což bylo způsobeno především krátkou délkou kóru (6 cm). Porcalová (1991) uvádí, že horních 10 cm je z hlediska zvodnění prakticky homogenní.

Vegetační zákal, který by mohl způsobovat zvýšení ztráty žiháním, je v oblasti přítoku významně překrýván přísunem anorganického materiálu vlévající se řekou (Borovec & Hejzlar 2001). Relativně vyšší ztráty žiháním v přítoku Seče a Víru vzhledem k ostatním přehradám byly pravděpodobně způsobeny přítomným sinicovým květem r. *Microcystis*.

Zvodnění a ztráta žíháním sedimentu je vyšší v hrázové oblasti, konkrétní hodnoty jsou individuální pro každou přehradu. Přítok je významně ovlivněn ukládáním písčitého materiálu. Zhutňování sedimentu nebylo na 6 cm délce kóru prokázáno.

2. Počet a distribuce efípií v sedimentu nádrže

Množství nalezených efípií bylo rozdílné mezi přehradami a stanovišti, po přepočtení na jednotku plochy se pohybovalo v rozmezí 0-10⁵ efípií.m⁻². Bylo potvrzeno, že množství efípií uložených v sedimentu je specifické pro nádrž, neexistuje tedy „průměrná nádrž“ s předvídatelným množstvím efípií v sedimentu. Ve shodě s publikovanými modely distribuce trvalých vajíček (Hairston *et al.* 1995, Cáceres 1998) bylo více efípií nalezeno v sedimentu hrázové oblasti než v sedimentu z horních částí nádrže. Tento fakt souvisí především s výškou vodního sloupce a populací v ní žijící (s výjimkou Brna byla početnost společenstva na jednotku plochy u hráze 3-11x vyšší než v přítoku, data nejsou presentována). Dalším faktorem uplatňující se v kaňonovité nádrži by mohla být strmost dna a sklouzávání sedimentu (Cavarlho & Wolf 1989). Významnější transport efípií prouděním (De Stasio 1989) lze vzhledem k zjištěným datům o prostorové segregaci druhů zamítnout.

Proč je ale v přítoku množství efípií tak nízké? Prvním důvodem může být celkově nižší abundance jednotlivých taxonů ve vodním sloupci. Jejich společenstvo zde nemusí být stabilní vzhledem ke kolísání hladiny nádrže. Při podzimních odběrech perlooček bylo několikrát pozorováno, že místo letního odběru sedimentu je bez vody. Efemérní charakter lokality představuje významný disturbanční faktor pro sediment (Brendock & De Meester 2003), kdy především lokální vzdušné víry mohou odnést efípia i na větší vzdálenosti (Maguire 1963).

Druhým faktorem může být rybí obsádka, která dosahuje nejvyšší density právě u přítoku do nádrže (Vašek *et al.* 2003). Cousyn & De Meester (1998) zjistili negativní korelaci mezi počtem ryb ve vodním sloupci a počtem nalezených efípií v sedimentu, způsobené primárně eliminací populace. Svou roli může hrát i selektivní predace efípiálních jedinců r. *Daphnia* planktivory (Mellors 1975), která je závislá na světelných podmínkách a značný vegetační zákal ji pravděpodobně oslabuje.

Třetím faktorem může být přínos materiálu řekou a jeho ukládání v horní části nádrže. Rychlost sedimentace se v oligo-mezotrofních jezerech pohybuje v rozmezí milimetrů za rok (Hairston & De Stasio 1988, Cavarlho & Wolf 1989, Moritz 1987, Cáceres 1998 Marková *et al.* 2006), v eutrofních 1 – 2 cm.rok⁻¹ (Cousyn & De Meester 1998), v přehradách je sedimentace velmi variabilní a závislá především na průtocích (J. Hejzlar, osobní sdělení). Měřené vlastnosti sedimentu to částečně potvrzují, např. vzorek z HP Brna obsahoval v porovnání s kórem odebraným předchozí rok jen minimum vody a jeho

ztráta žiháním poukazuje na písčítost sedimentu. Pokud vzorek 2005 nebyl shodou náhod odebrán z lokální písčité lavice, byl nejspíše následkem sedimentace po velkých průtocích, kdy se veškerá předchozí produkce efípií hrotnatek „pohřbila“ a nová se v objemu tohoto sedimentu „ztratila“. Obdobná situace pravděpodobně nastala i v oblasti přítoku Vranova (r. 2004). Charakter sedimentu není ale možné použít jako indikátor očekávatelného množství nalezených efípií ve vzorku, maximálně pro vysvětlení extrémně nízkých hodnot v oblasti přítoku, protože např. vzorek přítokového sedimentu ze Seče vykazoval vyšší ztrátu žiháním než mnohé hrázové sedimenty, ale abundance efípií zde byla řádově nižší.

Čtvrtou příčinou jen nízkého počtu nalezených efípií v přítoku by mohl být způsob zpracování vzorků, Moritz (1987) uvádí průměrně 1,74% ztrátu efípií *Ceriodaphnia* během prosívání a promývání sedimentu. Přítokové hrotnatky jsou menší (Vašek *et al.* 2003) a produkují tedy menší efípia (Jeppesen *et al.* 2002, Jankowski & Straile 2003), přesto šířka nejmenších změřených efípií byla alespoň dvakrát větší než velikost oček použitého sítko, možnost ztráty efípií prosíváním sedimentu tedy byla dostatečně minimalizována.

Vzhledem k velmi nízkým abundancím efípií v sedimentu přítoku byly odběry zopakovány a to v oblasti, kde se předpokládalo stálé zatopení (HP). Posun 700 m od původního stanoviště po proudu, odpovídající pětině délky nádrže, znamenal na Žluticích šestinásobný nárůst počtu efípií v sedimentu, ačkoliv hloubka vody zde byla pouhých 5 m. Na ostatních přehradách byla změna abundance efípií méně výrazná, přesun o třetinu délky na Seči znamenal zvýšení početnosti dvakrát, na Víru (čtvrtina délky) a Vranově (dvacetina délky) třikrát. Na Brně byl jediný kór HP odebrán o osminu délky přehrady níže a byl prakticky bez efípií (viz výše).

Počet efípií v horní části nádrže je nižší než v dolní části, i malý posun směrem ke hrázi vede ke zvýšení množství efípií v sedimentu. Určující je pravděpodobně vliv přítoku, rychlost ukládání materiálu a velikost populace ve vodním sloupci.

3. Zachovalost vajíček v efípiích

Frekvence výskytu kategorií zachovalosti trvalých vajíček uložených v efípiích u hráze byla na všech přehradách podobná, pravděpodobně díky vysokému počtu prohlédnutých efípií ($N_{ef} = 149$ až 483). Obě vajíčka (YY) byla zachovalá v 18 - 33 % efípií, obdobné podíly uvádí Rossi *et al.* (1998) a Hotový & Petrušek (in press): 30%, respektive 26%. Stav dvojice vajíček byl přibližně ve $\frac{3}{4}$ efípií stejný (kategorie YY, NN, AA). Obě vajíčka jsou tedy stejně citlivá na stimuly a procesy ve svém okolí a pokud dochází

ke stimulaci líhnutí nebo degradaci, tak obvykle u obou vajíček současně. Zjevná synchronizace vývoje byla nalezena pro *Daphnia obtusa* z efemerních kaluží (Hotový & Petrusek in press), kdy 60% sourozeneckých vajíček hrotnatek se líhlo během 48 hod.

Kombinované kategorie tvořily vždy menšinu z celkového množství efípií. Z nich nejpočetnější byla kategorie YN, následovaná AN. Lze předpokládat, že pokud se druhé vajíčko neodlíhne krátce po prvním, brzy dochází k jeho degradaci, protože v pootevřeném efípiu je lépe přístupné pro mikroorganismy (analogicky s pokusy testujícími líhnutí – obnažená vajíčka se méně líhla Cavarlho & Wolf 1989, a byla snáze přístupná degradaci Cousyn & De Meester 1998). Nejméně běžnou byla kategorie YA, Hotový a Petrusek (in press) podíl kategorie YA odhadují maximálně na 12 %.

Trend ve změně frekvencí výskytu jednotlivých kategorií s hloubkou sedimentu byl nalezen v hrázových sedimentech. V horní vrstvě sedimentu byl vyšší podíl kategorie YY pocházející pravděpodobně z nové produkce efípií. Ta má na nádržích bimodální charakter, následuje zpravidla po nárůstu řas (Alekseev & Lampert 2001) v období mezi květnem a červnem, a pak na podzim během září až listopadu (Wolf 1987, Cáceres 1998, Jankowski & Straile 2003) Jarní produkce je obvykle vyšší, obě várky se svými vlastnosti a schopností líhnutí neliší (Rossi *et al.* 1998). V hlubších vrstvách sedimentu sledovaných nádrží se zvýšil podíl efípií s abortovanými vajíčky, zatímco podíl prázdných zůstal stejný. V sedimentu tedy dochází k relativně rychlé degradaci.

Lze předpokládat, že v hrázovém sedimentu působí na efípia všech přehrad během sezóny podobné teplotní a kyslíkové podmínky, zatímco přítok každé nádrže je značně individuální. Různorodost stavu efípií v přítoku a hlubokého přítoku pak není překvapivá. Ve Víru (HP) a Žluticích (P, HP) byl mnohem vyšší podíl vajíček YY (ve všech vrstvách) než u hráze. Je pravděpodobné, že rychlost ukládání sedimentu pohřbívá vajíčka poměrně rychle, že „nestihnou“ degradovat. Naproti tomu podobnou sedimentační rychlost lze očekávat i na Seči, kde ale vajíčka v efípiích chyběla. Pokud to není způsobeno nedostatkem samců a efípia nejsou už v době vzniku prázdná (Zaffagnini 1987), dochází zde k velmi rychlému líhnutí. Na Vranově byla v HP situace obdobná, jen podíl degradovaných vajíček byl ještě vyšší.

Vyšší výskyt degradovaných vajíček v hlubších vrstvách by částečně mohl souviset se skladováním vzorků, protože tyto vrstvy byly zpracovávány později. De Stasio (1989) a Faustová *et al.* (2004) však vliv doby skladování (přibližně po dva roky) na zachovalost trvalých vajíček nepovažují za významný.

Zachovalost efípií je pro hrázové oblasti sledovaných přehrad universální charakteristikou, v horní části nádrže je stav efípií individuální záležitostí. Obě vajíčka jsou

ve stejném stavu ve většině efípií. S (pravděpodobným) stářím sedimentu klesá podíl dobře zachovalých vajíček.

4. Druhové složení efípií a porovnání s populací ve vodním sloupci

Ačkoliv jsou sledované nádrže dimiktické a relativně průtočné, společenstvo perlooček je zde stabilní a během dvou sledovaných let byly nalezeny podobné trendy v distribuci komplexu *D. longispina*. Společenstvo ve vodním sloupci vykazovalo průkazně větší variabilitu mezi stanovišti v jednom roce (H x P) než mezi dvěma roky odběrů (2004 x 2005). Výrazná variabilita mezi stanovišti byla nalezena také v bance vajíček.

Určité taxony vykazovaly afinitu k určitým oblastem. *Daphnia longispina* byla nalezena minoritně v přítokové oblasti pouze na Žlutících, jinak se vyskytovala především v hrázové oblasti (Brno a Žlutice, minoritně Vír a Vranov). *D. cucullata* byla dominantní v přítoku Brna a Vranova, významný podíl tvořila na Seči a Víru, zcela chyběla ve Žlutících. V hrázové oblasti nádrží tato hrotnatka tvořila maximálně několik procent společenstva, v efípiích byl její podíl významnější pouze na Víru a Vranově. Z toho vyplývá, že distribuce druhů v nádrži není homogenní a ani náhodná (Sedša *et al.* in press)

Přestože variabilita mezi roky není zcela zásadní, porovnání druhového složení banky vajíček, která minimálně v hrázové oblasti akumuluje faktor času, a jednorázově za sezónu vzorkovaným složením společenstva má částečně sníženou vypovídající hodnotu. Přesto lze říci, že druhové složení v přítoku souhlasilo na více nádržích (Brno, Seč, Žlutice) než u hráze (Brno a Seč). Celkově nejpodobnější složení aktivního a dormantního společenstva bylo na Seči. Rozdílnost druhového složení obou společenstev může být způsobena různou produktivitou efípií (Cáceres 1998) nebo různou schopností líhnutí druhů, tj. že líhnutí není vzhledem k celkové diversitě proporcionální (Cavarlho & Wolf 1989, Jankowski & Straile 2003).

Hybridní jedinci byli nalezeni na všech studovaných přehradách. Značně vyšší podíl kříženců v efípiích než ve vodním sloupci byl nalezen v Brně P (podíl hybridů zde může být nadhodnocen kvůli nízkému počtu určených efípií) a na Seči HP. Ani na jedné lokalitě nebyli hybridi příští rok nijak významní, lze tedy spekulovat o jejich nižší schopnosti líhnutí (Pfrender & Deng 1998, Schwenk *et al.* 2001).

Naopak výrazně nižší podíl hybridů v efípiích než ve vodním sloupci byl nalezen u hráze Vranova a Žlutic, v obou případech se jednalo o *D. galeata* x *D. longispina*. Podmínky ve vodním sloupci evidentně favorizovaly intermediální hybridní klon v kompetici s mateřskými liniemi (Spaak & Hoekstra 1995) a znásobeným partenogenetickým způsobem rozmnožování (Hebert 1985). Zatímco populace křížence

na Vranově byla po oba roky stejná, na Žluticích byl po jednom roce nahrazen rodičovskou *D. longispina*.

Rozdíl v současném výskytu hybridů v efípiích a vodním sloupci byl nalezen na čtyřech stanovištích. Pouze v jediném případě byl tento „taxon navíc“ nalezen v efípiích. Častější výskyt hybridů v aktivním společenstvu lze vysvětlit odhlíhnutím hybridů do vodního sloupce, jejich dlouhodobé udržování ve společenstvu partenogenezí (Schwartz & Hebert 1987) a případně také nerovnoměrností povrchu sedimentu a efípií v něm uložených (Brendock & De Meester 2003), kdy nalezení výrazně minoritního taxonu může být ovlivněno náhodou.

Prostorová variabilita mezi stanovišti (přítok versus hráz) hraje významnější roli druhovém složení společenstev než variabilita časová. Tento trend byl shodný pro aktivní i dormantní populaci.

*Na každé přehradě byly nalezeny alespoň 3 taxony druhového komplexu *D. longispina*. *D. cucullata* byla častěji nalézána v přítokové oblasti, zatímco *D. longispina* v hrázové oblasti. Hybridi byli nalezeni na všech přehradách, jejich početnost v efípiích v porovnání se zastoupením ve vodním sloupci se lišila.*

5. Velikostní složení efípií

Rozdíly mezi délkou efípií druhového komplexu *Daphnia longispina* mezi horní a dolní částí nádrže byly nalezeny na přehradách Brno, Vír a Vranov – všechny tyto přehrady v přítoku vykazovaly značný podíl *Daphnia cucullata*. Právě tento taxon je společně s hybridem *D. cucullata* x *D. galeata* průkazně menší než všechny ostatní druhy. Schwenk *et al.* (2001) uvádí, že hybridní jedinci *D. cucullata* x *D. galeata* se velikostně a vzhledově více podobali *D. galeata*, na sledovaných přehradách se ale hybrid velikostně více blížil menšímu rodičovskému druhu. Délky efípie nelze použít jako jediného kritéria rozlišení taxonomické příslušnosti (jako např. Cavarlho & Wolf 1989), protože dochází k překryvu kategorií délek s ostatními taxony (především *D.galeata*).

Pro druh *Daphnia galeata* byl otestován vliv longitudinálního gradientu přehrad Vír a Žlutice na délku efípie. Délka tohoto druhu nebyla průkazně odlišná mezi hrází a přítokem, a to především na Žluticích. Na Víru byla efípie v horní části přehrady menší, což je dáno pravděpodobně sdílením niky s *D. cucullata* a tedy tlakem na zmenšení velikosti.

Významným faktorem velikostní selekce jsou v nádržích ryby. Velikost efípie souvisí s velikostí těla mateřské hrotnatky (Jankowski & Straile 2003) a ryby selektivně loví větší jedince (Mellors 1975). Při vysokém predáčním tlaku dominují malé druhy

perlooček (Jeppesen *et al.* 2002). Vyšší míra predace je v přítokových částech nádrže (Vašek *et al.* 2003). Pokud je tedy přítok Brna, Víru a Vranova osídlen drobnou perloočkou *D. cucullata*, indikuje to mimo jiné vyšší rybí obsádku.

Pokud budeme délku efípie považovat za taxonomicky specifickou, minimálně pro odlišení *D. cucullata* a jejího hybridu od ostatních taxonů druhového komplexu *D. longispina*, pak lze porovnáním výběru druhově určených efípií se všemi nalezenými odhadovat, zda druhově určená efípie jsou reprezentativní pro dané stanoviště. Nalezený statisticky významný rozdíl poukazuje na to, že druhové určení efípií nemusí nutně neodpovídat původnímu složení banky vajíček a že k výše diskutovanému selektivnímu líhnutí pravděpodobně dochází.

Rozdíly mezi délkou efípií druhového komplexu Daphnia longispina mezi horní a dolní částí nádrže byly nalezeny na některých přehradách. Tento rozdíl souvisí s druhovým složením společenstva, protože Daphnia cucullata a hybrid D. cucullata x D. galeata jsou menší než ostatní taxony.

VII. ZÁVĚRY

Zvodnění a ztráta žíháním sedimentu je vyšší v hrázové oblasti. Přítok je významně ovlivněn ukládáním písčitého materiálu.

Počet efípií v horní části nádrže je nižší než v dolní části, i malý posun směrem ke hrázi vede ke zvýšení množství efípií v sedimentu. Určující je pravděpodobně vliv přítoku, rychlost ukládání materiálu a velikost populace ve vodním sloupci.

Zachovalost efípií hrázových oblastí sledovaných přehrad si byla podobná, zatímco v horní části nádrže je stav efípií individuální záležitostí.

Prostorová variabilita mezi stanovišti (přítok versus hráz) hraje významnější roli druhovém složení společenstev než variabilita časová. Tento trend byl shodný pro aktivní i dormantní populaci.

Na každé přehradě byly nalezeny alespoň 3 taxony druhového komplexu *D. longispina*. *D. cucullata* byla častěji nalézána v přítokové oblasti, zatímco *D. longispina* v hrázové oblasti. Hybridí byli nalezeni na všech přehradách, jejich početnost v efípiích v porovnání se zastoupením ve vodním sloupci se lišila.

Rozdíly mezi délkou efípií druhového komplexu *Daphnia longispina* mezi horní a dolní částí nádrže byly nalezeny na některých přehradách. Tento rozdíl souvisí s druhovým složením společenstva, protože *Daphnia cucullata* a hybrid *D. cucullata* x *D. galeata* jsou menší než ostatní taxony.

VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

odkazy označené * jsou citovány z abstraktu

- Alekseev V. R. & Lampert W. (2001): Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature* 414: 899-901
- Benzie J. A. H. (2005): The genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*) (Anomopoda: Daphniidae). Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands 376 p.
- Brandl Z., Desortová B., Hrbáček J., Komárková J., Vyhnálek V., Sed'a J. & Straškraba M. (1989): Seasonal changes of zooplankton and phytoplankton and their mutual relations in some Czechoslovak reservoirs. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 33: 597-604
- Brendonck L. & De Meester L. (2003): Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia* 491: 65-84
- Cáceres C. E. (1998): Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology* 79(5): 1699-1710
- Carvahlo G. R. & Hughes R. N. (1983): The effect of food availability, female culture density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna*. *Freshwat. Biol.* 13: 37-46
- Carvahlo G. R. & Wolf H. G. (1989): Resting eggs of lake - *Daphnia* I. Distribution, abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediment. *Freshwat. Biol.* 22: 459-470
- Cousyn C. & De Meester L. (1998): The vertical profile of resting egg banks in natural populations of the pond-dwelling cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 52: 127-139
- De Stasio B. T. Jr. (1989): The seed bank of the freshwater crustacean: Copepodology for the plant ecologist. *Ecology* 70(5): 1377-1389
- Edmondson W.T. (1955): The seasonal life history of *Daphnia* in an arctic lake. *Ecology* 36 (3): 439-455
- Faustová M., Petrusek A. & Černý M. (2004): Status of *Daphnia* resting egg bank in Bohemian Forest Lakes affected by acidification. *Hydrobiologia* 526: 23-31

- Ferrari D. C. & Hebert P. D. N. (1982): The induction of sexual reproduction in *Daphnia magna*: genetic differences between arctic and temperate populations. *Can. J. Zool.* 60: 2143-2148
- Fryer G. (1996): Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia* 320: 1-14
- Hairston N. G. Jr. (1996): Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.* 41(5): 1087-1092
- Hairston N. G. Jr., Van Brunt R. A., Kearns C. M. & Engstrom D. R. (1995): Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology* 76(6): 1706-1711
- Hairston N. G. Jr. & De Stasio B. T. Jr. (1998): Rate of evolution slowed by a dormant propagule pool. *Nature* 336: 239-242
- Hebert P. D. N. & Crease T. J. (1980): Clonal coexistence in *Daphnia pulex* (Leydig): Another planktonic paradox. *Science* 207: 1363-1365
- Hebert P. D. N. & Taylor D. J. (1997): The future of cladoceran genetics - methodologies and targets. *Hydrobiologia* 360: 295-299
- Hebert P. D. N. (1984): Interspecific hybridization between cyclic parthenogens. *Evolution* 39(1): 216-220
- Hobæk A., Skage M. & Schwenk K. (2004): *Daphnia galeata* X *D. longispina* hybrids in western Norway. *Hydrobiologia* 526: 55-62
- Hotový J., Petrušek A.: Resting stage density and hatching of two cladoceran species from small ephemeral waters. *Fundamental and Applied Limnology*, in press.
- Hrbáček J., Albertová O., Desortová B., Gottwaldová V. & Popovský J. (1986): Relation of the zooplankton biomass and share of large Cladocerans to the concentration of total phosphorus, chlorophyll-a and transparency in Hubenov and Vrchlice reservoirs. *Limnologica* 17 (2): 301-308
- Jankowski T. & Straile D. (2003): A comparison of egg bank and long-term plankton dynamics of two *Daphnia* species, *D. hyalina* and *D. galeata*: Potentials limits of reconstruction. *Limnol. Oceanogr.* 48(5): 1948-1955
- Jeppesen E., Jensen J. P., Amsinck S., Landkildehus F., Lauridsen T. & Mitchell S. F. (2002): Reconstructing the historical changes in *Daphnia* mean size and planktivorous fish abundance in lakes from size of *Daphnia* ephippia in the sediment. *J. Paleolim.* 27: 133-143

- * Kearns C. M., Hairston N. G. Jr. & Kesler D. H. (1996): Particle transport by benthic invertebrates: its role in egg bank dynamics. *Hydrobiologia* 332: 63-70
- Kleiven O. T., Larsson P. & Hobæk A. (1992): Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* 65: 197-206
- Marcus N. H. & Schmidt-Gengenbach J. (1986): Recruitment of individuals into the plankton: The importance of bioturbation. *Limnol. Oceanogr.* 31(1): 206-210
- Marková S., Černý M., Rees D. J. & Stuchlík E. (2006): Are they still viable? Physical conditions and abundance of *Daphnia pulicaria* resting eggs in sediment cores from lakes in the Tatra Mountains. *Biologia* 61(18): 135-146
- May L. (1986): Rotifer sampling - a complete species list from one visit? *Hydrobiologia* 134: 117-120
- Mellors W. K. (1975): Selective predation of ehippial *Daphnia* and the resistance of ehippial eggs to digestion. *Ecology* 56: 974-980
- Mergeay J., Verschuren D. & De Meester L. (2005a): *Daphnia* species diversity in Kenya, and a key to the identification of their ehippia. *Hydrobiologia* 542: 261-274
- * Mergeay J., Verschuren D. & De Meester L. (2005b): Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa. *Limnol. Oceanogr.* 50(4): 1278-1283
- Moritz C. (1987): A note on the hatching and viability of *Ceriodaphnia* ehippia collected from the lake sediment. *Hydrobiologia* 145:309-314
- * Nilssen J.P., Hobæk A., Petrusek A. & Skage M.: Restoring *Daphnia lacustris* G.O. Sars, 1862 (Crustacea, Anomopoda) – a cryptic species in the *Daphnia longispina* group. *Hydrobiologia*. In press
- Petrusek A., Faustová M. & Černý M. (2003): *Daphnia* resting eggs in the sediment of Bohemian Forest lakes: an evidence for sediment disturbance. *Silva Gabreta* 9: 71-80
- Pfrender M. E. & Deng H. (1998): Environmental and genetic control of diapause termination in *Daphnia*. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 52: 237-251
- Rossi V., Rossetti G., Benatti M., Menozzi P. & Ferrari I. (1998): Ehippial eggs and dynamics of the clonal structure of *Daphnia longispina* (Crustacea: Cladocera) in a mountain lake (Lago Scuro Parmense, Northern Italy). *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 52: 195-206

- Sed'a J., Petrusek A. Macháček J. & Šmilauer P.: Spatial distribution of the *Daphnia longispina* species complex and other planktonic crustaceans in the heterogeneous environment of canyon-shaped reservoirs. J. Plankton. Res. in press
- Schwartz S. S. & Hebert P. D. N. (1987): Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshwater Biology* 17: 373-379
- Schwenk K., Bijl M. & Menken S. B. J. (2001): Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia* 442: 67-73
- Schwenk K., Posada D. & Hebert P. D. N. (2000): Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1833-1842
- Schwenk K., Sand A., Boersma M., Brehm M., Mader E., Offerhaus D. & Spaak P. (1998): Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquat. Ecol.* 32: 37-51
- Skage M., Hobaek A., Ruthová S., Keller B., Petrusek A., Sed'a J. & Spaak P.: Intra-specific rDNA-ITS restriction site variation and an improved protocol to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia*, in press
- Spaak P. (1997): Hybridization in *Daphnia galeata* complex: are hybrids locally produced? *Hydrobiologia* 360: 127-133
- Spaak P. & Hoekstra J. R. (1995): Life history variation and the coexistence of *Daphnia* hybrid with its parental species. *Ecology* 76(2): 553-564
- Taylor D. J., Sprenger H. L. & Ishida S. (2005): Geographic and phylogenetic evidence for dispersed nuclear introgression in a daphniid with sexual propagules. *Mol. Ecol.* 14: 525-537
- Vandekerkhove J., Louette G., Brendonck L. & De Meester L. (2005): Development of cladoceran egg banks in new and isolated pools. *Arch. Hydrobiol.* 162(3): 339-342
- Vašek M., Kubečka J. & Sed'a J. (2003): Cyprinid predation on zooplankton along the longitudinal profile of canyon-shaped reservoir. *Arch. Hydrobiol.* 156 (4): 535-550
- Wolf H. G. (1987): Interspecific hybridization between *Daphnia hyalina*, *D. galeata* and *D. cucullata* and seasonal abundances of these species and their hybrids. *Hydrobiologia* 145: 213-217

Zaffagnini F. (1987): Reproduction in *Daphnia*. In: Peters, R.H. & de Bernardi, R. (eds):
Daphnia, Mem. Ist .Ital. Idrobiol. 45: 245-284