

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Fakulta rybářství a ochrany vod**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce  
**Tolerance raka mramorovaného vůči zvýšené salinitě vody**

**Autor:** Bc. Vladimír Hrbek, DiS.

**Vedoucí bakalářské práce:** Ing. Antonín Kouba, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** Ing. Lukáš Veselý

**Studijní program:** Zemědělská specializace

**Studijní obor:** Rybářství a ochrana vod

**Forma studia:** Kombinovaná

**Ročník studia:** II.

České Budějovice, 2017

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:

Podpis studenta:

.....

Rád bych poděkoval svému vedoucímu diplomové práce Ing. Antonínu Koubovi, Ph.D., i konzultantovi Ing. Lukáši Veselému za vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a informace, korekce a cenné připomínky při vypracovávání této diplomové práce. Dále děkuji všem, kteří se podíleli na realizování praktické části této diplomové práci, zejména Ing. Jitce Hamáčkové, Ing. Andree Lepičové, a členům Laboratoře etologie ryb a raků. V neposlední řadě děkuji i své rodině, která mne podporovala v průběhu mého studia.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projekty CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vladimír HRBEK, DiS.**  
Osobní číslo: **V15N002K**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**  
Název tématu: **Tolerance raka mramorovaného vůči zvýšené salinitě vody**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Sladkovodní ekosystémy jsou velmi náchylné vůči biologickým invazím. Jednou z významných cest introdukcí je i akvaristika. Raci jsou považováni za modelovou skupinu v akvaristice obchodovaných druhů, která se vyznačuje vysokou mírou nebezpečnosti. V evropských vodách je, co do počtu, zastoupení nepůvodních taxonů nad původními druhy raků nejpatrnější. Tato situace je významným rizikem nejen pro původní astakofaunu, ale i dotčené ekosystémy jako celky, neboť je zmiňované nepůvodní druhy dokáží významnou měrou poškozovat. Popisované změny jsou známé napříč evropským kontinentem, jeho východní část však byla dlouhou dobu vědeckou komunitou přehlížena a jako celek byla považována za oblast pro původní druhy relativně bezpečnou (vyskytuje se zde většinová část původního areálu druhového komplexu *Astacus leptodactylus sensu lato* a místního endemita *A. pachypus*). Poslední výzkumy však dokládají, že řada velmi nebezpečných račích druhů je obchodována i v oblasti východní Evropy a začínají se objevovat i první zmínky o jejich etablovaných populacích. Pro řadu nepůvodních druhů tak teplotní charakteristiky regionu nepředstavují významnou bariéru, je však otázkou, zda dokáží, stejně jako některé populace původních druhů, osídlit i unikátní ekosystémy tanních brakických moří - Černého, Azovského a Kaspického moře.

Cílem této diplomové práce bude vypracování literárního přehledu o toleranci raků vůči salinitě obývaného prostředí. Důraz bude kladen na raka mramorovaného *Procambarus fallax f. virginialis*, který je jedním z nejnebezpečnějších a zároveň nejčastěji obchodovaných taxonů v tomto regionu. Rovněž budou provedeny laboratorní experimenty se skupinově drženými samicemi za účelem zhodnocení schopnosti růstu (úspěšného svlékání) a reprodukce v různých salinitách. Jako kontrola poslouží skupina držaná po celé období ve sladké vodě.

Práce bude podpořena projektem CENAKVA II.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 20 stran)**  
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Antonín Kouba, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Lukáš Veselý**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání diplomové práce: **11. listopadu 2016**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2017**

  
v.r. prof. Ing. Otomar Línhart, DrSc.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

Ve Vodňanech dne 11. prosince 2016

## Příloha zadání diplomové práce

### Seznam odborné literatury:

- Austin, C., 1995. Effect of temperature and salinity on the survival and growth of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*). *Freshwater Crayfish* 10:419-426.
- Bissattini, A.M., Traversetti, L., Bellavia, G., Scalici, M., 2015. Tolerance of increasing water salinity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) *J. Crustacean Biol* 35:682-685.
- Casellato, S., Masiero, L., 2011. Does *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) represent a threat for estuarine brackish ecosystems of Northeastern Adriatic Coast (Italy)? *J. Life Sci* 5:549-554.
- Holdich, D.M., Reynolds J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ec* 394-395:11.
- Chucholl, C., 2013. Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biol Invasions* 15:125-141.
- Chucholl, C., Morawetz, K., Gross, H., 2012. The clones are coming - strong increase in Marmorkrebs *Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis* records from Europe. *Aquat Invasions* 7:511-519.
- Kotovska, G., Khrystenko, D., Patoka, J., Kouba, A., 2016. East European crayfish stocks at risk: arrival of non-indigenous crayfish species. *Knowl Manag Aquat Ec* 417:37.
- Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowl Manag Aquat Ec* 413:5.
- Novitsky, R., Son, M., 2016. The first records of Marmorkrebs [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*] (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Ukraine. *Ecol Montenegrina* 5:44-46.
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2014. Risk assessment of the crayfish pet trade based on data from the Czech Republic. *Biol Invasions* 16:2489-2494.
- Perdikaris, C., Kozák, P., Kouba, A., Konstantinidis, E., Paschos, I., 2012. Socio-economic drivers and non-indigenous freshwater crayfish species in Europe. *Knowl Manag Aquat Ec* 404:1.
- Scalici, M., Chiesa, S., Scuderi, S., Celauro, D., Gibertini, G., 2010. Population structure and dynamics of *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) in a Mediterranean brackish wetland (Central Italy). *Biol Invasions* 12:1415-1425.
- Schrimpf, A., Parvulescu, L., Copilas-Ciocianu, D., Petrusek, A., Schulz, R., 2012. Crayfish plague pathogen detected in the Danube Delta - a potential threat to freshwater biodiversity in southeastern Europe. *Aquat Invasions* 7:503-510.

# Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	9
2.1	Rak mramorovaný.....	9
2.1.1	Základní charakteristika druhu a jeho původ.....	9
2.1.2	Způsob rozmnožování.....	10
2.1.3	Rozšíření v Evropě a ve světě.....	10
2.1.4	Cesty zavlečení .....	12
2.1.5	Račí mor.....	13
2.2	Osmoregulace.....	15
2.2.1	Tolerance raků vůči zvýšené salinitě .....	16
2.3	Akvaristický obchod s raky.....	17
3	MATERIÁL A METODIKA.....	20
3.1	Design pokusu .....	20
3.2	Statistická analýza.....	24
4	VÝSLEDKY .....	25
5	DISKUZE .....	28
6	ZÁVĚR .....	33
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	34
8	PŘÍLOHY .....	44
9	ABSTRAKT .....	51
10	ABSTRACT.....	52

# 1 ÚVOD

Po nálezu několika populací partenogeneticky se rozmnožujícího raka mramorovaného ve východní Evropě se naskytla otázka, zda je i tento druh schopen tolerovat zvýšenou salinitu vody a potenciálně tak osídlit unikátní ekosystémy vnitrozemských moří a brakických vod v ústí řek. Kvůli obchodu s akvariijními druhy je zde nezanedbatelné riziko invaze volné přírody, a to především z důvodu úniků či úmyslného vypouštění těchto raků. Oblast východní Evropy je původním areálem pro raka bahenního *Astacus leptodactylus* Eschscholtz a zejména pro další původní druh *A. pachypus* Rathke představuje celý jeho známý areál. Krom sladkovodních ekosystémů obývají tyto původní druhy i prostředí brakické a mořské.

V rámci této práce byl vypracován literární přehled na téma tolerance raků vůči zvýšené salinitě vody. Ta byla prokázána hned u řady druhů. V případě raka mramorovaného však prozatím nebyla hodnocena. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda rak mramorovaný vykazuje toleranci vůči zvýšené salinitě a to na základě hodnocení jeho přežití, růstu a reprodukce při držení v různých úrovních salinity.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Rak mramorovaný

#### 2.1.1 Základní charakteristika druhu a jeho původ

Rak mramorovaný *Procambarus fallax* f. *virginialis* Martin a kol., 2010, v jiných jazycích označován jako Marmokrebs (německy) či Marbled crayfish (anglicky), je rak střední velikosti dorůstající do velikosti 13 cm. Většina jedinců však dosahuje velikosti do 10 cm (Souty-Grosset a kol., 2006). Tento druh je poměrně krátkověký. V laboratorních podmínkách se průměrně dožívá dvou let. Jen desetina jedinců se dožívá více než tři let a nejdéle žijící exemplář tohoto druhu dosáhl věku čtyři a půl roku. (Vogt, 2010).

Tělo raka, jak již jeho název napovídá, je nápadně mramorované na tmavě hnědém, zeleném až namodralém podkladu. Na hlavohruď se nachází jeden pár postorbitálních lišt. Hlavohruď je hladká, podél týlní rýhy se nachází několik trnů (Štambergová a kol., 2009). Výrazné rostrum vyznačující se hladkými okraji tvoří malý trojúhelníkový vrcholek. Střední rýha rostra zcela chybí. Klepeta jsou velmi drobná a slabě granulovaná (Patoka, 2008; Kozák a kol., 2009).

Rak mramorovaný patří do čeledi Cambaridae, jeho nejbližším známým příbuzným je druh *Procambarus fallax* (Hagen) (Martin a kol., 2010). Jeho druhový statut není přesně známý (Vogt a kol., 2015), ale nejčastěji je označován za partenogenetickou formou druhu *Procambarus fallax* (Martin a kol., 2010). Poslední poznatky rovněž naznačují, že rak mramorovaný je triploidním organismem, na rozdíl od druhu *Procambarus fallax*, který je diploidní. To by mohlo naznačovat jeho původ spíše v autopolyploidizaci, než v dříve častěji uváděné hybridizaci (Martin a kol., 2016; Vogt a kol., 2015). Vogt a kol. (2015) oba zmiňované taxony porovnávali a uvádějí, že rak mramorovaný dosahuje signifikantních rozdílů v přírůstku váhy, délce hlavohruďi a produkci vajíček. Druh *Procambarus fallax* je původní v jižních státech USA, zejména ve státech Florida a Georgia (včetně národního parku Everglades; Hendrix a Loftus, 2000; Patoka, 2008). Obývá lotické i lentické vody a často zaplavovaná území, nezřídka

si staví nory (Souty-Grosset a kol., 2006). Naopak původní areál raka mramorovaného není prozatím znám (Martin a kol., 2010).

### **2.1.2 Způsob rozmnožování**

Jak již bylo zmíněno výše, rak mramorovaný se rozmnožuje výhradně apomiktickou partenogenezí, tzn. z neoplozených vajíček se líhnou výhradně samice geneticky totožné s matkou. Samci a potažmo ani sexuální reprodukce nejsou u tohoto taxonu známy. Rak mramorovaný je unikátní tím, že je zatím jediným známým desetinohým korýšem, který se rozmnožuje výhradně partenogeneticky (Scholtz a kol., 2003); fakultativní partenogeneze však byla popsána u raka pruhovaného *Orconectes limosus* (Rafinesque) (Buřič a kol., 2011, 2013). Pohlavní dospělosti dosahuje rak mramorovaný přibližně při velikosti 40 mm, avšak vaječníky a externí pohlavní znaky mohou být vyvinuté již dva měsíce po vylíhnutí ráčat, tj. ve velikosti okolo 20 mm (Patoka, 2008). Raci jsou schopni množení po celý rok, v případě optimálních podmínek se jedná o 8-9 týdenní intervaly. Při teplotě 25 °C začínají samice poprvé klást vajíčka ve věku 25 týdnů, při teplotě 20 °C až po 35 týdnu (Seitz a kol., 2005). Krátká fotoperioda podporuje zrání gonád, naopak dlouhá fotoperioda může být inhibítorem dozrávání pohlavních žláz. Plodnost je závislá na velikosti jedince a pohybuje se od přibližně 50-150 vajíček. Větší samice jsou schopny vyprodukovat více než 270 vajíček (Souty-Grosset a kol., 2006). Vogt (2010) uvádí, že velké samice jsou schopné produkce více jak 400 vajíček během jednoho reprodukčního cyklu. Především v přírodních podmínkách však mohou být plodnosti značné, na úrovni 600 až 700 kusů (Jones a kol., 2009; Chucholl a Pfeiffer, 2010).

### **2.1.3 Rozšíření v Evropě a ve světě**

První nález volně žijícího raka mramorovaného se uskutečnil v listopadu roku 2003 v oblasti Karlsruhe na jihozápadě Německa (Marten a kol., 2004). Jednalo se však pouze o jednoho juvenilního jedince, který byl nalezen v oligotrofní zatopené šterkovně,

kteřá se nachází asi 5 km od řeky Rýn. Následující rok v lednu byla lokalita podrobena dalšímu výzkumu, při kterém již nebyl objeven žádný jedinec raka mramorovaného. Není tedy jasné, jestli se v dané lokalitě vyskytuje populace raka mramorovaného či nikoliv (Chucholl a kol., 2012).

Další jedinci byli nalezeni na území Saska (jihovýchod Německa; Martin a kol., 2010). Na jaře roku 2008 byl rak objeven v Toskánsku (Itálie), konkrétně v Canale Maestro della Chiana, kde se vyskytoval v etablované populaci dalšího amerického druhu - raka červeného *Procambarus clarkii* (Girard) (Marzano a kol., 2009). Další jedinci byli pozorováni v Porto Tolle nedaleko města Benátky (severní Itálie), ve vodním kanálu Po di Maistra (Vojkovská a kol., 2014). Nález ve Skandinávii v roce 2012 odhalily výskyt 13 jedinců v řece Märstaån (Švédsko), která vtéká do jezera Mälaren, což je zároveň třetí největší jezero ve Švédsku. Jedná se o nejsevernější nález ve volné přírodě na Zemi (Bohman a Edsman, 2013; Bohman a kol., 2013). Toto je jen výčet některých záchytů z volné přírody evropského kontinentu. Mnoho z nich se však nepodařilo zpětně ověřit a jejich populační statut tak zůstává neznámý (Chucholl, 2012; Kouba et al., 2014).

Dle očekávání následovalo po záchytech jedinců i potvrzení etablovaných populací raka mramorovaného, a to v roce 2010 v Německu (Chucholl a Pfeiffer, 2010) a na Slovensku (Jánský a Mutkovič, 2010). V červenci roku 2010 v jezeře Moosweiher, které náleží pod horní úsek toku Rýn (Německo), byla zaznamenána etablovaná populace tohoto druhu. Při odchytu bylo získáno 56 jedinců. Na lokalitě se s rakem mramorovaným nalézal i rak pruhovaný (Chucholl a Pfeiffer, 2010). Na Slovensku byl rak mramorovaný nalezen poprvé již v květnu téhož roku nedaleko obce Koplotovce v zatopené štěrkovně (Jánský a Mutkovič, 2010). Od té doby byly na Slovensku objeveny další čtyři populace raka, dvě z nich se nacházejí velice blízko řeky Váh. Třetí populace byla lokalizována v obci Opatovce nad Nitrou v Teplém potoku vlévajícím se do řeky Nitry (Lipták a kol., 2016). Poslední populace se nachází přímo v Bratislavě, kriticky blízko samotnému Dunaji (B. Lipták, osobní sdělení).

Etablovaná populace je známá i z termálního jezera Hévíz a navazujícího povodí nedaleko jezera Balaton v Maďarsku (Lőkös a kol., 2016) a dále i v Chorvatsku (Samardžić a kol., 2014). Další zemí, kde byl rak mramorovaný objeven ve volné přírodě, je Ukrajina. V roce 2015 zde byli raci nalezeni na dvou lokalitách. Několik živých či uhynulých jedinců se vykytovalo v zatopeném lomu ve městě

Dněpropetrovsk. Podle několika místních lidí byli raci přítomni v lomu již v roce 2014. Následující rok pak byly v lomu odchyceny dvě samice s vajíčky. Teplota vody v té době byla pod 10 °C. Druhá lokalita nálezů raků na Ukrajině se nacházela ve městě Oděsa na pobřeží Černého moře. Celkem tři jedinci byli zpozorováni v kaskádě okrasných rybníčků (Novitsky a Son, 2016).

V České republice byl rak mramorovaný objeven na podzim roku 2015 v Praze v parkovém rybníku v Parku přátelství. Další nález 4 samic byl nalezen v severních Čechách, v tůni nacházející se na Radovesické výsypce nedaleko města Bílina. Opakovaný nález několika samic s vyvinutými pohlavními žlázami v Parku přátelství na jaře 2016 naznačuje, že populace je schopná přezimování (Patoka a kol., 2016).

Rak mramorovaný byl již navíc pozorován i v mimoevropských destinacích, např. na Madagaskaru, kde prokazatelně invadoval osm z 22 regionů (Kawai a kol., 2009; Jones a kol., 2009) a v Japonsku (Faulkes a kol., 2012). S ohledem na rozvoj akvaristického obchodu (viz níže) jej však lze očekávat i jinde, například napříč Severní Amerikou, kde byl tento druh uveden na trh v roce 2004 (Faulkes, 2010).

#### 2.1.4 Cesty zavlečení

Patoka a kol. (2014) uvádí, že rak mramorovaný, jakožto hojně obchodovaný, byl klasifikován do kategorie vysoce rizikových druhů. Mezi další hojně obchodované druhy raků v České republice patří rak červený, *Cherax peknyi* Lukhaup a Herbert a *C. quadricarinatus* (von Martens), z nichž rak červený je též zařazen mezi druhy vysoce rizikové. Ostatní dva zmíněné druhy byly zařazeny mezi středně rizikové.

Jelikož je rak mramorovaný velmi běžně dostupný a široce chovaný, lze předpokládat, že jeho rozšíření nejvíce napomáhají samovolné úniky, vědomé vypuštění přemnožených obsádek či vysazování do míst, odkud mohou uniknout, např. ze zahradních jezírek (Chucholl a kol., 2012; Peay, 2009). Tito jedinci se pak dostávají do volné přírody, kde se etablojí a mohou se dále šířit (Patoka, 2008). Raka mramorovaného bylo do nedávna možné běžně zakoupit v obchodech s akvarijními živočichy, či jej nalézt v nabídkách internetových obchodů. Mezi chovateli je stále velmi běžný a dále nabízený (navzdory Nařízení EU č. 1143/2014, potažmo jeho prováděcímu nařízení č. 2016/1141; národní implementace jmenovaných však prozatím

chybí). Tento druh je většinou zároveň levnější než ostatní druhy čeledi Cambaridae (Chucholl, 2013). Díky nenáročnému chovu, partenogenetickému rozmnožování, brzké pohlavní dospělosti, celoročnímu kladení vajíček, vysoké plodnosti a rychlému růstu je složité kontrolovat a redukovat akvariijní populace. Právě to může v řadě případů vést k přesycení trhu a následnému nelegálnímu vypouštění přemnožených jedinců do volné přírody (Novitsky a Son, 2016). Podobná situace však nastává i v případě zákazu oficiálního prodeje těchto raků.

### 2.1.5 Račí mor

Rak mramorovaný je stejně jako ostatní severoamerické druhy raků prokázaným přenašečem račího moru. To se týká jak jedinců držených v akvaristickém obchodě (Mrugała a kol., 2015), tak etablovaných ve volné přírodě (Keller a kol., 2014). Račí mor je plísňové onemocnění, které způsobuje parazitická oomyceta druhu *Aphanomyces astaci* Schikora (Kozubíková a kol., 2008). Tento druh byl zařazen mezi 100 nejhorších invazních druhů na světě (Lowe a kol., 2004). Třída řasovky (*Oomycota*) zahrnuje dva řády spojené s úhyny raků, a to rod *Saprolegnia* a *Aphanomyces*. Druhy z prvního řádu napadají většinou mrtvá vajíčka a skomírající ráčata. Přesto ale mohou napadnout i zdravého dospělého. Pokud má tento navíc poškozenou kutikulu, narůstá rapidně riziko, že onemocnění bude pro jedince letální (Longshaw, 2011).

Co se týče rodu *Aphanomyces*, mohou raka, jakožto hostitele, napadnout tři druhy – *A. astaci* způsobující račí mor, *A. reptans* a *A. frigidophilus*. *Aphanomyces astaci* byl v Evropě poprvé zaznamenán kolem roku 1860 (Longshaw, 2011). Zajímavé na tomto datu je, že se račí mor začal šířit po Evropě již několik desítek let před tím, než byly na kontinent introdukovány americké druhy raků (Svoboda a kol., 2017). Ze Severní Ameriky, kde je *A. astaci* původní, se dostal do Evropy za pomoci člověka. Ten, patrně spolu s americkými raky, kteří se neetablovali, přivezl i račí mor. Severoamerické druhy raků, které jsou proti račímu moru imunní, tak postupem času zdecimovaly evropské původní druhy, které jsou naopak proti tomuto onemocnění velice náchylné. *Aphanomyces astaci* se dál šířil pomocí zoospor, které se uvolňují především z umírajících nebo již mrtvých raků, či jejich exuvií (Svoboda a kol., 2013). Zoospory

mohou přežít ve vodě několik dní, v bahně však i několik týdnů. Při kontaktu s hostitelem pronikají přes kutikulu a infikují ho. Související imunitní reakce raků nepocházejících ze Severní Ameriky je však obvykle příliš pomalá na to, aby dokázala rozvoji onemocnění zabránit (Longshaw, 2011; Svoboda a kol., 2017).

*Aphanomyces astaci* může být přenášen mimo jiné i pomocí rybářského náčiní, kontaminovanými vršemi, transferem infikovaných zvířat a pravděpodobně i predátory, kteří se raky živí. Nicméně existují přípravky, které kontaminované rybářské náčiní, pomůcky k odchytu raků a další vybavení používané v akvakultuře dokáží úspěšně desinfikovat. Mezi nejúčinnější přípravky patří Proxitan<sup>®</sup> a Virkon<sup>®</sup>S. Peroxid vodíku se ukázal být nedostačující k desinfekci výše zmíněného náčiní (Jussila a kol., 2014).

Pârvulescu a kol. (2012) uvádí, že z evropských druhů je nejvíce rezistentní vůči račímu moru rak bahenní. Při výzkumu v Rumunsku byla prokázána přítomnost DNA *Aphanomyces astaci* u nejméně 32 % analyzovaných raků pruhovaných a signálních *Pacifastacus leniusculus* (Dana) a 41 % raků bahenních, kteří spolu v daném toku koexistují.

Račím morem mohou být napadeni i ostatní druhy korýšů, jako je krab říční *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards (Schrimpf a kol., 2014) a krab potoční (*Potamon potamios* (Olivier) (Svoboda a kol., 2014a), který je původní na Blízkém východě. Krab říční je invazní druh původem s Asie, který byl do Evropy zavlečen pravděpodobně lodní dopravou. Zároveň patří mezi velmi rizikové invazní druhy. Je známo, že infikování krabi výše zmíněných druhů mohou nakazit evropské druhy raků, jak bylo prokázáno v případě raka říčního *Astacus astacus* (L.) (Schrimpf a kol., 2014). Podobný scénář lze očekávat při přenosu onemocnění i u raka bahenního (Svoboda a kol., 2012).

Svoboda a kol. (2014b) testovali odolnost dvou sladkovodních asijských druhů krevet *Macrobrachium dayanum* (Henderson) a *Neocaridina davidi* (De Haan) vůči račímu moru. Infikace račím morem proběhla úspěšně u obou druhů. Mortalita v důsledku onemocnění a přenos moru zpět na raky nebyl v této studii testován.

## 2.2 Osmoregulace

K přežití samotné buňky organismu je zapotřebí, aby byla schopna udržovat správnou osmolaritu v jejím intracelulárním prostředí a rovnováhu iontů, jako je draslík, sodík a chloridy. Koncentrace iontů je silně ovlivněna hydratací a celkovou vodní bilancí organismu. V případě, že osmolarita, respektive koncentrace klíčových iontů, není regulována v rámci tolerovaného rozmezí organismu, nastává riziko oslabení a poškození metabolismu až smrt (Randall a kol., 2002).

Osmoregulace v těle raka probíhá především za pomoci antenálních žláz, zažívacího traktu a žaber (Henri a kol., 2012). Majid a Fatemeh (2014) uvádí, že při zvyšující se salinitě vody dochází ke zmenšování buněk antenálních žláz, vztah mezi osmolaritou prostředí a velikostí buněk je tedy signifikantní.

Vodní živočichové se značně liší tolerancí ke změnám salinity obývaného prostředí. Druhy schopné tolerovat velké rozdíly salinit jsou označovány za euryhalinní, zatímco druhy netolerantní ke změnám salinity nazýváme jako stenohalinní. Osmoregulace je komplex akcí zahrnující aktivní příjem nebo aktivní vylučování iontů a regulaci koncentrace vnitrobuněčných aminokyselin. Fyziologické procesy spojené s osmoregulací korýšů zahrnují především regulaci sodíku a chloridů procházející přes žábry. Osmotické koncentrační změny se mění při přechodu iontů z jednoho prostředí do druhého (Walker, 1993).

Sladkovodní raci jsou schopni tolerovat různé podmínky prostředí včetně určité tolerance salinit. Různé úrovně salinit mají dopad na život a vývoj raků. Tolerance vůči salinitě se u raků mění s ontogenetickým vývojem. Juvenilní jedinci jsou obvykle citlivější než raci dospělí. Pokud jsou juvenilové vystaveni i nízké koncentraci soli, hynou v důsledku snížené osmoregulační schopnosti. Holdich a kol. (1997) navíc uvádí, že na rozdíl od juvenilních jedinců jsou vajíčka schopna tolerance zvýšené salinity až do 14 ‰, líhnutí raků však probíhá jen při salinitě pod 7 ‰. To naznačuje, že v období embryonálního vývoje je prostupnost ochranných obalů vajíčka a tudíž i tolerance vůči různým salinitám vyšší, než během líhnutí a raného postembryonálního vývoje.

### 2.2.1 Tolerance raků vůči zvýšené salinitě

Je známo, že některé druhy dokáží velice dobře snášet zvýšenou salinitu. Rak bahenní bez větších problémů dokáže přežít ve zvýšené salinitě až do 28 ‰ (Susanto a Charmantier, 2000). Nad 28 ‰ však 75 % jedinců do dvou týdnů hyne. Samice s vajíčky dokáží taktéž přežít výše zmíněné salinitě, avšak, jak bylo zmiňováno, k líhnutí dochází pouze při salinitách pod 7 ‰. Tolerance vůči výše zmíněným salinitám je velice podobná i pro raka signálního, přičemž Holdich a kol. (1997) uvádí, že rak signální je tolerantnější vůči změnám salinit než rak bahenní.

Rak bahenní se přirozeně vyskytuje jak ve sladké, tak v mořské vodě. Ve vnitrozemských mořích (Kaspickém, Azovském a Černém moři) se prokazatelně vyskytují populace raka bahenního (Souty-Grosset a kol., 2006). Slanomořské populace byly potvrzeny v Iránu (Karimpour a kol., 2011), Ázerbájdžánu, Kazachstánu, Turkmenistánu a Rusku. Rak bahenní byl v těchto zemích popsán jako druh *Pontastacus eichwaldi* (Kouba a kol., 2014).

Dalším velice tolerantním druhem raka vůči salinitě prostředí je *Astacus pachypus*. Tento rak je původní ve dvou evropských zemích (Rusko a Ukrajina). Jeho výskyt byl však potvrzen taktéž v Ázerbájdžánu, Kazachstánu a Turkmenistánu. *Astacus pachypus* se vyskytuje ve sladké, brakické až mořské vodě. Přirozená distribuce populací tohoto raka je vázána na oblast Kaspického, Azovského a Černého moře, známé jsou ale i sladkovodní populace (Souty-Grosset a kol., 2006; Machino a Holdich, 2006; Kouba a kol., 2014).

V případě experimentu prováděným Bissattini a kol. (2015) bylo zjištěno, že dospělí jedinci raka červeného dokázali přežít v koncentraci solí až 35 ‰, přičemž však pouze jediný rak byl schopen úspěšného svlékání (ekdyze). Žádný rak však během 54 denní expozice nezahynul. Závislosti ekdyze raka červeného na zvýšené salinitě vody si všiml již Perry (1971), kdy 20 % raků bylo schopných svleku při salinitě 0 – 10 ‰, 12,5 % raků při 20 ‰ a pouhých 2,5 % při 30 ‰. Casellato a Masiero (2011) uvádí, že rak červený je ve zvýšené salinitě vody (až 25 ‰) schopen mimo svlékání i reprodukce.

Reprodukce a přežití ve zvýšené salinitě (3 a 7 ‰) je schopen i rak pruhovaný. Úspěšnost reprodukce byla 100 % v obou koncentracích. Mortality 50 % juvenilních jedinců však bylo dosaženo během 5 týdnů v obou koncentracích (Jaszczolt a Szaniawska, 2011).



Co se týče dalších amerických druhů raků, konkrétně rodu *Orconectes*, bylo zjištěno, že druhy *Orconectes rusticus* (Girard) a *Orconectes propinquus* (Girard) tolerují salinity až do 15 ‰ bez znatelných ztrát, kdy oba druhy byly schopné osmoregulace a aktivního pohybu. Nad hodnoty 30 ‰ však dochází u obou zmíněných raků k signifikantní mortalitě. Experimentální skupina druhu *O. rusticus* vykazovala pouze 17% přežití při těchto koncentracích solí. *Orconectes propinquus* byl v tomto případě odolnější a dokázal přežít z 50 % (Bazer a kol., 2016).

Z čeledi Parastacidae jsou druhy rodu *Cherax* taktéž schopny přežít vyšší salinitu vody. Jedná se především o raka ničivého *Cherax destructor* Clark (Mills a Geddes, 1980) a *C. quadricarinatus* (Anson a Rouse, 2007). Dospělí i juvenilní jedinci raka ničivého dokáží přežít při salinitě až 25 ‰, a do 12 ‰ nevykazují žádné změny v chování (Mills a Geddes, 1980). Rak druhu *C. quadricarinatus* je z pohledu salinity vody taktéž velmi odolným druhem. Je schopen krátkodobě přežít při salinitě 25 ‰, přičemž nad 25 ‰ vykazuje až 70 % mortalitu. Při salinitě 25-35 ‰ je u tohoto druhu znatelné snížení celkové aktivity a příjmu potravy. Jedinci při těchto koncentracích během několika dní až týdnů přestávají přijímat potravu a ztrácí únikové reflexy, respektive jejich aktivní pohyb je velice zpomalen (Prymaczok a kol., 2008). Po třech týdnech experimentu bylo při 12‰ salinitě zaznamenáno 100% přežití exponovaných jedinců (Jones, 1997). V případě juvenilních jedinců však tolerance na zvýšenou salinitu signifikantně klesá. Zvýšená mortalita je patrná již při koncentracích solí nad 5 ‰. Nad tuto hodnotu klesá i frekvence svlékání, respektive rychlost růstu, a přírůstek hmotnosti (Meade a kol., 2002). Austin (1995) uvádí, že juvenilní jedinci byli schopni přežít po dobu 12 týdnů i při salinitě 14 ‰, přičemž vykazovali velice nízkou úmrtnost.

### **2.3 Akvaristický obchod s raky**

Akvaristický obchod s raky rapidně vzrostl v posledních desetiletích (Faulkes, 2010). Významná část světových druhů raků je nyní dostupných a hojně se s nimi obchoduje. Tento nárůst obchodu a šíření druhů po celém světě výrazně zvyšuje riziko úniku a osídlení přírodních stanovišť nepůvodními druhy raků (Faulkes, 2015). Německo, se současně 28 dostupnými nepůvodními druhy raků na trhu (Chucholl a

Wendler, 2016) a Česká republika s 27 druhy, se řadí mezi evropské velmoci s akvariijním trhem raků (Patoka a kol., 2014).

Trh s raky je považován za velice významnou cestu zavlečení a následného šíření nepůvodních druhů raků do volné přírody. Rak mramorovaný je jeden z nejvíce obchodovaných a zároveň vysoce rizikových druhů raků na světě (Patoka a kol., 2014). Atraktivní zbarvení, nenáročný chov a výjimečné reprodukční vlastnosti činí z tohoto druhu velmi často chovaný druh korýše mezi akvaristy (Souty-Grosset a kol., 2006). Spíše omezená velikost raka mramorovaného je pro akvaristy také výhodou, ať již z důvodu možnosti chovu v menších akváriích, či držení početnějších obsádek. Raci menšího vzrůstu jsou vhodné i z hlediska méně častých útoků na rybí obsádky držené ve společném akváriu (Faulkes, 2013).

Pravděpodobně všechny záznamy o volně žijících raků mramorovaných ve volné přírodě jsou výsledkem úniku tohoto druhu z akvariijních chovů (Souty-Grosset a kol., 2006; Chucholl a Pfeiffer, 2010). Je také velmi pravděpodobné, že prostřednictvím mezinárodního trhu a osobních kontaktů mezi akvaristy se rak mramorovaný dostal z Evropy i na další odlehlá místa, jako je Japonsko či Madagaskar (Faulkes, 2010).

Faulkes (2010) při svém výzkumu zjistil, že dostupnost raka mramorovaného v USA rapidně vzrostla po roce 2007. Dvě třetiny (30 ze 45) tázaných majitelů, tohoto raka pořídilo v obchodě s akvariijními druhy. Přes internet raka mramorovaného pořídila třetina chovatelů. Chucholl (2013) prezentuje raka mramorovaného jako jednoho z nejlevnějších a nejdostupnějších druhů raků na trhu. Pořídit se dá přibližně za 5 €/kus. Patoka a kol. (2015) uvádí, že je možné tento druh zakoupit výrazně levněji. Na českém trhu se jedinci menšího vzrůstu (2-3 cm) prodávají za necelé 1 €/kus, větší jedinci (5-6 cm) se prodávají za 2-3 €/kus. Takto nízká cena je dána především tím, že se jedná o domácí produkci.

Kromě již zmiňovaného Německa (Chucholl a Wendler, 2016) a České republiky (Patoka a kol., 2014), se hodnocení trhu s raky uskutečnilo i v Řecku (Papavlasopoulou a kol., 2014), Itálii (Tricarico a kol., 2010), Turecku (Turkmen a Karadal, 2012) a na Slovensku (Lipták a Vitázková, 2015).

Oblast východní Evropy byla dlouho považována za bezpečnou z hlediska šíření nepůvodních druhů raků (Perdikaris a kol., 2012, Kouba a kol., 2014) a problematika akvaristického obchodu s raky, ale i nepůvodních raků obecně, byla notně přehlížena. Nález dvou populací raka mramorovaného v městských oblastech Oděsy a

Dnětropolrovsku z roku 2015 vřak tento nřhled vřznamnř zmřnil (Novitsky a Son, 2016). Obchodem s raky na Ukrajinř se zabřvali Kotovska a kol. (2016), kdy zjistili, ře se zde obchoduje celkem s patnřcti nepřvodnřmi druhy rakř. Prřzkum zahrnoval obchody a trhy s akvarijnřmi řivořichy ve mřstech Odřsa, Kyjev, Charkov a Dnětropolrovsck. Samotnř prřzkum nezahrnoval fyzickř osoby, respektive akvaristy samotnř. Rak mramorovanř, spolu s dalřmi třemi druhy, byl klasifikovan řa velice břřnř prodřvanř druh, tzn., ře tento druh je dostupnř na trhu vřdy a v hojnř mřře.

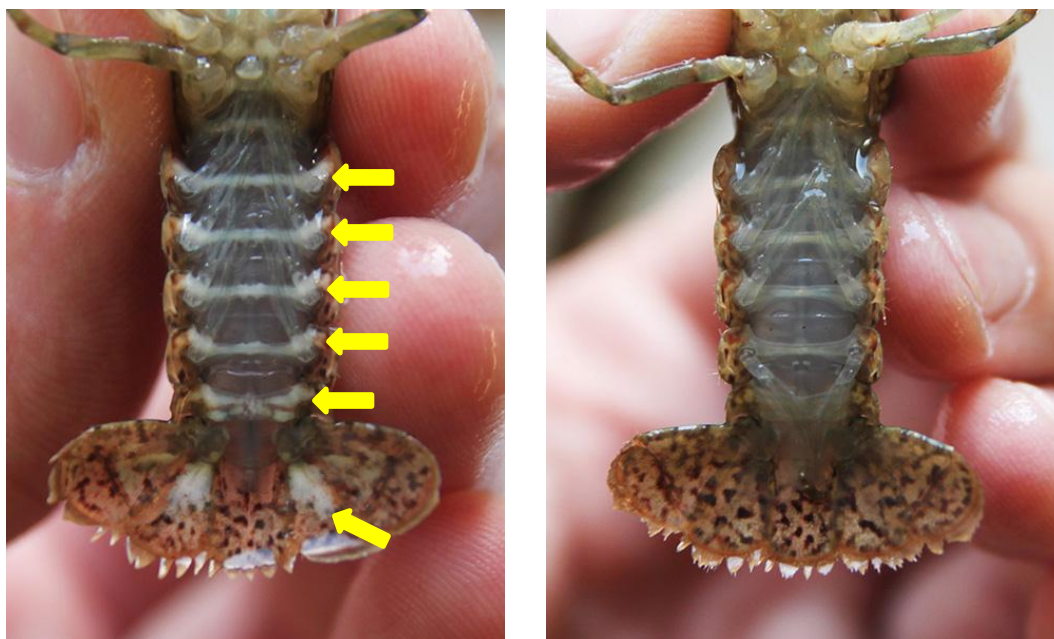
Prřzkum akvaristickřho trhu s raky byl uskutečněn i v Rusku. Ten se zabřval předevřim obchodem ve mřstř Astrachaň, kterř leři v deltř řeky Volha. Mřsto se nachřzi v třsnř blřzkosti pobřři Kaspickřho moře. Prřzkum zahrnoval jeden velkoobchod, 4 obchody s akvarijnřmi řivořichy a tři mřstnř chovatele rakř. Ukřzalo se, ře mřstnř trh s raky zahrnuje 12 nepřvodnřch druhř, patřici do řeledi Cambaridae a Parastacidae. Z hlediska přvodu, dostupnosti na trhu, mořnosti nakařenř rařim morem, invazivnosti a dalřich faktorř bylo identifikovanř nřkolik nepřvodnřch druhř, vřetnř raka mramorovanřho (Vodovsky a kol., 2017).

Vřchodnř Evropa představuje celř, ři alespoň vřřsinovř areřl přvodnřho rozřřenř druhř rakř patřici do rodu *Astacus*, předevřim se jednř o druh *A. pachypus* (Kouba a kol., 2014). Vřskyt raka mramorovanřho na Ukrajinř (Novitsky a Son, 2016), stejnř jako prřzkum vřchodoevropskřch trhř s raky (Kotovska a kol., 2016; Vodovsky a kol., 2017), vyvolal obavy z nepřvodnřch druhř rakř ve smyslu potenciřlnřho negativnřho ovlivnřnř populaci přvodnřch druhř rakř, ale i jedinečných ekosystřmř Azovskřho, Černřho a Kaspickřho moře a jejich přřtokř.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Design pokusu

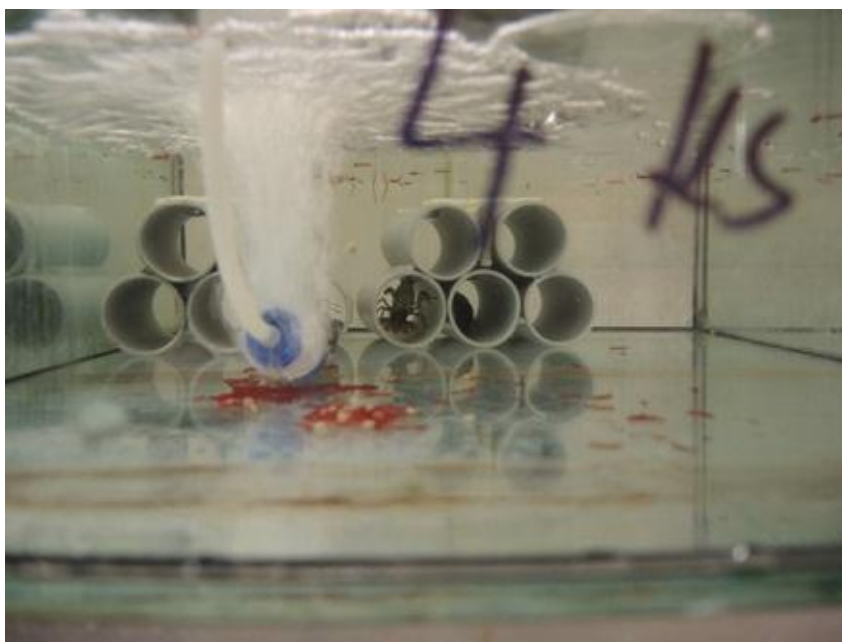
Celkem 60 samic raka mramorovaného *Procambarus fallax* f. *virginalis* Martin a kol., 2010 bylo nasazeno dne 16. 5. 2016 do 12 neprůtočných akvárií o vnitřních rozměrech 35,5 x 29 x 53,5 cm (šířka x výška x hloubka) zakrytých plastovou deskou. Objem vody byl stanoven na 16 litrů na nádrž. Raci pocházeli z vlastního experimentálního odchovu drženého na Experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH) ve Vodňanech, kde probíhal rovněž i tento experiment. Do každé nádrže bylo umístěno 5 samic, z nichž vždy dvě měly patrně vyvinuté sekreční žlázy ventrálně po stranách abdomenu a ocasním vějíří („glair glands“), což indikuje pohlavní zralost a předpoklad brzké ovulace.



Obr. 1: Vlevo samice raka mramorovaného s vyvinutými sekrečními žlázami (šipky), vpravo samice bez vyvinutých žláz.

Pokusné nádrže byly vybaveny nadbytkem úkrytových možností. Jednalo se o dva bloky pěti splených PVC trubek o délce 10 cm a vnitřním průměru 3,5 cm (viz Obr. 2).

Akvária byla aerována vzduchovacími kameny. Fotoperioda byla řízená – světlo:tma 12:12 hod. Místnost byla klimatizována na 21 °C. Teplota vody byla registrována čidly Minikin (Environmental Measuring Systems, Brno, Česká republika) s hodinovým záznamem, přičemž během pokusu dosahovala hodnot (průměr ± SD) 20,6±0,7 °C. Saturace kyslíkem byla vždy vyšší než 90 %.



Obr. 2: Čelní pohled na akvárium s úkryty.

Vlastní experimentální ošetření byla představována kontrolní skupinou odchovávanou po celou dobu ve sladké vodě (obsah iontů ve zdrojové vodě je uveden v Tab. 1) a pěti skupinami se zvýšenou salinitou prostřednictvím přidavku chloridu sodného. Při dvanácti nádržích a šesti ošetřeních tak byla každá varianty testována ve dvou opakováních.

Vzhledem ke specifickým rozdílům zastoupení jednotlivých iontů v mořích byl experiment založen pouze na použití NaCl p.a. (Penta s.r.o.), jakožto iontech, které jsou v mořích obvykle dominantní. Rozsah testovaných salinit (6, 9, 12, 15 a 18 ‰) je odvozen od specifických podmínek cílové oblasti a je také dán kontinentálním kontextem. Průměrná salinita v Azovském moři je 10-12 ‰, v Kaspickém moři 12-13 ‰ a v Černém moři 17-18 ‰ (Berdnikov a kol., 1999; Jazdzewski a Konopacka, 2002; Pourkazemi, 2006). Jaszczolt and Szaniawska (2011) zaznamenali úspěšnou reprodukci

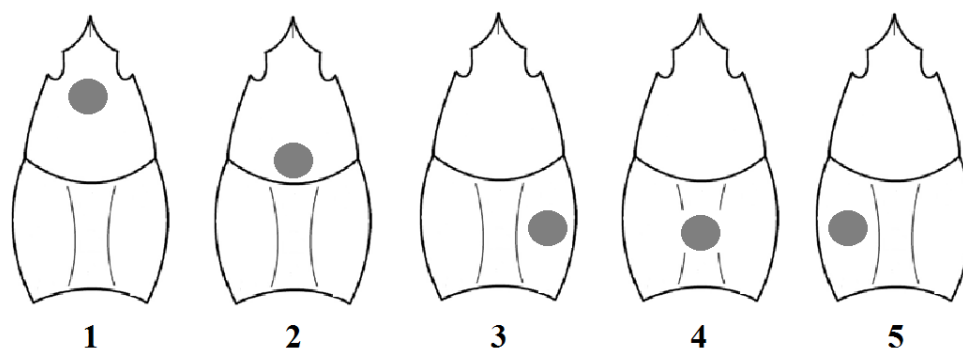
raka pruhovaného v Polsku v brakických vodách Baltského moře o salinitě 7 ‰. Proto jsou testované salinity relevantní jak pro výše zmíněná moře, tak i ústí řek obecně.

Tab. 1: Koncentrace iontů v užití pitné vodě vyjádřené v  $\text{mg.l}^{-1}$  (není-li uvedeno jinak). Rozbor byl realizován v akreditované laboratoři AGRO-LA, spol. s r.o. v Jindřichově Hradci s využitím standardizovaných metod.

<b>Ionty</b>	<b>Koncentrace</b>
hydrogenuhličitan	67,1
síran	45,5
vápník	31,6
chloridy	9,44
dusičnan	8,65
sodík	8,6
hořčík	2,92
draslík	2,42
železo	0,113
mangan	0,05
dusitan	0,01
<b>Celkem</b>	<b>176,4</b>

Před začátkem experimentu byli raci osušeni savým papírem a zváženi na analytických vahách AND HR-200. Zároveň jim byla změřena délka hlavohruď (od špičky rostra až po zadní okraj hlavohruď) pomocí digitálního posuvného měřítka (šuplery) s přesností 0,01 mm. Délky hlavohruď ( $29,9 \pm 2,3$  mm) a hmotnost ( $5,3 \pm 1,5$  g) nasazených jedinců nebyla mezi skupinami signifikantně rozdílná ( $F_{5,54}=0,39$ ,  $p=0,95$  and  $F_{5,54}=0,53$ ,  $p=0,87$ ).

K označení pokusných raků bylo využito externího neinvazivního značení pomocí laku na nehty (Musil a kol., 2010). Pozice značky určovala pořadové číslo jedince (viz Obr. 3). V případě svleku byla značka po rekalifikaci jedince obnovena.



Obr. 3: Schéma značení raků v pokusu. Čísla značí pořadí jedince v daném akváriu.

Pokusní raci byli během prvních pěti dní experimentu adaptováni na požadované salinity. První den byly všechny skupiny (kromě kontroly) vysazeny do iniciální salinity 6 ‰. Poté byla každodenně vyměňována vody napříč všemi skupinami s tím, že salinita ošetření s vyššími požadovanými hodnotami byla graduálně zvyšována vždy o 3 ‰. Během adaptace a následně i během celého pokusu byli raci každodenně kontrolováni, krmeni a byla udržována vhodná kvalita odchovného prostředí. Při této denní péči byl kontrolován celkový stav raků – jejich případná mortalita, svlékání, formování sekrečních žláz či ovulace vajíček a popřípadě i další morfologické změny. V případě ekdyze či ovulace bylo s rakem zacházeno způsobem odpovídajícím jeho stavu – během čištění akvárií a výměny vody byli tito raci přemístěni do nádoby s původní vodou. Čerstvě svlečení raci byli ponecháni přirozené rekalcifikaci (obvykle po dobu 2 až 3 dnů) a poté byla zaznamenána jejich hmotnost a délka hlavohruďi výše popsaným způsobem. U samic s vajíčky byl zaznamenáván průběh inkubace, resp. dosažení líhnutí ráčat a jejich první svlékání – jedinci v druhém vývojovém stádiu byli šetrně odebráni a spočítáni. Ke krmení bylo využíváno suché komerční krmivo pro akvarijní ryby s přísadkou řas (Sera Granugreen, Sera GmbH, Německo, viz kapitola Přílohy Obr. 12) a mraženými larvami pakomárů *Chironomus* sp. (Obr. 13) v nadbytku. Případné svlečky (exuvie) byly po odstranění partie s lakem v akváriu ponechány jakožto vhodný zdroj potřebných minerálů pro raky. Před krměním byly vždy odsáty nejhrubší nečistoty z předchozího dne (zbylé krmivo a exkrementy). Úplné výměny vody byly realizovány dvakrát týdně (Út a Pá). Při nich byly pomocí plastové houby stírány i stěny akvárií a umývány úkryty.

Pro posouzení růstu byly hodnoceny následující ukazatele:

$$SGR = \frac{(\ln(W_t) - \ln(W_i)) * 100}{T} \quad (\% \cdot \text{den}^{-1})$$

Nejdříve byla spočítána specifická rychlost růstu (SGR), kde  $W_t$  znázorňuje hmotnost v čase,  $W_i$  vyjadřuje počáteční hmotnost a  $T$  je čas ve dnech.

$$L_m = \frac{(L_a - L_b) * 100}{L_b} \quad (mm)$$

Poté byl spočítán absolutní přírůstek délky hlavohruďi po svleku ( $L_m$ ), konkrétně pro každý svlek zvlášť.  $L_a$  představuje délku hlavohruďi po svleku a  $L_b$  před svlekem.

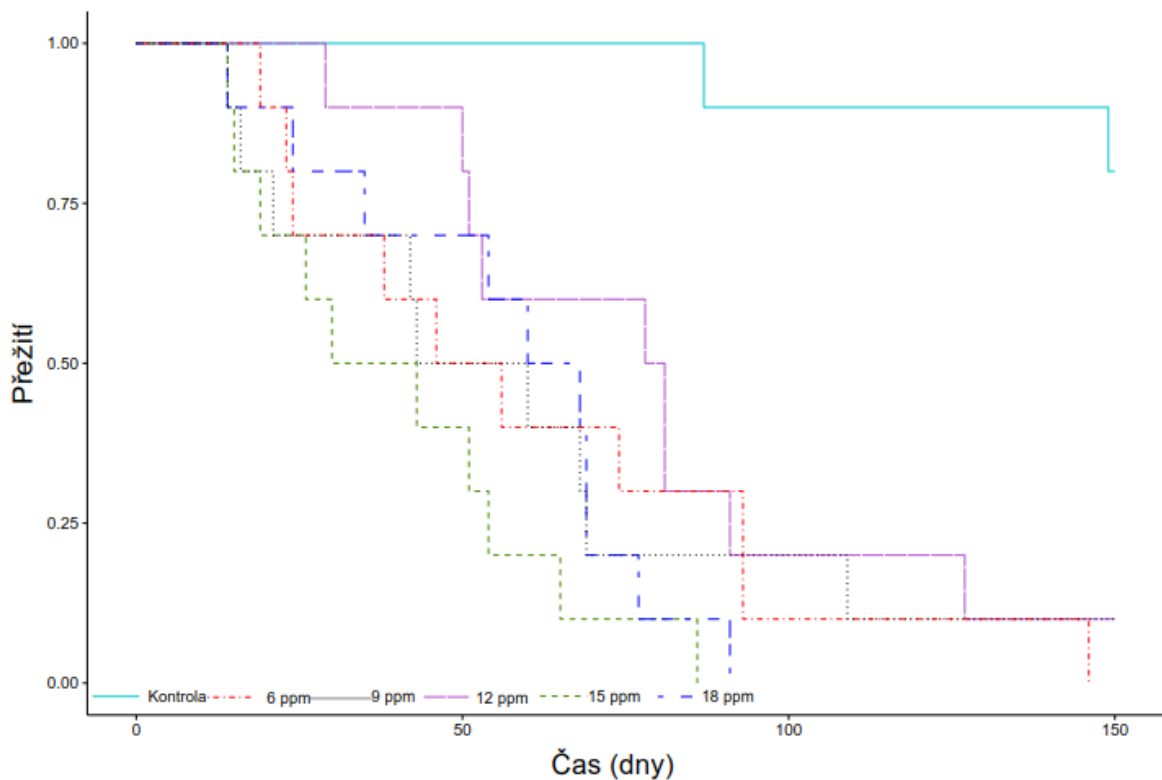
### 3.2 Statistická analýza

U všech skupin byla provedena neparametrická analýza přežití (Kaplan-Meierova metoda; Therneau a Grambsch, 2000). Pro srovnání počáteční biometrie, přírůstku absolutní délky a hodnoty SGR mezi skupinami byla po potvrzení normality dat (Kolmogorovův-Smirnovův test) využita jednocestná ANOVA následovaná Tukeyovým HSD testem provedení. Všechny analýzy byly provedeny v programu R verze 3.2.5 (R Core Team 2016). Nulová hypotéza byla zamítnuta při  $\alpha < 0,05$  ve všech testech této studie.



## 4 VÝSLEDKY

Přežití pokusných jedinců raka mramorovaného se mezi jednotlivými skupinami lišilo ( $\chi^2=31,3$ ;  $df=5$ ,  $p<0,001$ ; viz Graf 1). Pouze někteří jedinci přežili po celou dobu experimentu (155 dní). Přeživší raci pocházeli ze tří skupin, včetně kontrolní skupiny, kde z původních deseti jedinců přežilo 8. Ze skupiny s 9‰ salinitou přežil pouze jeden jedinec, taktéž tomu bylo u skupiny s 12 ‰. Všichni jedinci z ostatních skupin (6, 15 a 18 ‰) uhynuli před ukončením experimentu. Poslední jedinci ve výše zmíněných skupinách se dožili 146., 87., resp. 91. dne pokusu. Pokud byla z analýzy vyjmuta kontrolní skupina, nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami ( $\chi^2=7$ ,  $df=4$ ,  $p=0,13$ ). Velikost raka (délka hlavohruďi ani hmotnost) neměla vliv na přežití raků.



Graf 1: Vývoj přežití raků mramorovaných držených při různých salinitách.

Zvýšená koncentrace solí nicméně negativně ovlivnila fyziologické procesy, jako je růst, svlékání a reprodukce (viz Tab. 2). Počet svleků (započatých či úspěšných) se podstatně snižoval s rostoucí salinitou. Pouze v kontrolních skupinách byla během

realizace pokusu pozorována dvě úspěšná svlékání, a to celkem u pěti jedinců. V každé z experimentálních skupin byla alespoň jedna samice schopna ovulace, přičemž pouze v kontrolních skupinách došlo k úspěšné reprodukci (ovulaci, inkubaci, líhnutí a svlékání do druhého vývojového stádia). Ovulace u ostatních skupin nebyla úspěšná z důvodu ztráty vajíček. Jedna samice z kontrolní skupiny se reprodukovala během trvání experimentu dvakrát.

Během experimentu, respektive během výměny vody a čištění akvárií, byla zjištěna tendence ke snížené schopnosti aktivního pohybu (únikových reflexů) u raků ze skupin se zvýšenou salinitou. Při potřebě manipulace se raci v těchto skupinách odchytili oproti kontrolní skupině snáze. Zatímco při odchytu raků v kontrolní skupině bylo zapotřebí akvarijní sítě, raky z ostatních skupin bylo možné odchytit manuálně bez větších problémů. Tyto změny však nebyly potvrzeny exaktní evaluací etologického projevu raků.

Změny morfologického charakteru byly pozorovány v průběhu experimentu. Jednalo se o postupné ztrácení přirozeného zbarvení až do hnědého či okrového odstínu zbarvení celého povrchu těla (viz kapitola Přílohy, Obr. 14). K těmto změnám došlo v salinitách 6, 9 a 15 ‰, v každé skupině po jednom kusu. Ve skupině 12 ‰ se jednalo o 4 ks.

Jedna samice ze skupiny 6 ‰ nebyla po svleku schopna úplné rekalifikace svého krunýře, a až do konce experimentu (cca 2 měsíce) zůstala ne zcela kalcifikovaná. Následně ztratila i tato samice své původní zbarvení.

Tab. 2: Ukazatele růstu a reprodukce pro raka mramorovaného z různých skupin salinit. Hodnoty růstových indexů jsou uvedeny jako průměr±směrodatná odchylka. Reprodukční ukazatele odkazují na počty jedinců. Hodnoty s rozdílnými horními indexy jsou v daném sloupci signifikantně rozdílné (jednocestná ANOVA, Turkey HSD test,  $p < 0,05$ ).

Skupina	SGR (%.den <sup>-1</sup> )	Absolutní délka přírůstku po svleku (mm)		Svlékání		Ovulace		Počet ráčat
		1.	2.	1. zahájeno / úspěšné	2. zahájeno / úspěšné	1. zahájena / úspěšná	2. zahájena / úspěšná	
Kontrola	0,22±0,12 <sup>b</sup>	7,28±3,97 <sup>b</sup>	7,33±4,43	9/8	5/5	9/8	1/1	44-237
6 ‰	0,04±0,09 <sup>a</sup>	2,17±3,23 <sup>a</sup>	0	10/3	0/0	3/0	0	0
9 ‰	0	0	0	2/0	0/0	3/0	0	0
12 ‰	0,02±0,08 <sup>a</sup>	0,85±2,56 <sup>a</sup>	0	2/1	0/0	4/0	0	0
15 ‰	0	0	0	2/0	0/0	1/0	0	0
18 ‰	0	0	0	1/0	0/0	1/0	0	0

## 5 DISKUZE

Kaspické moře se salinitou 12-13 ‰ (Berdnikov a kol., 1999), stejně jako Černé moře (17-18 ‰; Jazdzewski a Konopacka, 2002) a Azovské moře (10-12 ‰; Pourkazemi, 2006) jsou východoevropská moře nabývající hodnot salinit, při nichž je několik druhů raků schopno přežít, růstu a dokonce i reprodukce. Většina druhů raků je schopna alespoň krátkodobě přežít zvýšenou salinitu. Tolerance vůči zvýšeným salinitám je však druhově specifická. Příkladem zvýšené tolerance může být rak červený, který se dokáže rozmnožovat při zvýšené salinitě, a to až do 25 ‰ (Casellato a Masiero, 2011). Přežití je však schopen až do 35 ‰ (Bissattini a kol., 2015). Tolerance se může lišit i mezi věkovými skupinami jednoho druhu. Juvenilní jedinci jsou většinou signifikantně méně tolerantní vůči změnám v koncentracích solí (Meade a kol., 2002; Jaszczolt a Szaniawska, 2011). Rak bahenní, který prokazatelně obývá vnitrozemská moře (Černé, Azovské, Kaspické) je taktéž velice tolerantním druhem vůči zvýšené salinitě vody (Souty-Grosset a kol., 2006). Rak bahenní je schopen bez prokazatelných problémů přežít ve vodě o koncentraci solí 28 ‰ (Susanto a Charmantier, 2000). Nad 28 ‰ však dochází k rapidnímu nárůstu mortality. Co se týče reprodukce, je zajímavé, že ačkoliv rak bahenní dokáže žít v relativně vysokých koncentracích solí, k líhnutí ráčat dochází pouze do 7 ‰ (Holdich a kol., 1997). V případě poslední jmenované studie však byli experimentální raci odchyceni nedaleko Londýna. Lze tedy uvažovat, že lokální adaptace vůči zvýšeným salinitám vody je vlastní pouze, resp. především, populacím žijícím ve zmiňovaných mořích a je méně rozvinuta u čistě sladkovodních forem. Dalším tolerantním, původním druhem východní Evropy je *A. pachypus*, kteréhož populace taktéž prokazatelně žijí ve vnitrozemských mořích (Machino a Holdich, 2006; Kouba a kol., 2014).

*Cherax destructor* a *C. quadricarinatus*, hojně obchodované druhy na východoevropském trhu (Kotovska a kol., 2016; Vodovsky a kol., 2017), jsou rovněž signifikantně tolerantní vůči zvýšené salinitě. *Cherax quadricarinatus* toleruje krátkodobě až 25 ‰, přičemž nad tyto hodnoty vykazuje zvýšenou mortalitu, ztrácí únikové reflexy a je inhibován růst (Prymazcok a kol., 2008). *Cherax destructor* je

schopen bez větších problémů tolerovat koncentrace solí do 12 ‰ (Mills a Geddes, 1980). Pravděpodobně nejbližší příbuzné druhy raka mramorovaného *Procambarus fallax* Hagen a *Procambarus alleni* Faxon, původní druhy Severní Ameriky s centrem distribuce ve státě Florida (Taylor a kol., 2007). Studie specificky zaměřené na toleranci vůči salinitě u *P. fallax* nejsou dostupné. *Procambarus alleni* nicméně obývá prostředí v rozmezí salinit 0-18 ‰. Z lokalit se zvýšenou salinitou však nejsou známy jinak běžné sympatrické populace tohoto druhu s *P. fallax* (Hendrix a Loftus, 2010). Vzhledem k blízké příbuznosti *P. fallax* s rakem mramorovaným by to mohlo naznačovat nízkou toleranci obou druhů vůči zvýšené salinitě pozorované v této diplomové práci u raka mramorovaného (Graf 1., Tab. 2.).

S ohledem na hodnocení a porovnání dosažených výsledků s dřívějšími studii je zapotřebí vzít v úvahu, že každá z výše uváděných studií měla různou dobu aklimatizace, potažmo adaptace na požadovanou salinitu. Byly použity i různé metody přidávání solí (postupná vs. šoková aplikace). V případě aplikace mořské soli, ve které jsou mimo  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  přítomny i další soli a ionty, by výsledky experimentu mohli být rozdílné. Ve srovnání s výše uvedenými studii však rak mramorovaný vykazoval výrazně nižší přežití, růst a neschopnost reprodukce, a to i v nejnižší salinitě (6 ‰). Navíc s rostoucí salinitou narůstalo i riziko úmrtí během svlékání. Je pravděpodobné, že osmotický stres negativně ovlivnil svlékání. Při našem experimentu vykazoval rak mramorovaný vyšší mortalitu ve zvýšené salinitě. Svlékání a potažmo růst byl taktéž negativně ovlivněn a téměř všichni jedinci vykazovali sníženou schopnost úniku, respektive aktivního pohybu. Reprodukce schopní byli pouze jedinci v kontrolní skupině, bez zvýšené salinity. Někteří jedinci byli schopní přežít po celou dobu experimentu (155 dní), jednalo se však pouze o 2 raky v salinitách 9 a 12 ‰. Poslední rak v 18 ‰ uhynul 91. den experimentu.

Samice raka mramorovaného jsou schopny v laboratorních podmínkách běžně klást, v závislosti na velikosti, 50-150 vajíček (Souty-Grosset a kol., 2006). Větší a starší samice jsou schopny vyprodukovat nad 400 vajíček (Vogt, 2010). V přírodních podmínkách to může být i 600-700 vajíček během jednoho reprodukčního cyklu (Jones a kol., 2009; Chucholl a Pfeiffer., 2010). Při našem experimentu v laboratorních podmínkách bylo vyprodukováno jednou samicí během jednoho reprodukčního cyklu v průměru 120 ráčat ve druhém vývojovém stádiu při rozmezí 44 až 237 potomků. Druhy rodu *Astacus*, kteří jsou v Evropě původními zástupci astakofauny, dosahují

dospělosti ve třetím až pátém roce života a jsou schopni reprodukce pouze jednou za vegetační sezonu (Souty-Grosset a kol., 2006). Obvyklá plodnost druhů rodu *Astacus* je 40 až 200 vajíček (Skurdal a Taugbøl, 2002). Samice raka mramorovaného dosahují dospělosti již ve věku pouhých 25-35 týdnů (při teplotě 25, respektive 20 °C). Při optimálních chovatelských podmínkách se opakovaně rozmnožují v průběhu celého roku s intervalem pouhých 8-9 týdnů (Seitz a kol., 2005).

Jedním z nejvýznamnějších právních dokumentů v rámci Evropské unie, který sjednocuje přístup EU v boji proti invazním druhům je od roku 2015 účinné Nařízení EU č. 1143/2014 o prevenci a regulaci zavlékání či vysazování a šíření invazních nepůvodních druhů. Nařízení se vztahuje na druhy v seznamu invazních nepůvodních druhů s významným dopadem na Unii (tzv. "unijní seznam"), který byl publikován jako Prováděcí nařízení Komise (EU) 2016/1141. V seznamu je uvedeno celkem 37 rostlinných a živočišných druhů, mezi nimiž figuruje i 5 druhů raků, včetně raka mramorovaného.

Obchod se sladkovodními korýši, včetně raků, za poslední desetiletí rapidně vzrostl a stal se důležitou cestou zavlečení nepůvodních druhů do Evropy (Patoka a kol., 2014). Německo a Česká republika patří mezi velmoci na evropském trhu s akvarijními druhy raků (Chucholl a Wendler, 2016; Patoka a kol., 2014). Průzkum trhu s akvarijními druhy raků byl prováděn i v jiných zemích, včetně Slovenska (Lipták a Vitázková, 2015), Řecka (Papavlasopoulou a kol., 2013), Turecka (Turkmen a Karadal, 2012), USA (Faulkes, 2010, 2015). Poté co byl rak mramorovaný objeven ve volné přírodě na Ukrajině v těsné blízkosti pobřeží Černého moře (Novitsky a Son, 2016), zájem vědců se obrátil i k východní Evropě. Obchod s raky byl sledován na Ukrajině (Kotovska a kol., 2016) a v Rusku, konkrétně v regionu dolní Volhy, především v Astrachani (Vodovsky a kol., 2017). Byl potvrzen pozitivní nález několika nepůvodních druhů raků, včetně raka mramorovaného a dalších potenciálně rizikových druhů v obou výše zmíněných zemích. Po těchto průzkumech se naskytla otázka, zda je možné, aby rak mramorovaný negativně ovlivnil původní druhy raků ve volné přírodě východní Evropy, specificky pak i v prostředí se zvýšenou salinitou vody. Tento region je znám výskytem druhu *A. pachypus*, který je považován za pravděpodobně nejméně rozšířený původní druh evropského kontinentu. Populace raka *A. pachypus* obývají sladkovodní lokality i slanovodní ekosystémy Kaspického, Černého a Azovského moře (Kouba a kol., 2014). Ačkoliv jsme při našem experimentu nepotvrdili toleranci raka

mramorovaného vůči zvýšené salinitě vody, není zcela jisté, zda se druh při dlouhodobé a pozvolné expozici, nedokáže na podmínky zvýšené koncentrace solí adaptovat a vytvořit následně reprodukce schopné populace. Rak mramorovaný je schopen přezimování v mírném pásmu (Veselý a kol., 2015; Patoka a kol., 2016; Lipták a kol., 2016), tudíž je tento druh velice nebezpečný z hlediska invaze a zakládání nových populací v jeho nepůvodním areálu rozšíření.

Na obchodované druhy a především na již etablované populace ve volné přírodě je nutno pohlížet jako na potencionální přenašeče račího moru a dalších onemocnění (Keller a kol., 2014; Panteleit a kol., 2017). Rak mramorovaný byl s dalšími dvěma druhy klasifikován za potenciálně nejproblematičtější druh, a to mimo jiné i z důvodu šíření nemocí, jako je račí mor či tzv. *white spot syndrom virus* (WSSV), kterými může být rak mramorovaný potenciálně infikován (Vodovsky a kol., 2017). Při nálezech raka mramorovaného na Slovensku bylo 40 jedinců podrobena analýze na přítomnost *A. astaci*. Testy neprokázaly přítomnost račího moru v žádném z testovaných jedinců (Lipták a kol., 2016). Odchycení jedinci z Radovesické výsypky (Česká republika) byli testováni taktéž s negativním výsledkem (Patoka a kol., 2016). Infikace račím morem se neprokázala ani u jedinců odchycených na Madagaskaru. Zde však bylo podrobena analýze pouze 6 jedinců (Jones a kol., 2009).

Některé nálezy raka mramorovaného ve volné přírodě neprokázaly přítomnost račího moru, respektive přítomnost *A. astaci*. Keller a kol., (2014) a Steyskall a kol. (2013) však potvrdili, že rak mramorovaný může být nositelem račího moru, potažmo i přenašečem této nemoci na další druhy raků. Při svém experimentu Keller a kol., (2014) analyzovali výskyt račího moru u raků držných v zajetí i u jedinců z volné přírody. Z 33 jedinců v zajetí bylo nakaženo touto nemocí 23 (70 %). U raků z jezera Singliser (Německo) se infekce nepotvrdila, ovšem jedinci z jezera Moosweiher vykazovali určité procento nákazy. Dva z 23 analyzovaných raků (9 %) bylo nakaženo račím morem. Další populace z jezera Klepzig vykazovala taktéž pozitivní výsledky na račí mor, infikovanost byla 9 %, kdy jeden z 11 testovaných jedinců byl infikován.

Faulkes a Jimenez (2011) porovnávali agresivitu, respektive mezidruhovou kompetici mezi rakem červeným a rakem mramorovým. Velikostně shodní jedinci raka mramorovaného vykazovali stejnou aktivitu v boji, jako jedinci raka červeného. Kompetice byla zaznamenána i mezi jedinci stejného druhu, avšak v případě, že se v akváriu nacházeli i jedinci raka červeného, kompetice mezi druhy nastala

signifikantně rychleji. Tato skutečnost naznačuje, že při interakci s původními evropskými druhy raků je rak mramorovaný schopen kompetice na stejné úrovni jako rak červený.

Etablované populace raka mramorovaného byly ve volné přírodě pozorovány poprvé v roce 2010 (Chucholl a Pfeiffer., 2010; Jánský a Mutkovič, 2010). Úspěšnost tohoto druhu v akvaristických chovech i ve volné přírodě je mj. dána jeho chovatelskou nenáročností, brzkým dosažením dospělosti, rychlým růstem, vysokou plodností, krátkou embryogenezí a možností opakované reprodukce během vegetační sezóny (Vogt, 2015). Rak mramorovaný se rozmnožuje výhradně partenogeneticky (Scholtz a kol., 2003). Tato forma reprodukce výrazně přispívá k řazení tohoto raka mezi velice rizikové invazní druhy. Pouze jedna samice je totiž teoreticky schopna založit novou populaci, která se bude dále šířit (Seitz a kol., 2005).



## 6 ZÁVĚR

Ačkoliv je rak mramorovaný úspěšným kolonizátorem nejen evropských vod, nepodařilo se nám potvrdit jeho toleranci vůči zvýšené salinitě. Schopnost přežití, růstu a reprodukce ve zvýšených salinitách vykazují některé druhy raků, avšak rak mramorovaný ne. Úspěšného svlékání, ve skupinách se zvýšenou salinitou, byli schopni pouze čtyři jedinci z padesáti. Reprodukce byli schopni pouze jedinci v kontrolních skupinách, v žádné skupině se zvýšenou salinitou se nepodařilo žádnému jedinci reprodukovat. Rak mramorovaný pravděpodobně není v současné době schopen osídlení ekosystémů se zvýšenou salinitou. Hlavními důvody jsou nízké přežití, inhibice růstu a neschopnost reprodukce ve zvýšených salinitách. Dalším aspektem je jeho snížená schopnost únikových reflexů. Ačkoliv tyto změny v chování nebyly v našem experimentu potvrzeny exaktní evaluací etologického projevu raků, je zřejmé, že by tento faktor pravděpodobně negativně ovlivnil jejich schopnost úkrytu či aktivní obrany před potenciálními predátory. Nicméně byla prokázána schopnost dlouhodobého přežití v podmínkách zvýšené salinity, a to i ve skupině o salinitě 18 ‰, kde byl jeden jedinec schopen přežití po 91 dní trvání experimentu. Postupná a dlouhodobá aklimatizace podpořená rychlým generačním cyklem by nicméně mohla v budoucnu vést k lokálním adaptacím a rozšíření v těchto ekosystémech. Potenciálně problematická je však i možnost „pouhého“ přežívání v prostředí se zvýšenou salinitou.

## 7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Anson, K. J., Rouse, D. B., 2007. Effects of salinity on hatching and post-hatch survival of the Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25 (2), 277-280.
- Bazer, C. E., Preston, R. L., Perry, W. L., 2016. Increased salinity affects survival and osmotic response of rusty crayfish *Orconectes rusticus* Girard, 1852 and northern clearwater crayfish *O. propinquus* Girard, 1852 (Decapoda: Astacoidea: Cambaridae) as salinity increases: the potential for estuarine invasions. *Journal of Crustacean Biology* 36 (5), 607-614.
- Berdnikov, S., Selyutin, V., Vasilchenko, V., Caddy, J., 1999. Trophodynamic model of the Black and Azov Sea pelagic ecosystem: consequences of the comb jelly, *Mnemiopsis leydei*, *Fisheries Research* 42 (3), 261-289.
- Bissattini, A. M., Traversetti, L. Bellavia, G., Scalici, M., 2015. Tolerance of increasing water salinity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Journal of Crustacean Biology* 35 (5), 682-685.
- Bohman, P., Edsman, L., 2013. Marmokrebs in River Märstaån. Risk assessment and action proposals (in Swedish). *Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm*, 110 pp.
- Bohman, P., Edsman, L., Martin, P., Scholtz, G., 2013. The first Marmokrebs (Decapoda: Astacida: Cambaridae) in Scandinavia. *BioInvasions Records* 2 (3), 227-232.
- Buřič, M., Hulák, M., Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P., 2011. A successful crayfish invader is capable of facultative parthenogenesis: a novel reproductive mode in Decapod crustaceans. *PLoS ONE*. 6 (5), e20281.
- Buřič, M., Kouba, A., Kozák, P., 2013. Reproductive plasticity in freshwater invader: from long-term sperm storage to parthenogenesis. *PLoS ONE* 8 (10), e77597.

- Casellato, S., Masiero, L., 2011. Does *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) represent a threat for estuarine brackish ecosystems of northeastern Adriatic coast (Italy)? *Journal of Life Sciences* 5, 549-554.
- Faulkes, Z., 2010. The spread of the parthenogenetic marbled crayfish, Marmorkrebs (*Procambarus* sp.), in the North American pet trade. *Aquatic Invasions*, 5 (4), 447-450.
- Faulkes, Z., 2015. Marmorkrebs (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) are the most popular crayfish in the North American pet trade. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 416, 20.
- Faulkes, Z., Jimenez, A., 2011. Can the parthenogenetic marbled crayfish Marmorkrebs compete with other crayfish species in fights? *Journal of Ethology* 29 (1), 115-120.
- Faulkes, Z., Ferial, T. P., Muñoz, J., 2012. Do Marmorkrebs, *Procambarus fallax* f. *virginalis*, threaten freshwater Japanese ecosystems? *Aquatic Biosystems* 8 (13), 12 pp.
- Hagen, H. A., 1870. Monograph of the North American Astacidae. In *Illustrated Catalogue of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* 3 (8), 109 pp.
- Hendrix, A. N., Loftus, W. F., 2010. Distribution and relative abundance of the crayfishes *Procambarus alleni* (Faxon) and *P. fallax* (Hagen) in southern Florida. *Wetlands* 20 (1), 194-199.
- Henri, R. P., Lucu, Č., Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustaceans gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology* 3 (431), 33 pp.
- Holdich, D. M., Harlioglu, M. M., Firkins, I., 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44 (2), 147-154.
- Holdich, D. M., Pöckl, M., 2007. Invasive crustaceans in European inland waters. In Francesca Gherardi. *Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution, and Threats*, 29-75.

- Chucholl, C., 2013. Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biological Invasions* 15, 125-141,
- Chucholl C, Pfeiffer M., 2010. First evidence for an established Marmorcrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) population in Southwestern Germany, in syntopic occurrence with *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). *Aquatic Invasions* 5 (4), 405-412.
- Chucholl, C., Morawetz, K., Groß, H., 2012. The clones are coming - Strong increase in Marmorcrebs [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginialis*] records from Europe. *Aquatic Invasions* 7 (4), 511-519.
- Janský, V., Mutkovič, A., 2010. Rak *Procambarus* sp. (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) - prvý nález na Slovensku. *Acta Rerum Naturalium Musei Nationalis Slovaci* 56, 64-67.
- Jaszczołt, J., Szaniawska, A., 2011. The spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) as an inhabitant of the Baltic Sea - experimental evidences for its invasion of brackish waters. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 40 (3), 52-60.
- Jazdzewski, K., Konopacka, A., 2002. Invasive Ponto-Caspian species in waters of the Vistula and Oder basins and the southern Baltic Sea. In Leppäkoski, E., Gollasch, S., Olenin, S., *Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management*. Springer, 384-398.
- Jones, C. M., 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Queensland Department of Primary Industries, Australia, 109 pp.
- Jones, J. P. G., Rasamy, J. R., Harvey, A., Toon, A., Oidtmann, B., Randrianarison, M. H., Raminosoa, N., Ravoahangimalala, O. R., 2009. The perfect invader: a parthenogenic crayfish poses a new threat to Madagascar's freshwater biodiversity. *Biological Invasions* 11 (6), 1475-1482.
- Jusilla, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R., Kokko, H., 2011. Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture* 321 (1-2), 17-20.

- Jussila, J., Makkonen, J., Vainikka, A., Kortet, R., Kokko, H., 2014. Crayfish plague dilemma: how to be a courteous killer? *Boreal Environment Research* 19 (3), 235-244.
- Jussila, J., Toljamo, A., Makkonen, J., Kukkonen, K., Kokko, H., 2014. Practical disinfection chemicals for fishing and crayfishing gear against crayfish plague transfer. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413, 2.
- Karimpour, M., Harlioglu, M. M., Aksu, Ö., 2011. Status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*) in Iran. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401, 18.
- Kawai, T., Scholtz, G., Morioka, S., Ramanamandimby, F., Lukhaup, C., Hanamura, Y., 2009. Parthenogenetic alien crayfish (Decapoda: Cambaridae) spreading in Madagascar. *Journal of Crustacean Biology* 29 (4), 562-567.
- Keller, N. S., Pfeiffer, M., Roessink, I., Schulz, R., Schrimpf, A., 2014. First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* forma *virginalis*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 414, 15.
- Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413, 5.
- Kozák, P., Policar, T., Buřič, M., Kouba, A., 2009. Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR. *JU FROV, Vodňany*, 27 stran.
- Kozubíková, E., Petrusek, A., Ďuriš, Z., Martín, M. P., Diéguez-Urbeondo, J., Oidtmann, B., 2008. The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture* 274 (2-4), 208-217.
- Lipták, B., Mrugała, A., Pekárik, L., Mutkovič, A., Grul'a, D., Petrusek, A., Kouba, A., 2016. Expansion of the marbled crayfish in Slovakia: beginning of an invasion in the Danube catchment? *Journal of Limnology* 75 (2), 305-312.
- Longshaw, M., 2011. Diseases of crayfish: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106 (1), 54-70.

- Lökös, A., Müller, T., Kovács, K., Várkonyi, L., Specziár, A., Martin, P., 2016. The alien, parthenogenetic marbled crayfish (Decapoda: Cambaridae) is entering Kis-Balaton (Hungary), one of Europe's most important wetland biotopes. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417, 6.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., Poorter, D. M., 2004. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), London, 12 pp.
- Machino, Y., Holdich, D. M., 2006. Distribution of crayfish in Europe and adjacent countries: updates and comments. *Freshwater Crayfish* 15, 292-323.
- Majid, A. H., Fatemeh, L., 2014. Study of antennal glands role on osmoregulation of crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Oceanography* 5 (19), 45-51.
- Martin, P., Dorn, N. J., Kawai, T., Heiden, C., Scholtz, G., 2010. The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870). *Contributions to Zoology* 79 (3), 107-118.
- Martin, P., Shen, H., Füllner, G., Scholtz, G., 2010. The first record of the parthenogenetic Marmokrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) in the wild in Saxony (German) raises the question of its actual threat to European freshwater ecosystems. *Aquatic Invasions* 5 (4), 397-403.
- Martin, P., Thonagel, S., Scholtz, G., 2016. The parthenogenetic Marmorkrebs (Malacostraca: Decapoda: Cambaridae) is a triploid organism. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 54 (1), 13-21.
- Marten, M., Werth, C., Marten, D., 2004. Der Marmorkrebs (Cambaridae, Decapoda) in Deutschland – ein weiteres Neozoon im Einzugsgebiet des Rheins. *Lauterbornia*, 50, 17-23.
- Marzano, F. N., Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Piccinini, A., Gibertini, G., 2009. The first record of the marbled crayfish adds further threats to fresh waters in Italy. *Aquatic Invasions* 4 (2), 401-404.

- Meade, M. E., Doeller, J. E., Kraus, D., Watts, S. A., 2002. Effects of temperature and salinity on weight gain, oxygen consumption rate, and growth efficiency in juvenile red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*, *Journal of the World Aquaculture Society* 33 (2), 188-198.
- Mills, B. J., Geddes, M. C., 1980. Salinity tolerance and osmoregulation of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda: Parastacidae). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 31 (5), 667-676.
- Musil, M., Buřič, M., Polícar, T., Kouba, A., Kozák, P., 2010. Comparison of diurnal and nocturnal activity between noble (*Astacus astacus*) and spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*). *Freshwater Crayfish* 17, 189-193.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1143/2014 ze dne 22. října 2014 o prevenci a regulaci zavlékání či vysazování a šíření invazních nepůvodních druhů. Dostupné na <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1143/oj>
- Novitsky, R. A., Son, M. O., 2016. The first records of Marmorkrebs [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*] (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Ukraine. *Ecologica Montenegrina* 5, 44-46.
- Panteleit, J., Keller, N. S., Kokko, H., Jussila, J., Makkonen, J., Theissing, K., Schrimpf, A., 2017. Investigation of ornamental crayfish reveals new carrier species of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquatic Invasions* 12 (1), 77-83.
- Pârvulescu, L., Schrimpf, A., Kozubíková, E., Resino, S. C., Vrålstad, T., Petrušek, A., Schulz, R., 2012. Invasive crayfish and crayfish plague on the move: first detection of the plague agent *Aphanomyces astaci* in the Romanian Danube. *Diseases of Aquatic Organisms* 98 (1), 85-94.
- Patoka, J., 2008. Chováme sladkovodní raky. Grada Publishing, Praha, 128 stran.
- Patoka, J., Buřič, M., Kolář, V., Bláha, M., Petrtýl, M., Franta, P., Tropek, R., Kalous, L., Petrušek, A., Kouba, A., 2016. Predictions of marbled crayfish establishment in conurbations fulfilled: Evidence from the Czech republic. *Biologia* 71 (12), 1380-1385.

- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2014. Risk assessment of the crayfish pet trade based on data from the Czech republic. *Biological Invasions* 16 (12), 2489-2494.
- Patoka, J., Kalous, L., Kopecký, O., 2015. Imports of ornamental crayfish: the first decade from the Czech Republic's perspective. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 416, 04.
- Peay, S., 2009. Invasive non-indigenous crayfish species in Europe: Recommendations on managing them. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 394-395, 03.
- Perdikaris, C., Kozák, P., Kouba, A., Konstantinidis, E., Paschos, I., 2012. Socio-economic drivers and non-indigenous freshwater crayfish species in Europe. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 404, 01.
- Perry, W. G., 1971. Salt tolerance and factors affecting crawfish production in coastal marches. Louisiana Crawfish Farmers Association, 11 pp.
- Pourkazemi, M., 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. *Journal of Applied Ichthyology* 22 (1), 12-16.
- Prováděcí nařízení Komise (EU) 2016/1141 ze dne 13. července 2016, kterým se přijímá seznam invazních nepůvodních druhů s významným dopadem na Unii podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1143/2014. Dostupné na [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2016/1141/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2016/1141/oj)
- Prymaczok, N. C., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M., 2008. Levels of ions and organic metabolites in the adult freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, exposed to different salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41 (2), 121-130.
- Randall, D., Warren, B., French, K., 2002. *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. New York, 821 pp.
- Samardžić, M., Lucić, A., Maguire, I., Hudina, S., 2014. The first record of the marbled crayfish [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*] in Croatia. *Crayfish News* 36, 4 pp.



- Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature* 421 (6925), 806-806.
- Schrimpf, A., Schmidt, T., Schulz, R., 2014. Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquatic Invasions* 9 (2), 203-209.
- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G., 2005. Ontogeny of the Marmorkrebs (marbled crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *Journal of Experimental Zoology* 303 (5), 393-405.
- Skurdal, J., Taugbøl, T., 2002. *Astacus*. In: Holdich, D. M. *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford, 467-510.
- Steyskall, C., Konar, M., Wieser, G., Vogl, G., 2013. Is the marbled crayfish *Procambarus fallax* forma *virginialis* a potential vector for the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*? *Conference on Diseases of Fish and Shellfish* (16). Tampere, 1 pp.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noël, P. Y., Reynolds, J. D., Haffner, P., 2006. *Atlas of Crayfish in Europe*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 187 pp.
- Susanto, G. N., Charmantier, G., 2000. Ontogeny of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Physiological and Biochemical Zoology* 73 (2), 169-176.
- Svoboda, J., Kozubíková-Balcarová, E., Kouba, A., Buřič, M., Kozák, P., Diéguez-Uribeondo, J., Petrušek, A., 2013. Temporal dynamics of spore release of the crayfish plague pathogen from its natural host, American spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*), evaluated by transmission experiments. *Parasitology* 140 (6), 792-801.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Petrušek, A., 2017. Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases* 40 (1), 127-140.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., Kouba, A., Diéguez-Uribeondo, J., Petrušek, A., 2014. Resistance to the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in two freshwater shrimps. *Journal of Invertebrate Pathology* 121, 97-104.

- Svoboda, J., Strand, D. A., Vrålstad, T., Grandjean, F., Edsman, L., Kozák, P., Kouba, A., Fristad, R. F., Koca, S. B., Petrušek, A., 2014. The crayfish plague pathogen can infect freshwater-inhabiting crabs. *Freshwater Biology* 59 (5), 918-929.
- Štambergová, M., Svobodová, J., Kozubíková, E., 2009. Raci v České republice. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 255 stran.
- Therneau, M. T., Grambsch, M. P., 2000. Modeling survival data: extending the Cox model. New York: Springer Science & Business Media.
- Veselý, L., Buřič, M., Kouba, A., 2016. Hardy exotics species in temperate zone: can “warm water” crayfish invaders establish regardless of low temperatures? *Scientific Reports* 5, 16340.
- Vodovsky, N., Patoka, J., Kouba, A., 2017. Ecosystem of Caspian Sea threatened by pet-traded non-indigenous crayfish. *Biological Invasions*, doi: 10.1007/s10530-017-1433-1.
- Vogt, G., Falckenhayn, C., Schrimpf, A., Schmid, K., Hanna, K., Panteleit, J., Helm, M., Schulz, R., Lyko, F., 2015. The marbled crayfish as a paradigm for saltational speciation by autopolyploidy and parthenogenesis in animals. *Biology Open* 4 (11), 1583-1594.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology* 11 (6), 643-669.
- Vogt, G., 2015. Bimodal annual reproductive pattern in laboratory-reared marbled crayfish. *Invertebrate Reproduction and Development* 59 (4), 1-6.
- Vojtkovská, R., Horká, I., Tricarico, E., Ďuriš, Z., 2014. New record of the parthenogenetic marbled crayfish *Procambarus fallax* f. *virginialis* from Italy. *Crustaceana* 87 (11-12), 1386-1392.
- Walker, R. L., 1993. Using crustaceans to illustrate the principles of osmoregulation, acid-base balance, and respiratory physiology. In: (Goldman C. A. B. and Hauta P. L., Eds.) *Tested*

studies for laboratory teaching, Conferences of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 187 pp.

## **8 PŘÍLOHY**



Obr. 4: *Procambarus fallax* f. *virginalis* – rak mramorovaný, dorzální pohled.



Obr. 5: Rak mramorovaný.



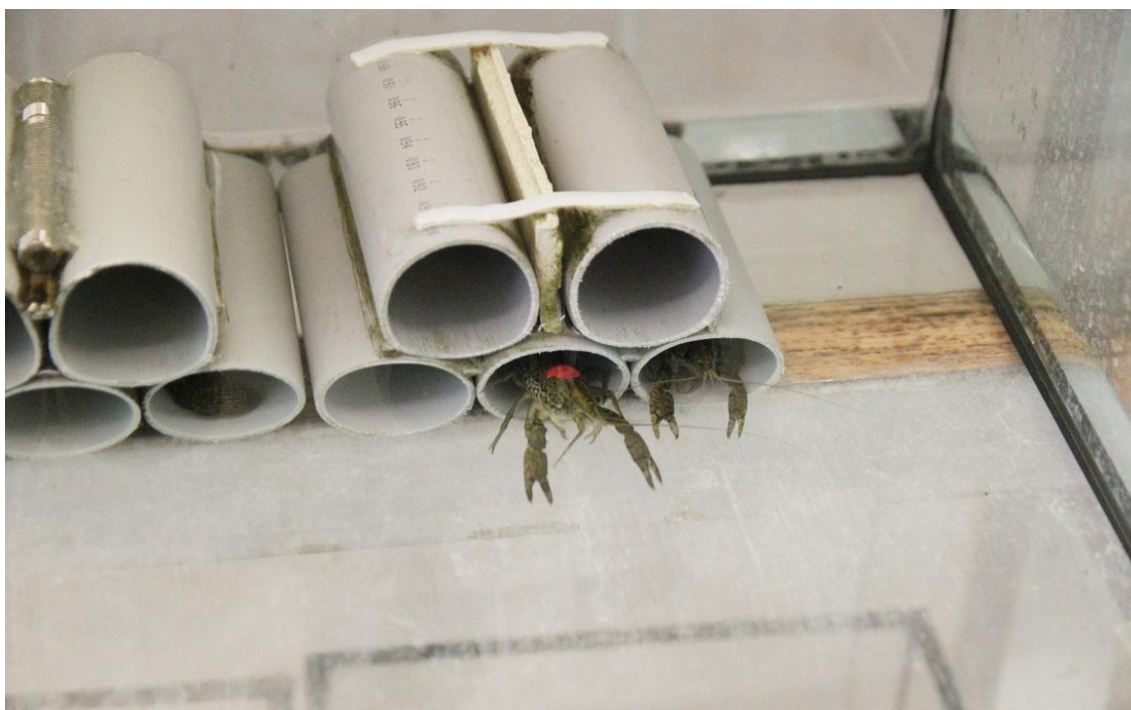
Obr. 6: Vážení, měření a značení raků před započítím experimentu



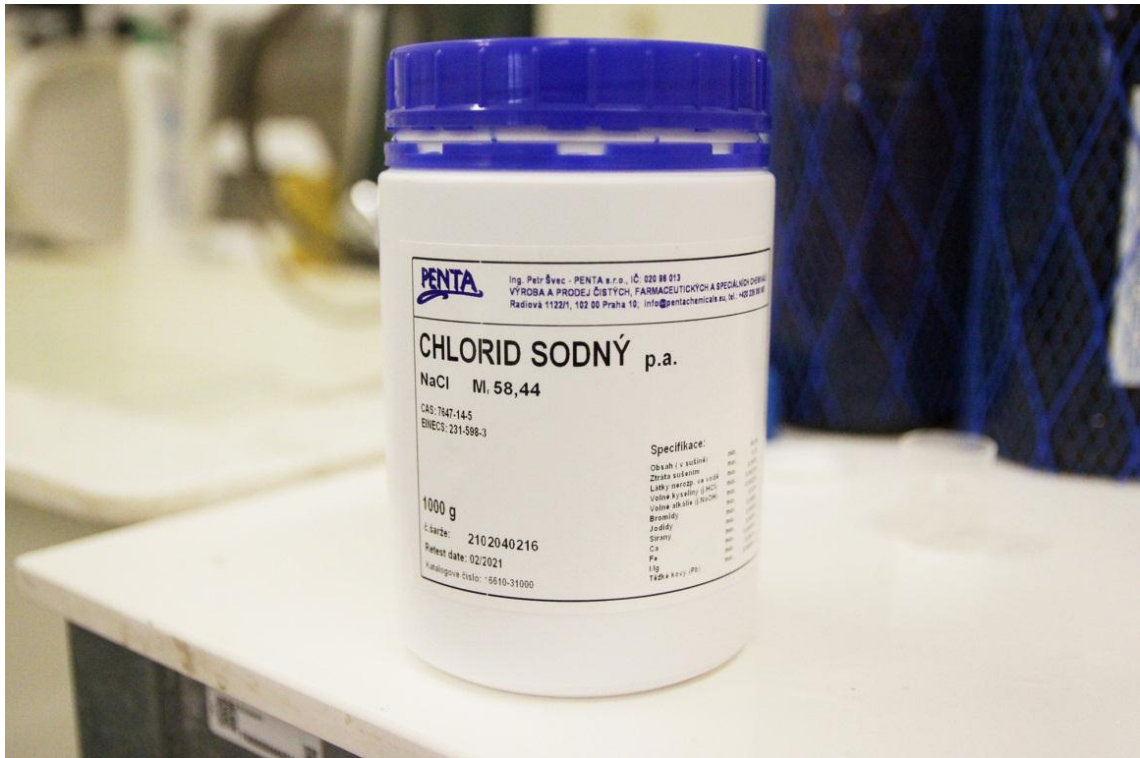
Obr. 7: Rozdělení raků do skupin různých salinit



Obr. 8: Experimentální neprůtočná akvária s umělým osvětlením, úkryty a vzduchovacími kameny.



Obr. 9: Detailní pohled na raky v umělých úkrytech.



Obr. 10: Chlorid sodný, NaCl p.a. (Penta s.r.o.).



Obr. 11: Navážené dávky NaCl pro jednotlivá akvária, respektive skupiny.

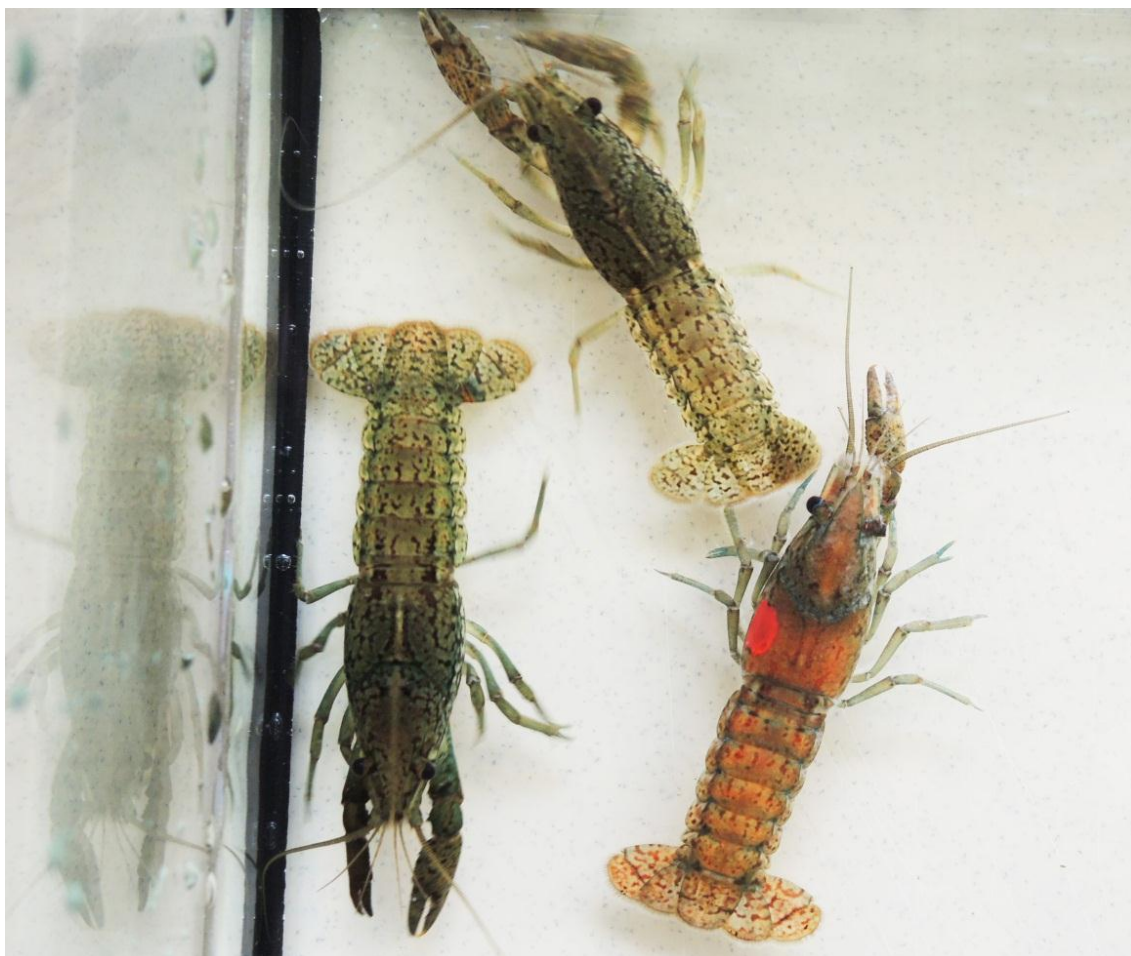




Obr. 12: Suché komerční krmivo s přidavkem řas (Sera Granugreen, Sera GmbH, Německo).



Obr. 13: Rozmražené larvy pakomárů *Chironomus* sp.



Obr. 14: Nalevo a nahoře jedinci s normálním zbarvením, vpravo samice ze skupiny 12 % se změněným zbarvením.

## 9 ABSTRAKT

Východní Evropa zahrnuje významnou část areálu původních druhů raků rodu *Astacus*. Tato oblast byla po dlouhou dobu astakology přehlížena a považována za relativně bezpečnou z pohledu výskytu nepůvodních druhů raků. Nedávný objev dvou populací raka mramorovaného *Procambarus fallax* f. *virginalis* na Ukrajině tento pohled změnil. Rozvinutý obchod s nepůvodními raky na Ukrajině i v Rusku vyvolal obavy z možnosti jejich výskytu v této oblasti. Nepůvodní raci by mohli např. negativně narušit ekosystémy Azovského, Černého a Kaspického moře a jejich přítoků, které jsou obývány původními druhy. V této studii poskytujeme první pohled na toleranci raka mramorovaného vůči zvýšené salinitě vody. Provedli jsme 155-denní experiment s expozicí raků mramorovaných v pěti úrovních salinity (6, 9, 12, 15 a 18 ‰) a kontrole se sladkou vodou. Hodnocení přežití, růstu a reprodukce naznačuje, že rak mramorovaný má nižší toleranci vůči zvýšené salinitě než jiné druhy raků. Toto zjištění může omezit jejich invazivní potenciál v brakickém prostředí. Nicméně, jeho schopnost přežít po více než 90 dní ve skupině s 18 ‰ naznačuje možnost postupné adaptace a následného šíření v brakickém prostředí. V budoucnu bude potřeba dalších studií, které objasní potenciál a míru negativního ovlivnění rakem mramorovaným vůči těmto ekosystémům.

Klíčová slova: brakické prostředí, růst, reprodukce, svlékání, přežívání

## 10 ABSTRACT

Eastern Europe comprises a significant part of the native ranges for indigenous crayfish species (ICS) belonging to the genus *Astacus*. This region has been largely overlooked by astacologists and considered relatively immune to the impacts of non-indigenous crayfish species (NICS). The recent discovery of two marbled crayfish *Procambarus fallax* f. *virginalis* populations in Ukraine has changed this view. The potential increased propagule pressure (mainly due to pet trade), has raised concerns of NICS which may negatively impair the ecosystems of Azov, Black and Caspian Seas and their tributaries inhabited by ICS. In this study, we provide the first insight into salinity tolerance of marbled crayfish. We performed a 155-day experiment using 5 different salinities (6, 9, 12, 15, and 18 ppt) and a freshwater control. Evaluation of survival, growth and reproduction suggests that marbled crayfish have a lower salinity tolerance than other crayfish species, which may limit their invasive potential in brackish environments. However, its ability to survive for more than 90 days at 18 ppt opens up the possibility of gradual dispersion and adaptation to brackish conditions. Our study highlights the need for further studies elucidating the potential for marbled crayfish to negatively impair these ecosystems.

Keywords: brackish environment, growth, reproduction, moult, survival