

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Výskyt a genetická příbuznost populací žábřonožky sněžní
v České republice

Bakalářská práce

Eliška Rydlová

Školitel: prof. RNDr. Jaroslav Vrba, CSc.

Konzultantka: RNDr. Veronika Sacherová, Ph.D., PřF UK v Praze

České Budějovice 2012

Rydlová, E.: Výskyt a genetická příbuznost populací žábřonožky sněžní v České republice.

[Occurrence and genetic relationship of populations of *Eubranchipus grubii* in the Czech Republic. Bachelor thesis, in Czech] 21 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce je napsána formou grantové žádosti na projekt, zabývající se výskytem a genetickou příbuzností populací žábřonožky sněžní v České republice, jehož výsledky umožní lepší ochranu zvláště chráněného druhu.

Annotation:

This thesis has been written as a grant application for project funding. The thesis deals with occurrence and genetic relationship of populations of *Eubranchipus grubii* in the Czech Republic. On the project results appropriate measure for protecting the species can be suggested.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 14. 12. 2012

Eliška Rydlová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Jaroslavu Vrbovi, CSc. za vedení bakalářské práce, cenné rady a připomínky k práci. Také bych ráda poděkovala RNDr. Veronice Sacherové, Ph.D. za cenné rady a připomínky k práci.

Obsah:

1. Shrnutí projektu.....	1
2. Stávající stav poznání.....	2
2.1. Žábronožky	2
2.1.1. Žábronožka sněžní	2
2.1.2. Ostatní žábronožky na území ČR.....	3
2.2. Výskyt žábronožky sněžní na území ČR.....	4
2.2.1. Charakteristika biotopu.....	4
2.2.2. Ohrožení biotopu.....	5
2.2.3. Výskyt žábronožky sněžní v minulosti.....	6
2.2.4. Výskyt žábronožky sněžní v současnosti.....	7
2.3. Strategie přežívání nepříznivých podmínek	8
2.4. Životní cyklus žábronožky sněžní.....	9
2.5. Možnosti šíření.....	10
2.6. Metody vhodné ke srovnání genetické příbuznosti populací žábronožek.....	10
2.6.1. Fylogeografie	10
2.6.2. Metody používané při fylogeografii.....	11
2.6.3. Zpracování vzorku.....	11
3. Projekt	14
3.1. Cíle projektu.....	14
3.2. Hypotéza	14
3.3. Využití výsledků projektu.....	14
4. Návrh provedení projektu	15
4.1. Odběr vzorků	15
4.2. Práce v laboratoři	15
4.3. Zpracování dat a prezentace výsledků.....	16
4.4. Časový harmonogram projektu.....	16
4.5. Finanční náklady projektu	17
5. Závěr.....	18
6. Seznam použité literatury	19

Název projektu: Výskyt a genetická příbuznost populací žábřonožky sněžní v ČR.

1. Shrnutí projektu

Žábřonožka sněžní (*Eubbranchipus grubii*) je jedním z kriticky ohrožených druhů lupenonohých korýšů. Patří mezi jarní druhy. Je vázána na periodicky zaplavované tůně v nížinách v nivách velkých řek. Vyžaduje nízkou teplotu vody.

Poslední dobou se snižuje počet vhodných přirozených stanovišť jejího výskytu. Jsou ohrožena lidskou činností – vodohospodářskými úpravami, vývojem zemědělství, urbanizací, obhospodařováním luk, zarovnávaním s okolním terénem, znečišťováním vody komunálními a průmyslovými odpady.

Žábřonožky během svého života produkují odolné cysty, kterými jsou adaptovány na velmi krátké trvání biotopu. Noví jedinci se líhnou z cyst na konci zimy. Vytvoří se čtyři až šest týdnů, kdy dospějí, spáří se, nakladou vajíčka a poté uhynou. Proschnutí ani promrznutí cyst nijak neovlivňuje líhnutí ani další vývoj žábřonožek.

Šíření žábřonožek probíhá pasivně v podobě cyst. Hlavními vektory šíření jsou vodní ptáci, savci, vodní hmyz, vítr, záplavová vlna nebo lidé, kteří cysty přenášejí na obuvi, oblečení, odběrových sítích, na dopravních prostředcích.

Cílem projektu je zjistit příbuznost populací žábřonožky sněžní v různých povodích na našem území. Tím se zabývá fylogeografie. Fylogeografie je vědní obor, který zkoumá rozšíření živých organismů v určité zeměpisné oblasti a čase. Zjišťuje příbuznost populací určitého druhu. Pro zjištění genetické struktury populace používáme molekulární markery. V kontinentálním měřítku používáme jako marker mitochondriální geny – například cytochrom c oxidázu I, protože má poměrně vysokou mutační rychlost. Získané sekvence mitochondriální DNA uspořádáme do genealogických stromů a sítí. Z nich poté vyčteme, jak si jsou různé populace žábřonožky sněžní příbuzné a jak hodně je žábřonožka sněžní schopna se šířit.

Z výsledků porovnání jednotlivých populací navrhne vhodná opatření k ochraně populací žábřonožky sněžní a místa jejího výskytu.

2. Stávající stav poznání

2.1. Žábronožky

Žábronožky (*Anostraca*) patří mezi korýše (*Crustacea*) třídy lupenonožci (*Branchiopoda*), do tzv. velkých lupenonožců společně s listonohy (*Notostraca*) a škeblovkami (*Conchostraca*). Lupenonožce rozdělujeme na jarní a letní druhy. Vyznačují se tím, že žijí v nestálém prostředí.

Žábronožky mají protáhlé tělo, mírně laterálně zploštělé, měkké, bez krunýře. Dorůstají do délky dvou až tří centimetrů. Plavou otočené hřbetem dolů. Jejich vývoj je nepřímý, larválním stádiem žábronožek je nauplius. Během růstu dochází k několika svlékáním (Sedlák 2003, Brtek 2005).

Hlava je zřetelně oddělená od hrudi. Na bocích hlavy má na stopkách složené oči, mezi nimi se nachází naupliové očko. Pohlavní dimorfismus (Obr. 1.) se projevuje na anténách (tykadla 2. páru) a anténových přívěscích, které jsou u samečků zvětšené a různého tvaru. Používají je k přichycení samičky při kopulaci. Samičky mají tyto antény zakrnělé. Hrud' je složená z jedenácti článků. Každý článek nese jeden pár listových nohou, které využívají k plavání, dýchání a filtraci potravy. Zadeček je složen z devíti článků. Je bez končetin a je zakončený furkou. První dva články jsou srostlé a nesou pohlavní orgány. Samičky na nich mají připevněný jeden nepárový vak s vajíčky (Brtek 2005).

2.1.1. Žábronožka sněžní

Žábronožka sněžní (*Eubbranchipus grubii*) patří mezi jarní druhy lupenonohých korýšů (Brtek 2005). Žije v periodicky zaplavovaných tůních, je vázána na vodu nízké teploty. Její cysty (často nepřesně označovány jako trvalá nebo diapauzní vajíčka) jsou schopny odolávat vyschnutí v období, kdy v tůni není voda (Mertens a kol. 2008). Je jedním ze čtyř druhů vyskytujících se v Evropě, rozšířený od severovýchodní Francie až po evropskou část Ruska (Brtek 2005). V České republice je žábronožka sněžní chráněná zákonem 114/92 Sb. (Rulík a Měkotová 1995), jako kriticky ohrožený druh (Kráal a Štambergová 2005). Místa jejího výskytu jsou ohrožena lidskou činností (Merta 2003).



Foto Jan Rydlo

Obr. 1.: Žábronožka sněžní: a) samice – zřetelný vak s vajíčky, b) samec – zvětšené antény (Libický luh 2012).

2.1.2. Ostatní žábronožky na území ČR

Na našem území se vyskytují další žábronožky, např. žábronožka letní (*Branchipus schaefferi*), která žije v letních periodických tůních vznikajících po deštích na polních i lesních cestách, zaplavovaných loukách, ve vojenských prostorách. Dno tůní je většinou bahnitě. Často se vyskytuje masově i ve velmi malých loužích. Vyskytuje se v nížinách v téměř celé Evropě kromě Velké Británie a severní Evropy.

Žábronožka panonská (*Chirocephalus carmuntanus*) se vyskytuje v jarních periodických tůních, hlavně na orných půdách a pastvinách. Hlavně se vyskytuje na jihozápadním Slovensku, v Maďarsku, Rakousku.

Žábronožka divorohá (*Streptocephalus torvicornis*) je teplomilný druh, i v minulosti se vyskytovala velmi zřídka. U nás se vyskytuje na jediné zanikající lokalitě na Znojemsku.

Všechny tyto druhy jsou u nás kriticky ohrožené (Kavka 2000, Král a Štambergová 2005).

2.2. Výskyt žábronožky sněžní na území ČR

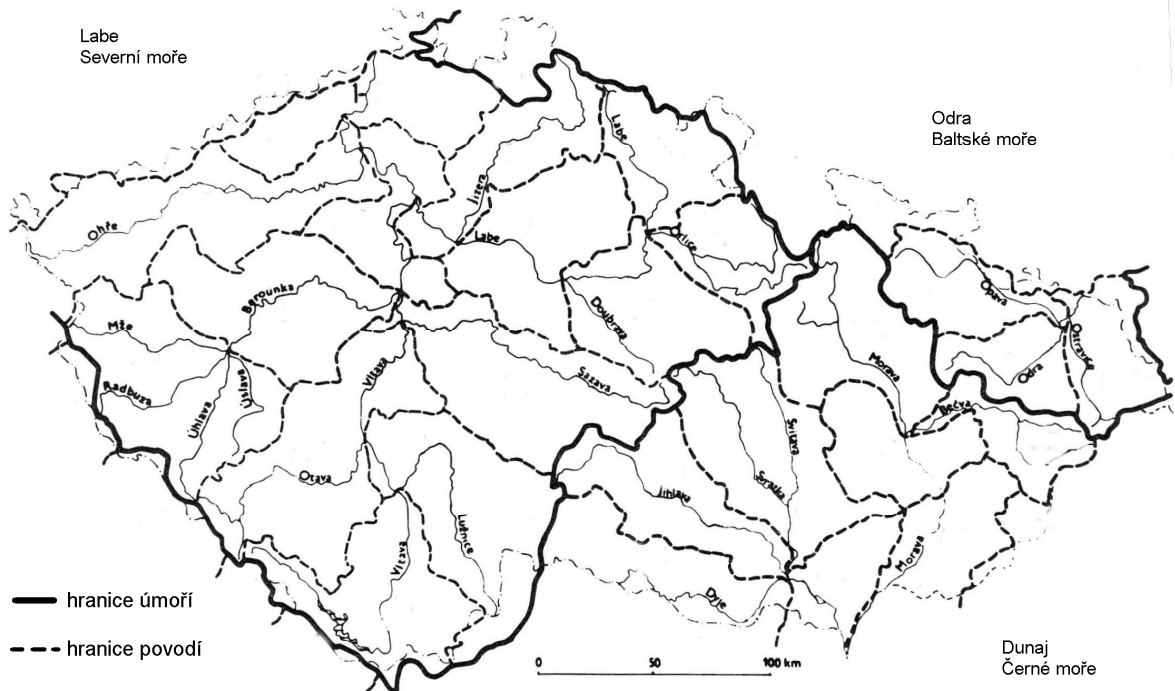
2.2.1. Charakteristika biotopu

V České republice se nacházejí biotopy vhodné pro výskyt žábronožky sněžní v záplavové oblasti velkých řek patřících do povodí řek Labe, Moravy a Odry. Voda je z území České republiky odváděna do tří úmoří. Největší část území odvodňuje Labe se svými přítoky do Severního moře, menší část Morava (Dunaj) a její přítoky do Černého moře, z nejmenší části území odvádí vodu řeka Odra do Baltského moře (Obr. 2.).

Biotopy se nacházejí v nížinách (do 350 m. n. m) v nivách velkých řek. Žábronožka sněžní je vázána na periodicky zaplavované tůně, vyžaduje nízkou teplotu vody. Tůně jsou tvořeny různými terénními depresemi, zbytky starých slepých ramen, vyjetými koleje od automobilů, prohlubněmi u náspů železničních tratí. Tůně se nacházejí v plochých povodňových územích velkých řek, většinou v nížinách (Valoušek 1951, Brtek 2005). Vlastnosti malých periodických tůní jsou často náhodné, dochází k nepředvídatelným změnám způsobeným výkyvy počasí nebo lidskou činností (Goldyn a Bernard 2008).

Území České republiky je geograficky nejjižnější oblastí, kde se žábronožka sněžní vyskytuje. Během zimy jsou zde nízké teploty, dochází k vysychání tůní. Dříve se myslelo, že je vysychání důležité pro vývoj žábronožky sněžní. Dnes je již dokázáno, že to neovlivňuje líhnutí ani její další vývoj (Merta 2003). Zjara jsou tůně napájené podzemní vodou, jejíž hladina stoupá díky tajícímu sněhu, díky tomu je voda přefiltrovaná přes písky, oligotrofní a studená. Méně pak se tůně naplňují vodou z vydatných dešťů nebo jarními záplavami, které jsou způsobeny táním sněhu na horách (Brtek 2005).

Tůně jsou většinou zastíněné stromy a keři (Kavka 2000). Po nějaké době po naplnění vodou tůně vysychají. K vysychání dochází na konci dubna nebo na začátku května. Na dně jsou tlející listy a zbytky vegetace, proto nedochází k úplnému vyschnutí sedimentu, kde jsou uloženy cysty (Merta 2003).



Obr. 2.: Územní rozložení jednotlivých úmoří a povodí v České republice (Vlček 1984).

2.2.2. Ohrožení biotopu

Poslední dobou klesá počet vhodných přirozených stanovišť, kde se žabronožky sněžní vyskytují. Stanoviště jsou celosvětově narušována lidskou činností. Narušení může být způsobeno mechanicky (změny toku, změny krajiny – zemědělství, urbanizace) nebo změnou množství živin (eutrofizací) (Goldyn a Bernard 2008).

V minulosti se prováděly rozsáhlé vodohospodářské úpravy: regulace vodních toků velkých řek – záměrné odstraňování meandrů a napřimování toků, opevňování říčních koryt a jejich ohrazování, budování vodních nádrží. Vybudované vodní nádrže zamezují každoročně se opakujícím záplavám (Machar 1998). Vodohospodářské úpravy způsobily změny hydrologických podmínek. Např. nádrž Nové Mlýny na řece Dyji narušila nejrozsáhlejší lužní krajinu v České republice a její přirozenou dynamiku. Kvůli lodní dopravě se zahlubovala říční koryta (dno většiny tůní je nad hladinou podzemní vody), tím došlo k poklesu hladiny podzemní vody a ke zničení mnohých přirozených stanovišť žabronožky sněžní (Rulík a Měkotová 1995).

K ničení biotopu docházelo také vývojem zemědělství (přeměna území na zemědělskou půdu, hnojení, používání chemikálií), urbanizací (výstavbou silnic a znečištěním z nich, skládkami, rekreačními zařízeními), obhospodařováním luk, zasyčením nebo odvodněním mokřadů (Eder a Hödl 2002). Tůň se zavázely odpadem a srovnávaly s okolním terénem (Sovíková 1996).

Dalším problémem je znečišťování vody komunálními a průmyslovými odpady a splachy z velkoplošné aplikace agrochemikálií (Mocek a Mikátová 2005).

Labe bylo upraveno pro lodní dopravu (dovoz uhlí pro elektrárnu Chvaletice), krajina je v povodí Labe více pozměněna lidskou činností. Na Moravě jsou vhodná stanoviště zachovalejší než v Čechách.

2.2.3. Výskyt žábřonožky sněžní v minulosti

Ze starší literatury z konce 19. století a první poloviny 20. století je zřejmé, že tento druh zde nebyl vzácný a vyskytoval se na dnešním území České republiky v okolí řek Labe, Moravy a Odry často v početných populacích (Mocek a Mikátová 2005).

Starší nálezy žábřonožky sněžní v Polabí jsou shrnuty v pracích Mocek a Mikátová (2005), Měkotová a kol. (1996). Autoři popisují její hojný výskyt. Dále Kapler (1939, 1941, 1943) popisuje na jižní Moravě velmi častý výskyt žábřonožky sněžní na několika lokalitách u Podivína a na soutoku Moravy a Dyje. O výskytu žábřonožky sněžní v povodí Odry jsem nenalezla žádné podklady. Je možné, že jsou uvedeny ve starší německy psané literatuře.

Tyto nálezy jsou shrnuty v tabulce (Tab. I.) a zeleně vyznačeny na obrázku (Obr. 3.).

Tab. I.: Starší nálezy žábřonožky sněžní na území České republiky.

povodí	lokalita	původní citace nálezu
Labe	východní Polabí*	Frič 1872**
		Vodák 1903-1904**
		Šrámek-Hušek 1940***
	Pardubicko	Šrámek-Hušek 1941***
Morava (Dunaj)	dolní tok Dyje	Kapler 1939, 1941, 1943

*východní část Polabské nížiny, mezi městy Hradec Králové a Týnec nad Labem

**uvedeno v Mocek a Mikátová (2005)

***uvedeno v Měkotová a kol. (1996)

2.2.4. Výskyt žábřonožky sněžní v současnosti

V současné době je výskyt žábřonožky sněžní vzácný. Tůň vhodné pro výskyt jsou rozptýleny v krajině v nížinách, v nivách velkých řek (Labe, Dunaj a Odra). Protože se jedná o dolní toky řek, je zde největší narušení biotopů. Tůň se nacházejí v oblastech, kde je nejméně porušený stav lužního lesa. Na územích je zachován přirozený režim pravidelných záplav (Sovíková 1996). Na Moravě jsou lužní lesy v zachovalejším stavu než v Čechách.

Současné nálezy jsou shrnuty v tabulce (Tab. II.) a červeně vyznačeny na mapě (Obr. 3).

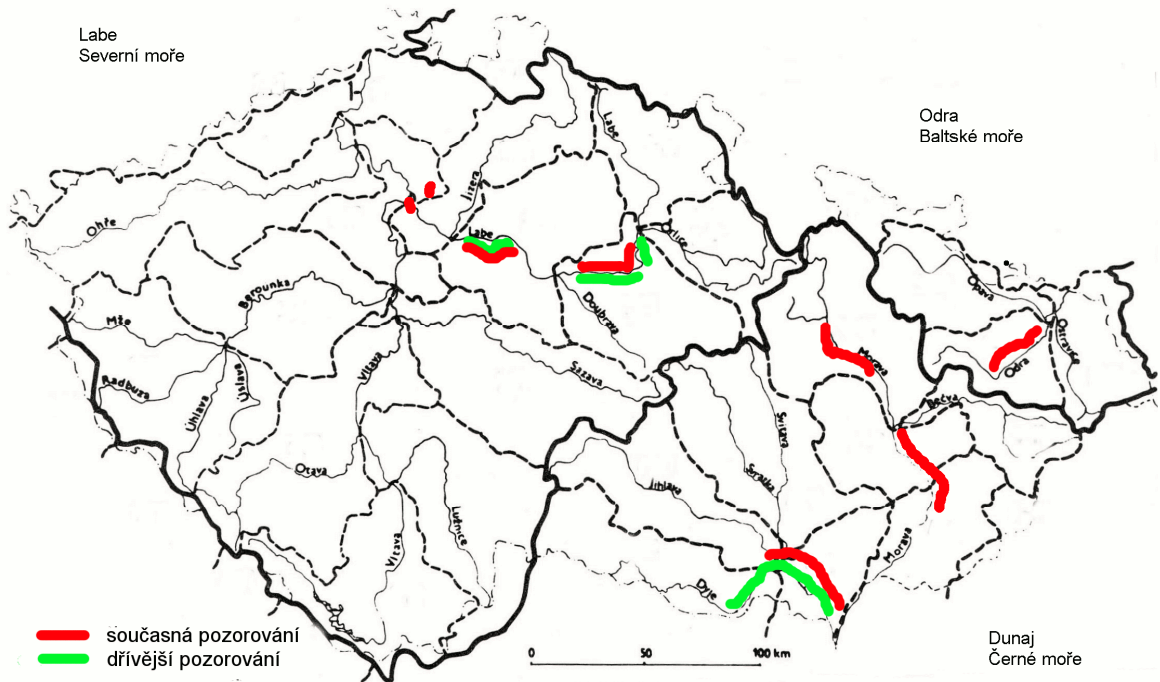
Tab. II.: Současné nálezy žábřonožky sněžní na území České republiky.

povodí	lokalita	původní citace nálezu
Labe	východní Polabí*	Mocek a Mikátová 2005
	Libický luh	Rychtrmocová 2008
	soutok Labe a Vltavy	Rychtrmocová 2008
	Kokořínsko	Rychtrmocová 2008
Morava (Dunaj)	Litovelské Pomoraví	Rulík a Měkotová 1995
		Měkotová a kol. 1996
	střední Pomoraví**	Rychtrmocová 2008
	Soutok Moravy a Dyje	Rychtrmocová 2008
Odra	Poodří	Sovíková 1996

*východní část Polabské nížiny, mezi městy Hradec Králové a Týnec nad Labem

**mezi městy Přerov a Uherské Hradiště

V poslední době se výskyt žábřonožky sněžní nejvíce studoval na území Chráněné krajinné oblasti Litovelské Pomoraví, které je tvořeno sítí slepých ramen řeky, která se naplňují vodou při povodních a vysokých stavech vody. Území má dosud nenarušenou záplavovou dynamiku řeky Moravy. Dnes je největším areálem v České republice s vhodnými podmínkami pro výskyt žábřonožky sněžní (Rulík a Měkotová 1995, Měkotová a kol. 1996).



Obr. 3.: Pozorování žábřonožky sněžní v minulosti (viz Tab. I.) a v současnosti (Tab. II.).

Dále se výzkum prováděl v Chráněné krajinné oblasti Poodří. Území tvoří niva řeky Odry a na ni navazující okraje říčních teras a terasových plošin. V této oblasti se nacházejí stará ramena řeky a periodické tůně. Je zde zachovaný přirozený režim pravidelných záplav (Sovíková 1996).

Výskyt žábřonožky sněžní se sledoval i ve východním Polabí (východní část Polabské nížiny, mezi městy Hradec Králové a Týnec nad Labem), v Libickém luhu, na soutoku Labe a Vltavy a na Kokořínsku. Území je protkáno sítí slepých ramen Labe a kanálů (Mocek a Mikátová 2005, Rychtrmocerová 2008).

2.3. Strategie přežívání nepříznivých podmínek

Žábřonožky sněžní během svého života produkují odolné cysty (embrya s pozastaveným vývojem ve stádiu gastruly). Tím jsou žábřonožky adaptovány na velmi krátké trvání biotopu. Jsou tak schopny přežít období od vyschnutí tůně až do dalšího jarního naplnění (asi osm měsíců). Ve formě cyst přežívají nepříznivé podmínky, např. sucho, nízké koncentrace kyslíku, příliš vysoké nebo příliš nízké teploty vody. Cysty jsou odolné proti

vyschnutí a promrznutí. Hromadí se v sedimentu krytém spadlým listím a odumřenou vegetací, kde je po dobu, kdy je tůň vyschlá, dostatečná vlhkost. Zde jsou schopny přežít několik let až desetiletí (Hairston 1996).

Po zaplavení tůň se nevylihnuou všechna vajíčka najednou, část zůstane dormantní a líhne se později (strategie bet-hedging – tu využívají organismy žijící v nestálých podmínkách) (Simovich a Hathaway 1997). Žábronožka se tak chrání pro případ, že by tůň předčasně vyschla nebo promrzla, a tím by zahynula všechna vývojová stadia před dospěním (Brtek 2005). Populace je tak chráněna proti vyhynutí (Hairston 1996).

Pokud nejsou vhodné podmínky pro líhnutí (je příliš suchá zima, nejsou jarní záplavy a tůň se nenaplní potřebnou vodou), vylíhne se pouze malá část vajíček. Větší část přečká do dalších let, až se pro ně vytvoří vhodné životní podmínky (Hairston 1996).

2.4. Životní cyklus žábronožky sněžní

Žábronožky sněžní mají pouze jednu generaci za rok. Líhnou se a dospívají po naplnění tůň jarní vodou nízké teploty. Začnou se líhnout z cyst ke konci zimy na konci února až začátku března, kdy je tůň s cystami zaplavena chladnou vodou nebo roztaje led. Vyvíjí se čtyři až šest týdnů, kdy dosáhnou pohlavní dospělosti, spáří se a nakladou vajíčka do vody. Poté rychle uhynou (Kavka 2000).

K úspěšnému líhnutí není nutné úplné vyschnutí cysty. Promrznutí cysty nijak negativně neovlivní a nemá žádný vliv na líhnutí a další vývoj žábronožky sněžní (Merta 2003). Líhnutí je synchronizované, obvykle způsobené změnou fyzikálně chemických vlastností vody (teplota) (Mossin 1986). Líhnutí je dvoufázový proces. První fáze je zahájena na konci podzimu, kdy začne klesat teplota vody. Končí, když nauplius rozbije skořápku vajíčka. Nauplius je ještě uzavřen v průhledném blastodermálním obalu. Ve druhé fázi líhnutí (konec února, začátek března) praská průhledný obal a nauplius volně plave ve vodě (Mossin 1986). Nízká teplota vody je nezbytná pro úspěšné líhnutí, ovlivňuje první fázi líhnutí (Merta 2003). Žábronožky se líhnou při teplotě vody 0°C (Valoušek 1951).

Vývin od vylíhnutí až do dospělosti probíhá několika larválními a postlarválními stadii, která mají poměrně rychlý růst, proto dochází k častému svlékání. Rychlost vývoje ovlivňuje teplota vody a doba, po kterou je tůň zavodněna. Když je voda příliš chladná, vývoj a růst se zpomalí nebo úplně zastaví (Brtek 2005).

2.5. Možnosti šíření

Šíření probíhá výhradně v podobě cyst. Přestože jsou tůně od sebe oddělené, může docházet k transportu cyst z jedné tůně do druhé. Šíření je ovlivněno vzdáleností mezi tůněmi a probíhá pasivně (aktivního šíření nejsou schopny) (Beladjal a Mertens 2009). Hlavními přirozenými vektory šíření jsou vodní ptáci, savci, vodní hmyz, vítr (pouze malé množství cyst, jen na krátké vzdálenosti), záplavová voda (Green a Figuerola 2005). Vodní ptáci přenášejí cysty na nohách, peří nebo v zažívacím traktu. Vodní hmyz je transportuje v zažívacím traktu (odolné cysty nejsou poškozeny) (Beladjal a Mertens 2009). Na končetinách a v srsti přichycené cysty může přenášet lesní zvěř (divoká prasata, spárkatá zvěř). Často přehlíženou možností přesunu vajíček jsou lidé. Ti mohou vajíčka přenášet na oblečení, na obuvi, na pneumatikách kol dopravních prostředků, na odběrových sítích (Waterkeyn a kol. 2010).

2.6. Metody vhodné ke srovnání genetické příbuznosti populací žábřonožek

Budeme srovnávat genetickou příbuznost populací žábřonožky sněžní na našem území. Tím se zabývá vědní obor fylogeografie. Díky zjištěné genetické příbuznosti můžeme navrhnout možná opatření na ochranu žábřonožky sněžní a habitatů, ve kterých se vyskytuje.

2.6.1. Fylogeografie

Fylogeografie je vědní obor, který zkoumá, jak se rozšiřují živé organismy v určité zeměpisné oblasti a čase, a jejich příbuznost. Fylogeografie je součástí biogeografie. Spolu s ekogeografií vysvětluje rozšíření organismů. Fylogeografie vysvětluje rozšíření organismů vlivem historických procesů, ekogeografie přirozeným výběrem. Fylogeografie vznikla v 2. polovině 20. století, kdy technologický rozvoj umožnil srovnávat sekvence DNA. Obor bere v úvahu mikroevoluci a makroevoluci a propojuje takové obory jako je populační genetika a fylogenetika (Avice 2000).

Fylogeografie zjišťuje příbuznost populací určitého druhu, z ní pak odvozuje jeho šíření v minulosti a rozšíření druhu na určitém území.

2.6.2. Metody používané při fylogeografii

Fylogeografické metody slouží ke zjišťování genetické příbuznosti genealogických linií na určitém území. Genetickou strukturu populace odvozujeme z genetické charakteristiky jedinců použitím různých molekulárních markerů.

Pro zjištění genetické variability populací v regionálním měřítku se jako markery používají allozymy (enzym kódovaný různými alelami jednoho genu) (ve své práci použili např. Gusmao a kol. 2000, Cox a Hebert 2001). Mitochondriální geny mají uplatnění hlavně v kontinentálním nebo mezikontinentálním měřítku – cytochrom c oxidáza I (CO I) (např. Verovnik a kol. 2004, Munoz a kol. 2008, Zakšek a kol. 2009) nebo některé podjednotky genu pro NADH dehydrogenázu (např. Weider a kol. 1999). Také se používají mitochondriální geny umístěné na malé a velké ribosomální podjednotce (12S rDNA, 16S rDNA) (např. Braband a kol. 2002, Zakšek a kol. 2009). Další možností jsou mikrosatelity (krátké opakující se sekvence DNA), které mají poměrně vysokou mutační rychlost a tím vykazují velkou variabilitu (např. Pálsoon 2000, Mergeay a kol. 2005).

Různé markery se vyvíjejí různě rychle, proto se volí podle toho, co chceme zjišťovat – jak staré události, na jak velkém území chceme vysledovat změny. Často se využívá kombinace více markerů.

K zjištění genetické příbuznosti žabronožky sněžní na území České republiky (zjišťujeme na velkém území) použijeme mitochondriální geny – cytochrom c oxidázu I. Mají poměrně vysokou mutační rychlost, proto je mitochondriální DNA použitelná k hodnocení genetické příbuznosti jedinců nebo skupin v rámci druhů. Gen je dobře prozkoumaný. (Verovnik a kol. 2004, Zakšek a kol. 2009).

2.6.3. Zpracování vzorku

Ze vzorku nejprve extrahujeme DNA. Pomocí PCR (polymerázová řetězcová reakce) namnožíme požadovaný úsek DNA, který sekvenujeme v servisní laboratoři (Verovnik a kol. 2004). Sekvence vyhodnotíme pomocí dostupných programů, které nám umožní vyhodnotit variabilitu, počty mutací, příbuznost jedinců a fylogenezi daného taxonu (Zakšek a kol. 2009).

Získané sekvence mitochondriální DNA uspořádáme do genealogických stromů nebo sítí. Při rekonstrukci fylogeneze použijeme jeden ze základních přístupů – určíme přesné pořadí kroků (definování algoritmu) vedoucích ke konstrukci fylogenetického stromu nebo

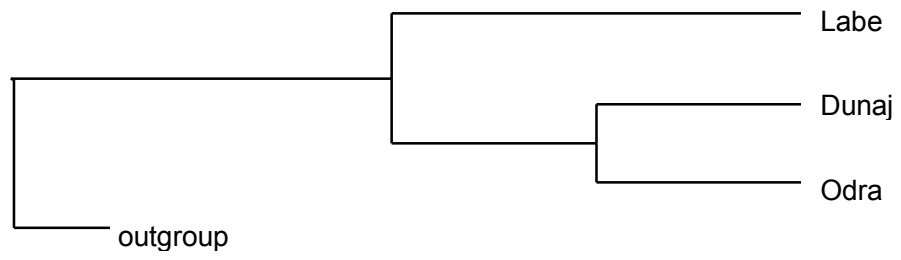
definujeme kritérium optimálnosti pro srovnávání alternativních stromů (Holder a Lewis 2003).

Při algoritmických metodách se používají distanční data (sekvence DNA jsou převedeny do genetických vzdáleností), z kterých se poměrně snadno vytvoří nejpravděpodobnější fylogenetický strom (Holder a Lewis 2003).

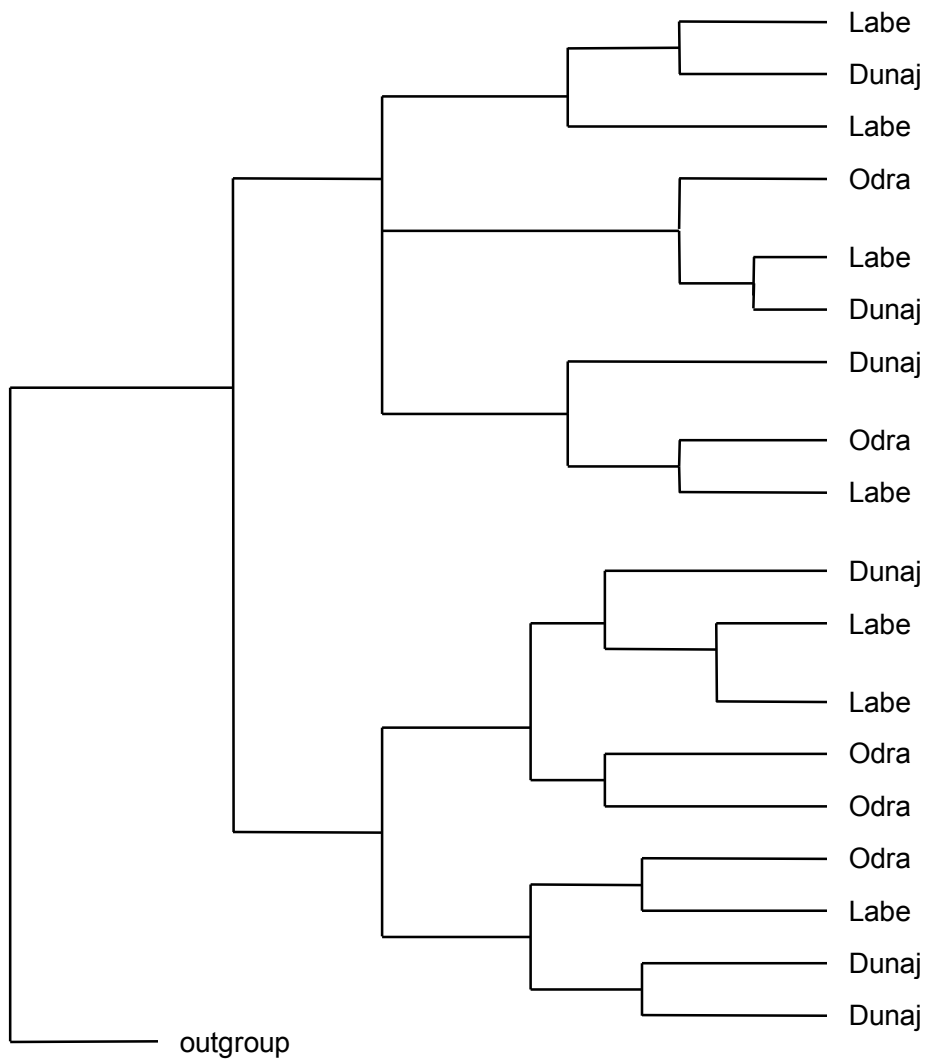
Při určení kritéria optimálnosti se používají distanční data nebo rovnou sekvence DNA – znaková data. Při této metodě se většinou porovnává velké množství stromů, proto vybrání nejvhodnějšího stromu často trvá dlouho. Pro znaková data se jako kritéria optimálnosti nejčastěji používají maximální pravděpodobnost (Maximum likelihood) a maximální úspornost (Maximum parsimony) (Holder a Lewis 2003).

Při použití metody maximální pravděpodobnosti se porovnává u alternativních fylogenetických stromů pravděpodobnost, jak správně vysvětlují pozorovaná data. Výsledkem této metody je strom s největší pravděpodobností. Metoda maximální úspornosti vybírá strom s nejmenším počtem evolučních kroků (strom s minimální celkovou délkou), které objasňují vstupní data. Společné znaky jsou vysvětlovány jejich společným původem (Holder a Lewis 2003).

Z fylogenetického stromu vyčteme, jak jsou populace žabronožky sněžní příbuzné. Na obrázcích (Obr. 4., Obr. 5.) jsou znázorněny hypotézy rozšíření jejich populací. V prvním případě (Obr. 4.) jsou populace v různých povodích geneticky odlišné. Z toho vyplývá, že se žabronožky mezi povodími nijak nešíří. V druhém případě (Obr. 5.) je zřejmé, že se žabronožky mezi povodími lehce šíří. Populace si jsou geneticky podobnější.



Obr. 4.: Varianta 1 – populace nejsou příbuzné.



Obr. 5.: Varianta 2 – populace jsou příbuzné.

3. Projekt

Tento projekt přispěje k návrhům, jak vhodně nakládat s lokalitami, kde se žábronožky vyskytují. Z ochrannářského hlediska budeme moci z výsledků usoudit, jaký zvolit způsob ochrany žábronožky sněžní a jejího biotopu. Z toho vyplývají cíle a hypotéza.

3.1. Cíle projektu

Srovnat genetickou příbuznost populací žábronožky sněžní.

Přispět k návrhu opatření k ochraně populací žábronožky sněžní.

3.2. Hypotéza

Populace žábronožek sněžních jsou si příbuznější v rámci jednoho povodí než mezi povodími (budou tři skupiny – povodí Labe, Odry a Dunaje).

3.3. Využití výsledků projektu

Když se ukáže, že se podobné genotypy objevují v různých povodích, tzn. že se žábronožky dobře šíří krajinou, bude vhodné revitalizovat ty úseky říčních niv, kde jsou v současnosti habitaty již zničené a úplně chybí, aby vznikly lokality zcela nové. Dá se předpokládat, že se tam zanesou nové cysty a dojde k osídlení žábronožkami.

Kdyby byly její populace mezi povodími hodně geneticky odlišné, krajinou se šíří omezeně, a pak bude vhodné především soustředit ochranu na stávající biotopy – chránit je, provádět jejich revitalizace (aby nedošlo například k zazemnění), eventuálně rozšiřovat počet lokalit v jejich bezprostřední blízkosti.

4. Návrh provedení projektu

4.1. Odběr vzorků

Odběr vzorku k určení genetické příbuznosti žábronožky sněžní bude proveden v povodích řek Labe, Dunaje a Odry. Vzhledem k tomu, že se jedná o zvláště chráněný druh, je nutné si vyžádat povolení od Ministerstva životního prostředí ke zkoumání druhu. Budeme se snažit odebrat minimálně deset populací v každém povodí, z každé populace alespoň deset jedinců. V každém povodí bude vzorek odebrán z náhodně vybraných tůní tak, aby bylo rovnoměrně pokryto celé území České republiky. Odběr bude proveden na konci března nebo během dubna (v závislosti na aktuálním zavodnění tůní). Pro odběr vzorku budou použity planktonní sítě (velikost ok 100 μm) na teleskopických tyčích a cedníky, následně budou vzorky fixovány v 96% etanolu do doby než budou použity k zjišťování genetické příbuznosti.

4.2. Práce v laboratoři

Veškeré laboratorní práce budou provedeny v Laboratoři genomiky (Ústav molekulární biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích).

Hrudní končetiny žábronožky sněžní vložíme do mikrozkuhavky s předem připraveným roztokem proteinázy K. Mikrozkuhavku umístíme do topného bloku nastaveného na 55 °C, nejméně na 4 hodiny nebo déle. Poté budeme denaturovat proteinázu při teplotě 95 °C po dobu 10 minut. DNA izolát budeme skladovat při 4 °C.

Pro amplifikaci mitochondriálního genu cytochrom c oxidázy použijeme PCR. Kontrolu PCR produktů provedeme horizontální elektroforézou. Na gel nanese 1 μl PCR produktu smíchaný s nanášecím pufrem. Délku amplifikovaných fragmentů srovnáme se standardem. Poté PCR přečistíme. Koncentraci DNA změříme spektrofotometricky pomocí přístroje. Pro sekvenaci vzorků využijeme servisní laboratoř (Verovnik a kol. 2004, Zakšek a kol. 2009).

4.3. Zpracování dat a prezentace výsledků

Získané sekvence budeme editovat pomocí některého z volně dostupných programů (BioEdit, MEGA apod.). Provedeme analýzy sekvencí. Jako outgroup použijeme jiný druh ze stejného rodu.

Výsledky uveřejníme v odborných a popularizačních časopisech a na mezinárodní konferenci. Ze získaných výsledků navrheme vhodná opatření, jak nakládat s lokalitami, kde se žabronožka sněžní vyskytuje – revitalizace říční nivy nebo přímo ochrana biotopu, kde se vyskytuje.

4.4. Časový harmonogram projektu

Projekt bude realizován během roku 2013. Odběr všech vzorků proběhne nejspíše během měsíce dubna (odběr je limitovaný dobou výskytu živých stádií žabronožky sněžní, záleží na aktuálním zavodnění tůní). Práce v laboratoři (extrakce DNA, amplifikace DNA, sekvenace DNA) bude provedena v květnu až srpnu. Statistické hodnocení výsledků provedeme během září až listopadu. Vyhodnocení celého projektu a prezentace výsledků se uskuteční do konce roku 2013.

Tab. III.: Časový plán pro navrhovaný projekt.

	březen – duben	květen – srpen	září – prosinec
sběr vzorků			
práce v laboratoři			
vyhodnocení dat			

4.5. Finanční náklady projektu

Finanční náročnost projektu je shrnuta v tabulce (Tab. IV.).

Tab. IV.: Finanční náročnost navrhovaného projektu.

	náklady [Kč]
cestovní náklady	40 000
materiál na potřeby pro zpracování vzorků v laboratoři	86 000
licence na speciální software	4 000
prezentace a archivace výsledků	10 000
věcné prostředky celkem	188 000
mzda řešitelů	142 000
sociální a zdravotní pojištění	52 000
celkové náklady	382 000

Cestovní náklady – pohonné hmoty, ubytování, stravné, účast na mezinárodní konferenci.

Materiál na potřeby pro zpracování vzorků v laboratoři – izolační kit k izolaci DNA a pro amplifikaci DNA, laboratorní sklo, nádoby na uskladnění vzorků, apod.

Prezentace a archivace výsledků – datová média, fotografické materiály, tisk posterů, apod.

Mzda řešitelů – hlavní řešitel úvazek 50 %, spoluřešitel úvazek 25 %

5. Závěr

Žábronožka sněžní je jedním z kriticky ohrožených druhů lupenonohých korýšů. Je vázána na jarní periodicky zaplavované tůně v nížinách v nivách velkých řek. Vyžaduje nízkou teplotu. V současné době je tento druh nejvíce ohrožován zánikem vhodných přirozených biotopů především lidskou činností.

Porovnáním genetické příbuznosti populací žábronožky sněžní ve třech různých povodích v České republice zjistíme, jak moc jsou žábronožky schopné se šířit krajinou. Poté můžeme navrhnout způsob ochrany žábronožky sněžní – zda je nezbytné chránit pouze stávající biotopy nebo je možné provést revitalizaci úseků říční nivy, kde jsou v současné době biotopy zničené nebo zcela chybí, aby vznikly zcela nová stanoviště, do kterých se žábronožka rozšíří.

6. Seznam použité literatury

- Avise J. C. (2000): Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge (Massachusetts): Harvard University Press. 447 s.
- Beladjal L., Mertens J. (2009): Diaspore dispersal of Anostraca by flying insects. *Journal of Crustacean Biology* 29: 266-268.
- Braband A., Richter S., Hiesel R., Scholtz G. (2002): Phylogenetic relationships within the *Phyllopoda* (Crustacea, Branchiopoda) based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 229-244.
- Brtek J. (2005): Fauna Slovenska: *Anostraca*-žiabronôžky, *Notostraca*-štítovky, *Spinicaudata*-škľabkovky, *Laevicaudata*-hrachovky, (Crustacea: Branchiopoda). 1. vydání. Bratislava: Veda, 143 s.
- Cox A. J., Hebert P. D. N. (2001): Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10: 371-386.
- Eder E., Hödl W. (2002): Large freshwater branchiopods in Austria: Diversity, threats and conservational status. In: Escobar E., Alvarez F. [eds.]. *Modern approaches to the study of crustacea*, Kluwer: 281-289.
- Goldyn B., Bernard R. (2008): Preliminary date on the distribution and phenology of *Eubranchipus grubii* (Dybowski 1860) (Crustacea: Anostraca) in the Wielkopolska region. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin – Polonia, Sectio C* 63 (2): 23-29.
- Green A. J., Figuerola J. (2005): Recent advances in the study of long distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions* 11: 149-156.
- Gusmao J., Lazoski C., Solé-Cava A. M. (2000): A new species of *Penaeus* (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrom oxidase I analyses. *Marine Biology* 137: 435-446.
- Hairston N. G., Jr. (1996): Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography* 41 (5): 1087-1092.
- Holder M., Lewis P. O. (2003): Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4: 275-284.
- Kapler O. (1939): Ze života vyšších lupenonožců (*Euphyllopoda*). *Příroda* 32, 2: 1-7.
- Kapler O. (1941): Ze života lupenonožců (*Euphyllopoda*). IV: Vývoj *Chirocephalopsis grubii* Dyb. *Příroda* 34, 9-10: 225-231.
- Kapler O. (1943): Ze života lupenonožců známých z území Moravy. *Příroda* 35, 6:167- 178.

- Kavka T. (2000): Listonozi, žábřonožky a škeřlovky v přírodě a chovu. *Živa* 5: 224-227.
- Král D., Štambergová M. (2005): *Branchiopoda* (lupenonožci). In: Farkač J., Král D. a Škorpík M. [eds.], Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí. List of threatened species in the Czech Republic. Invertebrates. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, 90-91.
- Machar I. (1998): Ochrana lužních lesů a olšin. Ochrana biologické rozmanitosti. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. Praha. 31 s.
- Měkotová J., Rulík M., Kršková M., (1996): Příspěvek k poznání rozšíření a ekologických nároků žábřonožky sněžní (*Siphonophanes grubii* Dybowski, 1860) a listonoha jarního (*Lepidurus apus* L., 1758) v CHKO Litovelské Pomoraví. In: Sborník ze semináře „Ochrana biodiverzity drobných stojatých vod“. ZO ČSOB Vlašim: 45-57.
- Mergey J., Verschuren D., De Meester L. (2005): Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa. *Limnology and Oceanography* 50(4): 1278-1283.
- Merta L. (2003): Prehatching success of *Eubranchipus* (*Siphonophanes*) *grubii* (Crustacea, *Anostraca*) under the influence of some environmental factors. *Biologia*. Bratislava 58/5: 919-924.
- Mertens J., Beladjal L., Alcantara A., Fougnyes L., Van Der Straeten D., Clegg J. S. (2008): Survival of dried eukaryotes (anhydrobiotes) after exposure to extremely high temperatures. *Journal of the Linnean Society* 93: 15-22.
- Mocek B., Mikátová B. (2005): Žábřonožky (*Anostraca*) a listonožky (*Notostraca*) (*Crustacea: Phyllozoa*) východního Polabí. Vč. Sb. Přír. – práce a studie, 12: 143-152.
- Mossin J. (1986): Physicochemical factors inducing embryonic development and spring hatching of the european fairy shrimp *Siphonophanes grubei* (Dybowski) (Crustacea: Anostraca). *Journal of Crustacean Biology* 6: 693-704.
- Munoz J., Gómez A., Green A. J., Figuerola J., Amat F., Rico C. (2008): Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (*Branchiopoda: Anostraca*). *Molecular Ecology* 17: 3160-3177.
- Pálsoon S. (2000): Microsatellite variation in *Daphnia pulex* from both sides of the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 9: 1075-1088.
- Rulík M., Měkotová J. (1995): Program sledování jarních periodických tůní v CHKO Litovelské Pomoraví. *Ochrana přírody* 50. č.3: 67-70.

- Rychtrmocová H. (2008): Vliv možnosti šíření žábřonožek (*Crustacea: Anostraca*) na genetickou strukturu populací. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 104 s.
- Sedlák E. (2003): Zoologie bezobratlých. 2. přepracované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 336 s.
- Simovich M. A., Hathaway S. A. (1997): Diversified bet-hedging as a reproductive strategy of some ephemeral pool anostracans (*Branchiopoda*). *Journal of Crustacean Biology* 17: 38-44.
- Sovíková L. (1996): Periodické tůně v CHKO Poodří. In: Sborník ze semináře „Ochrana biodiverzity drobných stojatých vod“. ZO ČSOP Vlašim: 99-101.
- Valoušek B. (1951): Periodická sněžní tůň jako biotop. *Práce Moravskoslezské Akademie věd přírodních.* 23, 20: 411-436.
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. (2004): Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (*Crustacea: Isopoda*). *Molecular Ecology* 13: 1519-1532.
- Vlček V. (1984): Vodní toky a nádrže. 1. vydání. Praha: Academia, 315 s.
- Waterkeyn A., Vanschoenwinkel B., Elsen S., Anton-Pardo M., Grillas P., Brendonck L. (2010): Unintentional dispersal of aquatic invertebrates via footwear and motor vehicles in a Mediterranean wetland area. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 20: 580-587.
- Weider L. J., Hobaek A., Colbourne J. K., Crease T.J., Dufresne F., Hebert P. D. N. (1999): Holartic phylogeography of an asexual species complex I. Mitochondrial DNA variation in arctic *Daphnia*. *Evolution* 53 (3): 777-792.
- Zakšek V., Sket B., Gottstein S., Franjevic D., Trontelj P. (2009): The limits of cryptic diversity in groundwater: phylogeography of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* (*Crustacea: Decapoda: Atyidae*). *Molecular Ecology* 18: 931-946.