

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Druhové spektrum plžů rodu *Radix* a jejich význam v přenosu motolic v ČR

Species of the genus *Radix* in transmission of trematodes in the Czech Republic

Diplomová práce

Roman Leontovč

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Školitel – konzultant: Mgr. Kateřina Huňová

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Petra Horáka Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří se jakkoliv podíleli na vzniku této práce. Můj velký dík patří Petrovi Horákovi, za jeho cenné připomínky a rady v průběhu mé práce, za jeho trpělivost, která byla často tvrdě zkoušena a v neposlední řadě za důvěru, kterou mi od počátku mého působení na této katedře projevil. Dále bych chtěl poděkovat Katce Huňové, která vedla mé první kroky vědeckým světem. Velký dík také patří Aleně Černíkové a Petrovi Soukalovi, kteří mi pomohli zpracovat statistickou analýzu. Děkuji všem členům parazitologické Katedry za jejich ochotu kdykoli poradit a za příjemnou atmosféru. Zvláštní poděkování věnuji svým rodičům, kteří mě během studia všestranně podporovali. Velmi děkuji Monče za trpělivost a pochopení. Ještě jednou vám všem Dík.

Abstrakt

Plži rodu *Radix* hrají významnou roli v přenosu mnoha druhů motolic, mezi kterými jsou velmi závažní parazité zvířat i člověka. Taxonomická situace rodu *Radix* je nejasná z důvodu velké tvarové variability ulity v rámci jednotlivých druhů. Právě tvar ulity byl hlavním znakem, na základě kterého byly popisovány nové druhy. Po nástupu molekulární taxonomie byla validita některých druhů zpochybněna. Tato práce využívá při určování plžů rodu *Radix* jak metody moderní – fylogenetická analýza založená na genových sekvencích, tak přístupy tradiční – determinace dle konchologických znaků a anatomie pohlavní soustavy. Pro fylogenetickou analýzu byly použity dva geny. Mitochondriální pro 16S rDNA a jaderný pro ITS2 rDNA. Výsledkem molekulárně fylogenetické analýzy bylo rozdělení sledovaných plžů rodu *Radix* na 5 oddělených druhů (*R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* a *R. ampla*). V rámci determinace dle morfometrie ulity bylo sledováno 11 poměrových parametrů, dle kterých bylo možné správně určit všechny sledované plže a zařadit je do druhu, předem určeného dle molekulárních metod. Při determinaci dle morfologie pohlavní soustavy byl sledován tvar a uložení kopulační burzy, a tvar a délka jejího ductu. Dle těchto kritérií byl spolehlivě odlišitelný *R. auricularia* od druhů *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* a *R. ampla*. Podobné znaky pohlavní soustavy byly pozorovány u dvojice *R. labiata* - *R. ampla* a u dvojice *R. lagotis* a *R. peregra*. V rámci parazitologické části byla sledována vnímavost plžů určených dle molekulárních metod k nákazám motolicemi *Fascioloides magna* a *Trichobilharzia regenti*. Jak nálezy z volné přírody, tak experimentální pokusy označily za potenciálního mezihostitele *F. magna* druhy *R. labiata* a *R. lagotis*. Pro *T. regenti* byl jako mezihostitel potvrzen druh *R. peregra*.

Klíčová slova: *Radix*, taxonomie, analýza DNA, ITS2, 16S, morfologie, hostitelská specifita, *Fascioloides magna*, *Trichobilharzia*

Abstract

Snails of the genus *Radix* play an important role in the transmission of many species of trematodes which can represent dangerous parasites of animals and humans. Taxonomical situation within the genus *Radix* is unclear. It is caused by morphological plasticity of the shells of particular species. In the past the shell shape was the most frequently used determination criterion for new species description. Due to new data brought by molecular taxonomy, validity of some species became doubtful. In our contribution, modern methods (phylogenetic analysis based on gene sequences) and classical approaches (determination by conchological features and anatomy of reproductive organs) were used for determination of snails belonging to the genus *Radix*. For phylogenetic analysis two genes were characterized (mitochondrial 16S rDNA and nuclear ITS2 rDNA); in the samples 5 species of the genus *Radix* (*R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* and *R. ampla*) were confirmed. A thorough morphological determination was based on 11 conchological characters which allowed to identify all selected snails; conchological and molecular identifications were in agreement. For determination by means of reproductive organ morphology, shape and position of bursa copulatrix and its duct were used. According to these criteria, *R. auricularia* was distinguishable from *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* and *R. ampla*. Similar characters were observed in the pairs of *R. labiata* - *R. ampla* and *R. lagotis* - *R. peregra*. In the parasitological part of this work, susceptibility of mollusks to the infections by *Fascioloides magna* and *Trichobilharzia regenti* was determined. Based on the experimental infections and observations in the field, a potential to transmit *F. magna* via *R. lagotis* and *R. labiata* was confirmed. *Radix peregra* was proved as the intermediate host of *T. regenti*.

Key words: *Radix*, taxonomy, DNA analysis, ITS2, 16S, morphology, host specificity, *Fascioloides magna*, *Trichobilharzia*

Obsah

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2. 1. Plži rodu <i>Radix</i>	10
2. 1. 1. Obecná charakteristika	10
2. 1. 2. Problematika taxonomie plžů rodu <i>Radix</i>	10
2. 1. 3. Vývoj nomenklatury rodu <i>Radix</i>	11
2. 1. 4. Nejasnosti kolem druhů <i>R. ovata</i> , <i>R. peregra</i> , <i>R. labiata</i> , <i>R. balthica</i>	12
2. 1. 5. Způsoby determinace	14
2. 2. Plži rodu <i>Radix</i> v roli mezipřenositelů motolic.....	20
2. 2. 1. Rod <i>Trichobilharzia</i>	20
2. 2. 2. Čeleď Fasciolidae.....	23
3. MATERIÁL A METODIKA.....	27
3. 1. Sběr, vyšetření a fixace plžů	27
3. 2. Molekulární analýza.....	28
3. 3. Determinace dle morfologických znaků.....	30
3. 4. Experimentální nákazy plžů	36
3. 5. Experimentální nákazy kachen	37
3. 6. Determinace cercárií molekulárními analýzami	37
4. VÝSLEDKY	39
4. 1. Sběr vodních plžů.....	39
4. 2. Vyšetřování plžů na přítomnost vývojových stadií motolic.....	43
4. 3. Determinace plžů.....	45
4. 3. 1. Molekulární analýza	45
4. 3. 2. Pítky pohlavní soustavy	48
4. 3. 3. Morfometrie ulity	53
4. 3. 4. Experimentální nákazy plžů	62
4. 3. 5. Experimentální nákazy kachen.....	63
5. DISKUSE.....	65
5. 1. Sběry a vyšetření plžů z přírody.....	65
5. 2. Experimentální infekce plžů rodu <i>Radix</i>	67

5. 3. Determinace dle molekulárních metod.....	68
5. 4. Determinace dle morfologie pohlavní soustavy.....	69
5. 5. Determinace dle morfometrie ulity	71
6. ZÁVĚR	74
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	75
8. PŘÍLOHY	83

1. ÚVOD

Plži rodu *Radix* (Lymnaeidae; Basommatophora; Pulmonata), jsou mezihostiteli řady motolic (Trematoda; Digenea). Tato skupina parazitů zahrnuje významné patogeny zvířat a lidí. Nejvýznamnější skupinou parazitů z humánního a veterinárního hlediska, která je přenášena plži rodu *Radix*, je bezesporu čeleď Fasciolidae. Její zástupci působí obrovské ekonomické ztráty v chovech domácích zvířat a ohrožují zdraví milionů lidí po celém světě. Taxonomie rodu *Radix* je nejednotná, což je zapříčiněno dřívějším popisováním nových druhů pouze dle konchologických znaků. Právě tvar ulity je však vysoce variabilní v závislosti na prostředí, v němž plž žije, a to i mezi jedinci jednoho druhu (Correa a kol. 2010, Ložek 1956, Pfenninger 2006). V některých pracích se autoři zabývali determinací podle morfologie vnitřních orgánů (převážně pohlavní soustavy), (Hubendick 1951, Jackiewicz, 2000, Glöer 2002). Nástup molekulární taxonomie však zpochybnil validitu některých druhových názvů.

Většina prací řeší problematiku taxonomie plžů rodu *Radix* pouze z jednoho úhlu pohledu. Například v některých stěžejních molekulárně taxonomických studiích chybí fotky zpracovávaných plžů nebo jejich morfologické charakteristiky. Často není zdůvodněno přiřazení druhového názvu k sekvencím genů studovaných plžů. Naopak při morfologických studiích zase chybí potvrzení molekulárními metodami - nutné ale jen v některých případech. Komplexní práce sice existují (Puslednik 2006), nicméně neřeší situaci na území Evropy, kde taková studie doposud chybí. Dokonalé zpracování vnitřního členění rodu a schopnost rozeznávat jednotlivé druhy je velmi důležité při sledování šíření nepůvodních patogenů na nová území. Nalezení vhodného mezihostitele je jedna z podmínek pro úspěšné šíření parazita v nové lokalitě. Typickým příkladem je *Fascioloides magna* a její zavlečení na evropský kontinent. Původně severoamerický druh se na území Evropy úspěšně adaptoval na místní plže, zejména *G. truncatula*. Nicméně na některých lokalitách s vysokou prevalencí nákazy *F. magna* u spárkaté zvěře je výskyt *G. truncatula* sporadický. Je tedy otázkou, zda není možný přenos *F. magna* přes jiného plže, například *R. labiata*, který se na těchto lokalitách hojně vyskytuje.

Cíle práce

Tato práce by měla zmapovat druhové složení rodu *Radix* na území ČR pomocí jak molekulárních metod, tak klasických postupů založených převážně na sledování morfologie ulity a pohlavní soustavy. Dále by měla ověřit přenos *F. magna* plži rodu *Radix*, a to jak sběry a vyšetřením plžů z volné přírody, tak i experimentálními nákazami prováděnými v laboratoři. Okrajově se tato práce bude zabývat přenosem některých motolic rodu *Trichobilharzia*, které jsou v zájmu parazitologů zejména díky schopnosti způsobovat nepříjemnou kožní vyrážku, tzv. cercáriovou dermatitidu.

- 1) Sběr plžů rodu *Radix* na území ČR s důrazem na lokality s výskytem motolice *Fascioloides magna*, z důvodu ověření možnosti přenosu této motolice plži rodu *Radix*
- 2) Vypracování fylogenetické analýzy rodu *Radix* sekvenací dvou genů: **ITS2** (jaderná oblast rDNA) a **16S** (mitochondriální rDNA), pro zjištění druhového zastoupení na území ČR.
- 3) Determinace plžů dle morfologie pohlavní soustavy a nově sledovaných konchologických znaků. Následná konfrontace výsledků s výsledky molekulárních metod.
- 4) Sledování vnímavosti vybraných druhů rodu *Radix* k nákaze motolicemi *Fascioloides magna* a *Trichobilharzia regenti*.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. 1. Plži rodu *Radix*

2. 1. 1 Obecná charakteristika

Plži rodu *Radix* (Lymnaeidae; Hygrophila; Basommatophora; Pulmonata) jsou běžnými zástupci malakofauny stojatých i tekoucích vod s celosvětovým rozšířením (Hubendick 1951, Strong a kol. 2008). Jedná se o plže se širokou nohou a krátkou hlavou, na níž jsou tykadla trojúhelníkovitého tvaru. Jeden pár očí se nachází na vnitřní straně báze tykadel (Basommatophora). Dýchají plicemi (Pulmonata), dýchací otvor je uložen na pravé straně těla. Ulita je pravotočivá s velkým ústím a různým počtem závitů, z nichž poslední převládá. Její tvar podléhá značné variabilitě. Ta je pozorována jak mezi jednotlivými druhy, tak i v rámci druhů (Hubendick 1951, Ložek 1956, Pfenninger a kol. 2006, Correa a kol. 2010). Zástupci tohoto rodu jsou hermafroditi. Ačkoliv je rod *Radix* celosvětově rozšířený, bude se tato kapitola zabývat pouze druhy vyskytujícími se na území Evropy.

2. 1. 2. Problematika taxonomie plžů rodu *Radix*

Rod *Radix* (Monfort, 1810) je mnoha autory považován jen jako podrod rodu *Lymnaea* (Lamarck, 1799) (Uličný 1892, Ložek 1956, Ward a kol. 1997, Jackiewicz 2000, Wullschleger a kol. 2002). Přesvědčivé důkazy o samostatnosti rodu *Radix* přinášejí výsledky prací využívajících molekulárních metod (např. Bargues a kol. 2001), viz níže. Současná taxonomická situace uvnitř rodu *Radix* je částečně nejasná. Názor taxonomů na validitu jednotlivých druhů není jednotný a objevují se časté synonymizace. Tento stav je převážně způsoben velkou tvarovou variabilitou ulity. Právě podle její morfologie byli zástupci rodu *Radix* často určováni (např. Uličný 1982, Ložek 1956, Jackiewicz 2000, Glöer 2002). Později byl tento způsob určování zpochybněn výsledky molekulárně taxonomických studií (Bargues a kol. 2001, Remigio 2002, Pfenninger a kol. 2006). Proto dnes existuje několik paralelních systémů nomenklatury, což je hlavním důvodem obtížné orientace v taxonomii tohoto rodu.

2. 1. 3. Vývoj nomenklatury rodu *Radix*

Názory na pojmenování druhů na území Evropy se vyvíjely. **Uličný** (1892) zahrnul zástupce nynějšího rodu *Radix* pod rod *Limnaea* (pozn.: jde o staré označení nynějšího *Lymnaea*). Jednotlivé zástupce určoval dle zbarvení těla, pláště, morfologie ulity a charakteru oblasti výskytu. U některých zástupců uvádí i varianty, které vyčlenil na základě tvarových odlišností ulity. Jsou to: *Limnaea auricularia* (*L. auricularia* var. *minor*), *Limnaea ampla* (*L. ampla* var. *monnardi*), *Limnaea ovata* (*L. ovata* var. *ampullacea*), *Limnaea lagotis*, *Limnaea peregra* (var. *ambigua*, var. *curta*, var. *producta*). **Hubendick** (1951) určoval plže dle morfologie ulity, tvaru těla, pláště, raduly a pohlavní soustavy. Rozdělil nynější rod *Radix* dle odlišné anatomie kopulační burzy a jejího ductu na dva druhy: *Lymnaea auricularia* a *L. peregra*. V tomto rozdělení byla *L. peregra* dále rozdělena na základě tvarových odlišností ulity na varianty *peregra*, *lagotis*, *ovata* a *ampla*. Takto určené jedinci (všechny varianty) pocházeli převážně ze Skandinávie. Část svojí práce věnoval detailnímu popisu anatomie pohlavní soustavy a morfologie ulity exemplářů pocházejících převážně z muzejních sbírek s velmi širokým areálem původu, viz tab. 2.1. V tomto výčtu druhů uvádí *L. auricularia*, *L. lagotis*, *L. ovata* a *L. peregra* jako samostatné druhy. *L. ampla* zde není uvedena.

Tab.2.1: Původ vybraných plžů rodu *Lymnaea* použitých při sledování morfologických parametrů z muzejních sbírek. (Hubendick 1951)

Plž	Země
<i>L. lagotis</i>	Rusko, Mongolsko, Tibet, Čína
<i>L. auricularia</i>	Mongolsko, Čína, Tibet, Švédsko
<i>L. peregra</i>	Německo, Itálie, Velká Británie, Rusko, Kamčatka
<i>L. ovata</i>	Velká Británie, Francie, Norsko, Island, Fajerské ostrovy, Rusko

Ložek (1956) plže determinoval dle morfologie ulity a charakteru lokality výskytu. Rozlišil dva druhy: *Lymnaea auricularia* a *Lymnaea peregra*. Označení *peregra*, *ampla*, *lagotis* a *ovata* uvádí jako tvarové varianty druhu *L. peregra*. Názvy pro jednotlivé zástupce zní tedy takto: *L. auricularia*, *L. peregra peregra*, *L. peregra ampla*, *L. peregra lagotis* a *L. peregra ovata*. **Jackiewicz** (2000) determinovala jednotlivé zástupce dle morfologie ulity, anatomie pohlavních orgánů a charakteru lokalit výskytu. Uvádí dva druhy, kde označení *Radix* figuruje jako poddruh: *Lymnaea (Radix) auricularia* a *Lymnaea (Radix) peregra*. *Lymnaea (Radix) peregra* je v její práci dále členěna na morfologické formy: Jednotlivé formy

Lymnaea (Radix) peregra rozdělila dle morfologických odlišností ulity. Znaký pohlavní soustavy shledala u všech forem *Lymnaea (Radix) peregra* identickými, viz kapitola???. **Bargues a kol.** (2001) sledovali druhovou variabilitu rodu *Radix* v Evropě pomocí sekvenace genu kódujícího ITS-2 (internal transcribed spacer 2) (oblast jaderné rDNA). Používají ve své práci rodový název *Radix*. Rozhodli tak na základě výskytu konzervované oblasti ohraničené dvěma variabilními úseky v sekvencích ITS-2, kterou se odlišuje rod *Radix* od ostatních rodů čeledi Lymnaeidae. Výsledkem jejich molekulárně taxonomické studie bylo rozlišení rodu na 6 různých druhů, přičemž některé z nich dále rozlišují na několik genotypů. *Radix auricularia* (5 genotypů), *R. lagotis* (2 genotypy), *R. peregra* (= *R. ovata*; = *R. balthica*) (3 genotypy), *R. ampla* (1 genotyp), *R. labiata* (2 genotypy) a *Radix* sp. (1 genotyp). **Remigio** (2002) se zaměřil na sekvenování genu kódujícího 16S (mitochondriální rDNA). V jeho práci jsou uváděny druhy *R. auricularia*, *R. ovata* a *R. peregra* a *Radix* sp. z Rumunska. **Glöer** (2002) rozlišil jednotlivé zástupce dle morfologie pohlavní soustavy morfologie ulity, pigmentace pláště a charakteru lokality výskytu. Uvádí ve své práci tyto druhy: *R. ampla*, *R. auricularia*, *R. balthica*, *R. labiata* a *R. lagotis*. **Pfenninger a kol.** (2006) přišli s myšlenkou neřadit zástupce rodu *Radix* do druhů, ale spíše do skupin definovaných daty molekulárně taxonomických analýz, tzv. MOTU (Molecularly defined Operational Taxonomic Units). Fylogenetickou analýzu zpracovali na základě dat získaných sekvenováním mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu I (COI). Výsledkem jeho práce je rozdělení rodu *Radix* na 5 skupin (MOTU 1 – 5). **Correa a kol.** (2010) prezentují výsledky založené na sekvenaci tří různých genů (pro ITS-1, ITS-2 a 16S). Ve své práci uvádí jako validní druhy uložené do databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *R. labiata*, *R. peregra*, *R. ampla*, *R. lagotis*, *R. auricularia* a *R. ovata*, nicméně přímo v práci sekvenovali pouze druh *R. peregra*. Ostatní uváděné druhy ve výčtu jsou výsledkem sekvenace jinými autory (Bargues a kol. 2001, Remigio 2002, Jouet a kol. 2008).

2. 1. 4. Nejasnosti kolem druhů *R. ovata*, *R. peregra*, *R. labiata*, *R. balthica*

Tyto 4 druhy jsou co do validity nejvíce diskutovány. Název *R. peregra sensu* Bargues a kol. 2001 je v současné zahraniční literatuře (Bargues a kol. 2001, Glöer 2002, Correa a kol. 2010)

používán pro plže původem ze severní části Evropy. Zároveň se paralelně jako *R. peregra* označují plži běžně se vyskytující na území České republiky. Jedinci z obou oblastí se však liší dle výsledků molekulárních studií (Bargues a kol. 2001, Remigio 2002), proto je druhý jmenovaný označován jako ***R. labiata*** (Kruglov a Starobogatov 1983, citováno z Pfenninger a kol. 2006), toto označení však není českými malakology akceptováno (Beran 2002, Juříčková 2008). ***Radix ovata*** je některými autory pokládán za synonymum *R. peregra sensu* Bargues 2001 (Bargues a kol. 2001). Někteří autoři (Ward a kol. 1997, Wulschleger a kol. 2002) uvádějí *R. ovata* a *R. peregra* jako dva samostatné druhy, podrobnosti viz box A. ***R. balthica*** je synonymem pro *R. ovata* (Bargues a kol. 2001), nicméně se v současné literatuře setkáváme s oběma názvy.

Box A

Potvrzení validity druhů *R. peregra* a *R. ovata* dle laboratorních experimentů

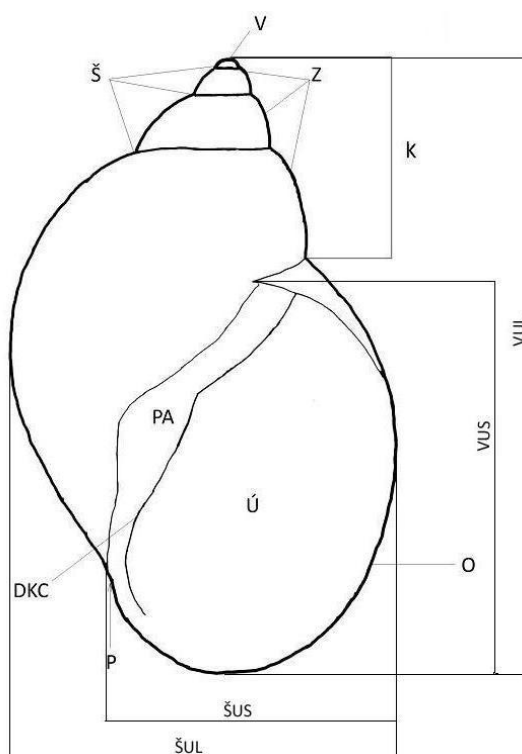
Ward a kol. (1997), potvrdili *R. ovata* a *R. peregra* (pozn.: v originále označení *Lymnaea ovata* a *L. peregra*) jako dva samostatné druhy pomocí elektroforézy čtyř proteinů: glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (GPD), glukóza fosfát isomerázy (GPI), izocitrát dehydrogenázy (IDH) a manóza fosfát izomerázy (MPI). Tvrzení o samostatnosti druhů *R. ovata* a *R. peregra* podpořili výsledky sledování nákazy obou druhů motolicí *Diplostomum phoxini*. Zatímco *R. ovata* vykazovala 10% gigantismus oproti nenakaženým kontrolám, nakažený *R. peregra* nevykazoval známky gigantismu, ale měl vyšší úmrtnost. Dále sledovali vliv kolísání hladiny v nádrži na produkci vajíček obou druhů. *Radix ovata* vykazoval 30% pokles produkce vajíček při snížení hladiny v chovné nádrži oproti kontrolní skupině, zatímco u *R. peregra* byl pokles jen 10 %. Stejný názor, že *R. ovata* a *R. peregra* jsou samostatnými druhy, zastávají Wulschleger a kol. (2002). Výsledky jejich laboratorních experimentů ukázaly, že *R. ovata* roste za stejných laboratorních podmínek pomaleji než *R. peregra*, a také později započal svoji reprodukční aktivitu. Domnívají se, že *R. ovata* inklinuje v životním cyklu k reprodukci jedenkrát za život, zatímco *L. peregra* produkuje vajíčka kontinuálně po celý život. Tvar ulity obou druhů konvergoval v laboratorních podmínkách již po dvou generacích, a proto na základě konchologických znaků je nebylo možné rozlišit. Oddělení těchto sympatrických plžů do dvou samostatných druhů podpořil i fakt, že v laboratorních podmínkách mezi nimi existovala reprodukční bariéra (Wulschleger, nepublikováno, citováno z Wulschleger a kol. (2002).

2. 1. 5. Způsoby determinace

2. 1. 5. 1. Determinace dle morfologie ulity

Hlavními uváděnými determinačními znaky jsou výška ulity, šířka ulity, výška ústí a šířka ústí (viz obr. 2.2), ale přesná čísla poměrů výše uvedených znaků jsou dostupná jen pro některé druhy (Hubendick 1951, Ložek 1956, Jackiewicz 2000, Glöer 2002); charakteristiky se v ostatních případech omezují pouze na slovní popis ulity. Ukazuje se však, že na základě těchto znaků nelze rozlišit *R. auricularia* od *R. peregra*, a *R. lagotis* od *R. labiata* (názvy dle Barges a kol. 2001) (Huňová 2008)

Obr. 2.2: Hlavní morfologické znaky ulity

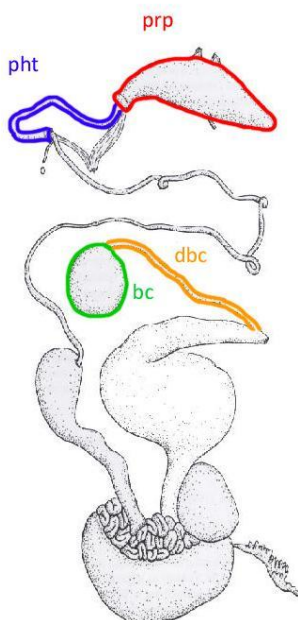


Vysvětlivky: V - vrchol, Š - šev, Z - závit, K - kotouč, PA - patro, DKC - dolní konec cívky, P - píštěl, Ú - ústí, O - obústí, VUL - výška ulity, VUS - výška ústí, ŠUS - šířka ústí, ŠUL - šířka ulity. (autor: Leontovyč, nepublikováno)

2. 1. 5. 2 Determinace dle morfologie pohlavní soustavy

Determinací dle morfologie pohlavní soustavy se zabývali zejména Hubendick (1951), Jackiewicz (1988, 2000), Glöer (2002), Huňová (2008) Vinarski (2009). Hlavními determinačními znaky jsou poměr délky falotéky a preaputium (samčí část), délka duktus kopulační burzy a její tvar (samičí část) obr. 2.3. Sledování těchto znaků však vyžaduje značnou zkušenost a sledovaný jedinec nesmí být nakažen vývojovými stadii motolic (Lafferty 1993).

Obr.2.3: Pohlavní soustava *R. auricularia* (Jackiewicz 2000, upraveno)



Vysvětlivky: pht = falotéka, prp = preaputium, bc = kopulační burza, dbc = duktus kopulační burzy

Tab. 2.4: Hlavní znaky používané pro determinaci dle morfologie pohlavní soustavy.

<u>Název plže</u>	<u>Prp/pht</u>	<u>Duktus kopulační burzy</u>	<u>Kopulační burza</u>
<i>R. auricularia</i>	prp=pht	dlouhý, tenký	
	prp>pht	dlouhý tenký	kulovitá
		dlouhý, tenký	kulovitá
	prp=pht	dlouhý tenký	kulovitá
<i>R. labiata</i>	prp>pht		
		krátký tlustý	vejčitá
<i>R. balthica</i>	prp=pht	Krátký, tlustý	hruškovitá
<i>R. peregra</i>		dlouhý tenký	kulovitá
	prp>pht	velmi krátký až dlouhý	hruškovitá
	prp=pht	krátký	hruškovitá
<i>R. lagotis</i>		krátký tlustý	hruškovitá
	variabilní	dlouhý tenký, krátký tenký	variabilní
<i>L. ovata</i>	prp>pht	velmi krátký až dlouhý	
<i>L. ampla</i>	prp<pht	krátký	

Vysvětlivky:

Glöer 2002	Huňová 2008	Hubendick 1951	Jackiewicz 2000	Vinarski 2009
------------	-------------	----------------	-----------------	---------------

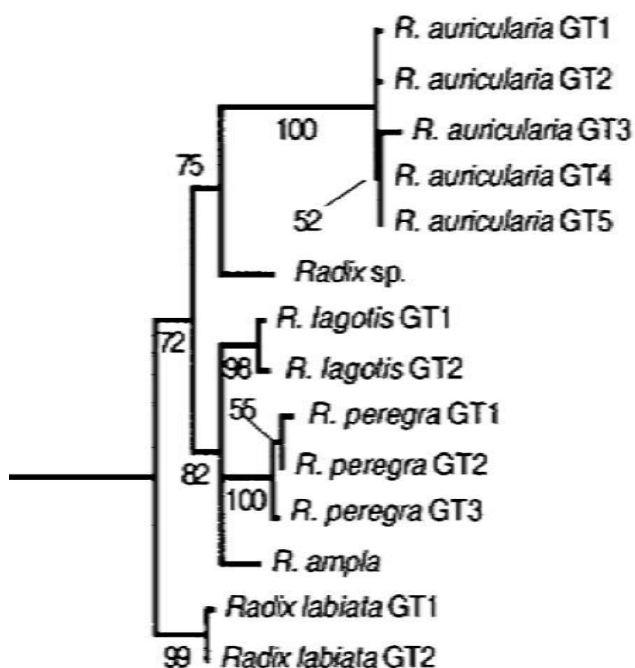
pht = falotéka **prp** = preaputium

2. 1. 5. 3. Determinace dle molekulárních analýz

Tato metoda je považována za nezbytnou součást determinace plžů rodu *Radix* (Pfenninger a kol. 2006).

Pomocí sekvenování genu kódující ITS-2 (internal transcribed spacer 2, oblast jaderné rDNA) byl rod *Radix* rozdělen na 6 různých druhů (Bargues a kol. 2001) (viz výše). Mezidruhové vztahy jsou znázorněny na obr. 2.5. Výsledné sekvence jsou uloženy v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tento gen byl vybrán pro svou značnou variabilitu, a je tudíž vhodným nástrojem pro sledování mezidruhových vztahů (Almeyda-Artigas a kol. 2000, Dvořák a kol. 2002). *Galba truncatula* a rod *Radix* byly označeny dle délky sekvencí (370–406 párů bází) jako bazální skupiny čeledi *Lymnaeidae* (délka genu pro ITS–2 v průběhu fylogeneze narůstá). Kromě validity *R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis* a *R. peregra* byla potvrzena i validita druhu *R. ampla*. Přiřazení druhových názvů k jednotlivým sekvencím bylo provedeno po osobní komunikaci s Dr. Falknerem, a to bez bližší specifikace (Bargues a kol. 2001)

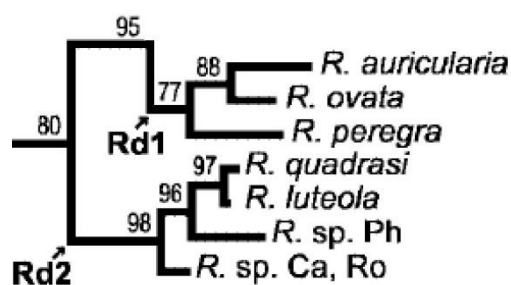
Obr. 2.5: Mezidruhové vztahy rodu *Radix* (metoda neighbour joining), (Bargues a kol. 2001, upraveno)



Pfenninger a kol. (2006) sekvenováním mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu I (COI) rozdělili rod *Radix* do 5 skupin (viz výše). Mitochondriální geny jsou často využívány při studiích genetického toku. Jsou přenášeny po mateřské linii, bez možnosti rekombinace alel. U jednotlivých skupin určených dle molekulárních analýz nabylo možné nalézt konchologický znak, který by studované jedince v jednotlivých skupinách spolehlivě oddělil. Tvarová variabilita byla kontinuální napříč všemi skupinami a závislá na charakteru lokality výskytu.

Remigio (2002) sekvenováním genu kódujícího 16S (mitochondriální rDNA) označil rod *Radix* jako parafyletický taxon. Zkoumaní jedinci pocházeli ze tří kontinentů (Asie, Evropa, S. Amerika). Jako evropské druhy byly uvedeny *R. auricularia*, *R. ovata* a *R. peregra* a *R. sp.* Rumunsko, přičemž *Radix sp.* Rumunsko byl více příbuzný asijským druhům (*R. quadrasi*, *R. luteola*, *R. sp.* Filipíny) a jednomu severoamerickému druhu *Radix sp.* Kanada. *Radix sp.* Rumunsko a *Radix sp.* Kanada se liší pouze v substituci jedné báze. Výsledné sekvence byly uloženy v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Mezidruhové vztahy jsou znázorněny na obr. 2.6. Přiřazení druhových názvů k jednotlivým sekvencím nebylo vysvětleno.

Obr. 2.6: Mezidruhové vztahy rodu *Radix* (metoda maximum likelihood) (Remigio 2002, upraveno)



Vysvětlivky: Ph – Filipíny, Ca – Kanada, Ro – Rumunsko

Huňová (2008) sekvenováním genu pro ITS-2 potvrdila výskyt 4 druhů na území ČR: *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* a *R. auricularia*. Názvosloví použila dle Barguesové a kol. (2001).

Feldmeyer a kol. (2010) osekvenovali kompletní mitochondriální genom *R. balthica*. Jednalo se o první kompletní genomovou sekvenci plže čeledi *Lymnaeidae*. Celá sekvence byla

tvořena 13993 nukleotidy a obsahovala celkem 37 genů (13 genů kódujících proteiny, 2 geny pro rRNA a 22 genů pro tRNA). Výsledné sekvence jsou uloženy v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Jakýkoliv morfologický popis nebo fotografie analyzovaných plžů chybí.

2.1.5.4. Charakter lokalit výskytu jednotlivých druhů

Součástí malakologických prací jsou často uváděny typické lokality výskytu pro jednotlivé druhy plžů rodu *Radix* (Uličný 1892, Ložek 1956, Jackiewicz 2000, Beran 2002). Ačkoliv se nejedná o přímé determinační kritérium, je vhodné tyto informace uvést. Souhrn lokalit výskytu pro jednotlivé druhy rodu *Radix* je uveden v Tab. 2.7

Tab. 2.7: Charakter lokality výskytu plžů rodu *Radix* dle různých autorů.

Druh plže	Charakter lokality výskytu
<i>R. auricularia</i>	Stojaté vody s bahnitým dnem, výjimečné pomalu tekoucí
	Stojaté vody, tůňe, ramena řek, výjimečně klidné úseky řek
	Stojaté vody, rybníky, ramena řek
	Rybníky, pískovny, ramena řek, pomalu tekoucí vody
<i>R. ampla</i>	Stojaté vody, klidná místa řek
	Tekoucí vody, větší řeky a regulační nádrže, výjimečně potoky
	Jezera s bahnitým nebo písčitém dnem, tekoucí vody
	Velké a pomalu tekoucí úživné vodní toky
<i>R. ovata</i> (pravděpodobně <i>R. peregra</i> sensu Bargaues a kol. 2001)	Stojaté vody, klidná místa řek
	Potoky řeky větší stojaté vody
	Stojaté i tekoucí vody, ramena řek s množstvím vodní vegetace
	Stojaté a pomalu tekoucí vody, kanály lužních lesů
<i>R. peregra</i> (<i>R. labiata</i> sensu Bargaues a kol. 2001)	Příkopy, kaluže
	Potoky, prameny, tůňky, močály, periodické kaluže
	Potoky, kaluže, odvodné strouhy,

	Prameniště, stružky s živinami chudou, dobře okysličenou vodou
<i>R. lagotis</i>	Stojaté vody s kamenitým dnem (lomy)
	Luční příkopy, tůňe, říční ramena, potoky, velké prameny
	Stojaté i tekoucí vody

Vysvětlivky:

Uličný (1892)	Ložek (1956)	Jackiewicz (2000)	Beran (2002)
---------------	--------------	-------------------	--------------

2. 2. Plži rodu *Radix* v roli mezipřenositelů motolic

Plži rodu *Radix* mohou sloužit jako mezipřenositelé celé řady motolic (Digenea, Trematoda). Následující kapitola se bude zabývat rodem *Trichobilharzia* (*Schistosomatidae*, Digenea, Trematoda) a čeledí Fasciolidae (Digenea, Trematoda). Zástupci těchto skupin jsou významnými parazity z hlediska humánní a veterinární medicíny.

2. 2. 1. Rod *Trichobilharzia*

Obecná charakteristika

Rod *Trichobilharzia* je nejpočetnějším rodem čeledi Schistosomatidae. Zahrnuje přes 40 druhů s celosvětovým rozšířením (Horák a kol. 2002, Jouet a kol. 2010). Tento oddíl se bude zabývat pouze druhy vyskytujícími se na území Evropy (Tab. 2.8). Gonochorističtí červi nitkovitého tvaru parazitují výhradně v ptácích. Jsou lokalizováni v cévách kolem vnitřních orgánů (viscerální druhy) nebo v nazální sliznici (nazální druhy), kde se živí krví. Pro rod *Trichobilharzia*, stejně jako pro celou čeleď Schistosomatidae, je typický dvouhostitelský cyklus. Celý složitý proces začíná vyloučením vajíčka oplodněnou samicí do krevního řečiště. Odtud se dostává pasivní pasáží tkáněmi do střeva a následně je spolu s výkaly vyloučeno do vnějšího prostředí. Díky změně osmotického tlaku a světelných podmínek se z něj během několika minut až hodin líhne první obrvené larvální stadium - miracidium (viscerální druhy). V případě nazálních druhů (*T. regenti*) se miracidium líhne již v nosní dutině a do volného prostředí se dostává dýchacími otvory (Horák a kol. 1998). Ve vnějším prostředí miracidia vyhledávají vhodného mezipřenositelského plže. energii čerpají ze zásob glykogenu. Pokud

nenalezne vhodného meziphostitele, tak po několika hodinách hyne. Miracidia se orientují pomocí fototaxe, a geotaxe. Důležitý atraktant pro miracidium jsou exkrečně sekreční produkty plže makromolekulárního charakteru, tzv. MAGs (miracidia-attracting glycoproteins). Po kontaktu s vhodným meziphostitelem miracidium proniká do tělní dutiny a mění se na další larvální stadium - mateřskou sporocystu. Ta po čase začne produkovat dceřiné sporocysty. V nich se vyvíjí třetí larvální stádium – cercárie. Ty jsou vylučovány plži do volného prostředí, kde aktivně vyhledávají konečného hostitele. Stejně jako miracidia mají omezený čas na nalezení hostitele, při kterém vykazují pozitivní fototaxi a negativní geotaxi. Po vyhledání konečného hostitele penetrují kůži pomocí lytických enzymů, mění se na schistosomulum a prodělávají složitou migraci tělem hostitele až do místa konečné lokalizace. Rozlišují se dvě rozdílné cesty migrace. Viscerální druhy migrují krevním řečištěm, zatímco druhů nazálních migrují nervovou soustavou. Po dosažení konečné lokalizace schistosomulum dospívá v adultního jedince a hledá jedince opačného pohlaví, se kterým kopuluje. To je možné pouze v případě, že se definitivní hostitel nakazil cercáriemi obou pohlaví.

Tab. 2.8: Vybraní zástupci rodu *Trichobilharzia* na území Evropy. (Horák a kol. 2002, Rudolfová a kol. 2007)

Druh	Definitivní hostitel	Meziphostitel
<i>T. regenti</i> Horák, Kolářová et Dvořák, 1998	Anseriformes	<i>Lymnaeidae</i>
<i>T. szidati</i> Neuhaus, 1952	Anseriformes	<i>Lymnaeidae</i>
<i>T. franki</i> Müller et Kimmig, 1994	Anseriformes	<i>Lymnaeidae</i>
<i>T. filiformis</i> McMullen et Beaver, 1945	Anseriformes	neznámý
<i>T. salmanticensis</i> Simon –Martin et Simon-Vicente, 1999	Anseriformes	<i>Lymnaeidae</i>
<i>T. kossarewi</i> Skrjabin et Zakharov, 1920	Anseriformes	neznámý
<i>T. kowalewski</i> McMullen et Beaver, 1945	Anseriformes	neznámý

(pozn. Ve starší literatuře se objevuje druh *T. ocellata*. Ta byla v případě evropských izolátů dle molekulárních analýz synonymizována s druhem *T. szidati* (Rudolfová a kol. 2005).

Vysvětlivky: názální viscerální ČR (Rudolfová a kol.)

Význam rodu *Trichobilharzia*

Motolice rodu *Trichobilharzia* jsou významnými parazity z hlediska humánní medicíny, a to pro svou schopnost způsobovat cercáriovou dermatitidu. Jedná se o silnou imunitní reakci, spuštěnou při opakovaném průniku cercárií do kůže náhodného hostitele (např. člověk) (Kolářová 2007). Cercáriová dermatitida jako taková přímo neohrožuje zdraví napadeného jedince, nicméně se jedná o velmi nepříjemnou nákazu, doprovázenou vyrážkou a silným svěděním, které může trvat až několik dní (Horák a kol. 2002). V některých případech nákazy savce však může docházet k úniku schistosomul z kůže a jejich následné tkáňové migraci (Horák a kol. 2008). Schistosomuly viscerálních druhů byly například nalézány v plicích experimentálně nakažených zvířat (myší) (Chanová a kol. 2007). Migrace nazálních druhů nervovou soustavou může způsobovat neuropatogenní změny, vedoucí až k dočasnému ochrnutí končetin (Hrádková a Horák 2002).

Plži rodu *Radix* jako mezihostitelé motolic rodu *Trichobilharzia*

Rod *Trichobilharzia* využívá jako mezihostitele široké spektrum vodních plžů (Horák a kol. 2002). Příklady kompatibilních dvojic mezihostitel parazit jsou v tab. 2.9).

Tab. 2.9: Vybraní zástupci rodu *Radix* jako mezihostitelé motolic rodu *Trichobilharzia* na území Evropy.

Parazit	Plž			
	<i>R. auricularia</i>	<i>R. labiata</i>	<i>R. lagotis</i>	<i>R. peregra</i> (= <i>R. ovata</i> = <i>R. balthica</i>).
<i>T. regenti</i>	nepotvrzeno	potvrzeno (2)	potvrzeno (2)	potvrzeno (1)
<i>T. franki</i>	Potvrzeno (3)	nepotvrzeno	nepotvrzeno	potvrzeno (3)
<i>T. salmanticensis</i>	nepotvrzeno	nepotvrzeno	nepotvrzeno	potvrzeno (4)

Vysvětlivky: 1 - Joulet a kol. 2008, 2 - Vostrý 2010, 3 – Joulet a kol.2010, 4 - Simon-Martin & Simon-Vicente, 1999 -

Experimentální nákaza	Přírodní nákaza
-----------------------	-----------------

2. 2. 2. Čeleď Fasciolidae

Obecná charakteristika

Čeleď Fasciolidae (Digenea, Trematoda) je poměrně málo početná skupina motolic s celosvětovým rozšířením. Zahrnuje 6 rodů (Mas-Coma a kol. 2009) viz tab. 2. 10. Její zástupci patří mezi největší z celé skupiny Trematoda. Mají dorzoventrálně zploštělé tělo pokryté otrněným tegumentem se dvěma dobře vyvinutými přísavkami. Jsou to výhradně parazité trávicího traktu savců a podle místa lokalizace se dělí na jaterní a střevní druhy. V obou případech se živí krví. Hermafroditičtí jedinci produkují obrovské množství vajec, která se s trusem dostávají do vnějšího prostředí. Miracidium se líhne po několika týdnech a po proniknutí do mezihostitelského plže se mění na mateřskou sporocystu. Ta produkuje mateřské redie, které dávají vzniknout dceřiným rediím. V těch se tvoří cercárie. Ty se po uvolnění do volného prostředí encystují do podoby metacercárie (většinou na vodní vegetaci). Po pozření definitivním hostitelem prodělávají složitou tkáňovou migraci, která končí usídlením parazita v místě konečné lokalizace.

Tab. 2. 10: Čeleď *Fasciolidae*, její zástupci, definitivní hostitelé a mezihostitelé (Lotfy a kol. 2008, Mas-Coma a kol. 2009)

Rod	Druh	Definitivní hostitel	mezihostitel
<i>Fasciola</i>	<i>F. hepatica</i>	Býložravci, všežravci, člověk	<i>Lymnaeidae</i>
	<i>F. gigantica</i>	Přežvýkavci, člověk , hlodavci, opice	<i>Lymnaeidae</i>
	<i>F. nyanzae</i>	Hroši	<i>Radix natalensis</i>
	<i>F. jacksoni</i>	Sloni	neznámý
<i>Fascioloides</i>	<i>F. magna</i>	přežvýkavci	<i>Lymnaeidae</i>
<i>Tenuifasciola</i>	<i>T. tragelaphi</i>	přežvýkavci	neznámý
<i>Fasciolopsis</i>	<i>F. buski</i>	Prasata, člověk , opice	<i>Planorbidae</i>

<i>Parafasciolopsis</i>	<i>P. fasciolaemorpha</i>	přežvýkavci	<i>Planorbarius corneuss</i>
<i>Protofasciola</i>	<i>P. robusta</i>	Sloni	neznámý

Vysvětlivky:

jaterní	střevní
---------	---------

Význam čeledi Fasciolidae

Zástupci čeledi *Fasciolidae* mohou být velmi závažnými patogeny člověka i zvířat. Díky své velikosti, složité tkáňové migraci a místu parazitace způsobují vážné zdravotní komplikace a v některých případech i smrt svého hostitele (Lotfy a kol. 2008). Napadená zvířata ztrácejí na váze, snižuje se jejich plodnost a produkce mléka (Genicot a kol. 1991). Díky těmto faktorům se řadí mezi nejvýznamnější parazity z ekonomického hlediska. Na území České republiky se vyskytují dva zástupci této čeledi: *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna*.

Fasciola hepatica

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) je vysoce patogenní parazit s celosvětovým rozšířením. Jedná se o poměrně velkého parazita. Dospělci dosahující délky 3cm a šířky 1,3cm parazitují ve žlučových kanálcích mnoha druhů savců včetně člověka. Počet infikovaných lidí se odhaduje na 2,4 milionů (Rim a kol. 1994). V některých hyperendemických oblastech Bolívie dosahuje prevalence až 68 % (Esteban a kol. 1999). Na území České republiky nejsou případy lidské nákazy hlášeny, nicméně nákazy domácích zvířat se vyskytují (Zmuda a Chroust 2001). Na našem území slouží jako mezihostitel plž *Galba truncatula* z čeledi *Lymnaeidae*. Nicméně byl potvrzen možný přenos přes plže rodu *Radix*, kteří se též běžně vyskytují na našem území (Caron a kol. 2007, Relf a kol. 2009, Vignoles a kol. 2002).

Fascioloides magna

Fascioloides magna (Bassi, 1875), (Fasciolidae; Digenea; Trematoda) je vysoce patogenní parazit volně žijících i domácích přežvýkavců. Dospělí jedinci dosahují délky 4–10 cm a jsou 2–3,5 cm širocí. Lokalizováni jsou v jaterním parenchymu, kde tvoří pseudocysty. Původním areálem výskytu je Severní Amerika, odkud byla v roce 1865 zavlečena do Itálie spolu s jelencem viržinským (*Odocoileus virginianus*). Odtud se šířila po celé Evropě, včetně

bývalého Československa (Erhardová-Kotrlá 1971). První nález na území ČR byl zaznamenán v roce 1930 (Ullrich 1930, citováno z Novobilský a kol. 2006). V původním areálu výskytu využívala jako mezihostitele široké spektrum plžů čeledi *Lymnaeidae*: *L. caperata*, *L. modicella* (Laursen and Stromberg 1993), *L. bulimoides techella* (Sinitsin 1933), *Lymnaea parva* a *L. palustris nuttalliana* (Swales 1935). Na území Evropy se úspěšně adaptovala na plže *Galba truncatula*. Tento plž je také uváděn jako nejčastější mezihostitel *F. magna* na území ČR (Erhardová-Kotrlá 1971, Faltýnková a kol. 2006). Dalším možným mezihostitelem na našem území jsou uváděni někteří zástupci rodu *Radix*.

Plži rodu *Radix* jako „náhradní“ mezihostitelé motolic čeledi Fasciolidae

Celková globalizace společnosti a změny klimatu mají za následek šíření infekčních a parazitárních onemocnění na nové lokality. Takto se rozšiřující nákazy se označují jako „emerging diseases“ (EDs) (Daszak a kol. 2000). Mezi EDs patří některé helmintózy (např. schistosomóza, onchocerkóza, loaóza, lymfatické filariózy) (Patz a kol. 2000). Na území Evropy jsou mezi EDs mimo jiné řazeny cercáriová dermatitida (Horák a Kolářová 2011), fasciolóza (Mas-Coma 2004) a fascioloidóza (Novobilský a kol. 2007). Pro úspěšné šíření výše zmiňovaných nákaz na nová území hraje klíčovou roli přítomnost vhodného definitivního hostitele a mezihostitele. Právě plži rodu *Radix* mohou přebírat funkci standardních mezihostitelů (Erhardová-Kotrlá 1971, Vignoles a kol. 2002, Faltýnková a kol. 2006, Caron a kol. 2007, Relf a kol. 2009) (podrobnosti viz box B). Typickým příkladem je situace na některých lokalitách v Irsku, kde je pozorována u ovčí nákaza *F. hepatica*. Na rozdíl od plžů rodu *Radix* se na těchto lokalitách nevyskytuje *G. truncatula* díky nízkému pH vody (Relf a kol. 2009). Z tohoto hlediska je studium vnímavosti plžů rodu *Radix* velmi důležité.

Box B

Vnímavost plžů rodu *Radix* k nálezům *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna*

Caron a kol. (2007) prováděli experimentální nákazy plžů *R. labiata* a *R. balthica* (sensu Bargues a kol. 2001). Oba druhy byly determinovány pomocí sekvence ITS2 regionu. Nákaza byla provedena dvěma miracidii. Jako kontrolní skupina byla použita *G. truncatula*.

Úspěšnost nákazy u *R. labiata* byla 45 %, u *R. balthica* 6,25%. Metacerkárie schopné infikovat konečného hostitele (potkan) produkoval pouze druh *R. labiata*. **Relf a kol. (2009)** sledovali nákazu *F. hepatica* u plžů z volné přírody v Irsku. Plže získali během tří sběrů v březnu, dubnu a květnu. Dle ITS2 sekvence je určili jako *R. peregra* (sensu Bargues a kol. 2001). V jednotlivých měsících zjistili nákazu 10,3%, 60,4% a 61,1%, kterou detekovali pomocí PCR. **Vignoles a kol. (2002)** uvádí jako možného mezihostitele *R. ovata* (sensu Glöer & Meier-Brook, 1994). Infikovali 100 plžů, každého dvěma miracidii. Výsledná prevalence byla 36,5 %. Plži vylučovali plně vyvinuté cercárie. **Erhardová-Kotrlá (1971)** zkoumala vnímavost plžů *R. peregra peregra* a *R. peregra ovata* (pozn. patrně se jednalo o *R. labiata* a *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001). U obou druhů potvrdila úspěšnou nákazu, nicméně nakažení plži neprodukovali cercárie. **Faltýnková a kol. (2006)** uvádí jako možného mezihostitele *R. peregra* (pozn. patrně se jednalo o *R. labiata* sensu Bargues a kol. 2001). Toto tvrzení zakládají na nálezech infikovaných plžů z volné přírody na dvou českých lokalitách (obora Sedliště, vojenský prostor Obecnice). Prevalence byla 0,12 % a 2,78 %. Dále prováděli experimentální nákazy stejných plžů, kde výsledná prevalence dosáhla 18 %. Vývoj parazita dosáhl stadia plně vyvinuté cercárie.

3. MATERIÁL A METODIKA

3. 1. Sběr, vyšetření a fixace plžů

Sběr plžů

Sběr plžů probíhal v období od srpna 2009 do června 2011 na stojatých i tekoucích vodách po celé České republice s důrazem na lokality s výskytem *F. magna* (viz kapitola 4). Dále byl získán materiál ze Slovenska, Ukrajiny a Islandu (jedna lokalita z každé země). Sběr byl cílen převážně na plže rodu *Radix* se zaměřením na nákazy motolicemi rodu *Trichobilharzia* a čeledi Fasciolidae. Příležitostně byly sbírány druhy *Galba truncatula* (z důvodu získání metacerkárií na zavedení životního cyklu *F. magna*). Sběr probíhal za pomoci cedníku nebo ručně z vodní vegetace a potopených předmětů. Poté byli plži převezeni v plastových nádobách s minimem vody do laboratoře k dalšímu vyšetření.

Vyšetření a fixace

Plži byli v laboratoři rozděleni podle lokalit do sklenic s vodou v závislosti na velikosti po 1 – 10 jedincích a několik hodin vystaveni světelnému záření ze stolních lamp (vyplovací metoda, Našincová 1992). Během této doby probíhala průběžně kontrola na přítomnost cercárií motolic. Při podezření na cercárie z čeledi Schistosomatidae nebo Fasciolidae byly cercárie dále pozorovány pod světelným mikroskopem (Olympus CX21). V případě pozitivního nálezu cercárií motolic z uvedených čeledí byli plži z nádoby s cercáriemi rozděleni do samostatných nádob. Tak byl identifikován vylučující plž. V průběhu několika následujících dní byly odebírány cercárie, které byly uchovávány v 96 % etanolu pro pozdější determinaci pomocí molekulárních technik. Někteří nakažení plži byli uchováni naživo pro experimentální nákazu definitivních hostitelů. Z každé lokality bylo vyčleněno maximálně 20 plžů, kteří byli usmrceni v plastových nádobkách s 96 % etanolem, který byl dále naředěn na konečnou koncentraci 70%. Zbytek byl vypuštěn zpět do přírody. Materiál fixovaný etanolem byl uchováván při pokojové teplotě.

3. 2. Molekulární analýza

Izolace DNA

DNA byla izolována z fixovaných plžů (70 % etanol). V několika případech byla izolována z čerstvě usmrcených plžů. Použita byla tkáň ze zadní části nohy a přední části pláště kvůli minimalizaci kontaminace obsahem střeva nebo vývojovými stadii motolic. Samotná izolace probíhala podle protokolu komerčně dodávaného kitu (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN). Koncentrace získané DNA byla měřena na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop®) a uchována v elučním pufru při teplotě – 20°C.

PCR

Pro molekulární analýzu byly vybrány dva geny, a to pro **ITS-2** (jaderná oblast rDNA) a **16S** (segment velké podjednotky mitochondriální rDNA). Pro gen kódující ITS-2 byly použity primery ITS-2 RIXO a ITS-2 NEWS (Generi Biotech), (Tab. 3. 1). Pro gen kódující 16S byly použity primery 16Sfor a 16Srev (Generi Biotech), (Tab. 3. 2).

Tab. 3. 1: Použité primery pro gen kódující ITS-2. (Almeyda-Artigas a kol. 2000)

Název primeru	Sekvence primeru
ITS-2 RIXO	5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3'
ITS-2 NEWS	5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3'

Tab. 3. 2: Použité primery pro gen kódující 16S. (Simon a kol. 1991).

Název primeru	Sekvence primeru
16Sfor	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
16Srev	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

PCR reakce probíhala v celkovém objemu reakční směsi 25 µl. (Tab. 3. 3)

Tab. 3. 3: Reakční směs pro PCR

10X Sahara reaction buffer (Bioline)	2,5 µl
Sahara DNA polymerase 4u/µl (Bioline)	0,3 µl
50 mM MgCl ₂ (Bioline)	1 µl
2,5 mM dNTP (Bioline)	2 µl
10 mM primer forward (tabulka a., b.)	0,5 µl
10mM primer reverse (tabulka a., b.)	0,5 µl
DNA templát	50 ng
H ₂ O deionizovaná, autoklávovaná	Zbytek do celkového objemu 25 µl

Vlastní PCR probíhala na přístroji My Cyclertm Thermal Cycler (Bio-Rad). Pro každý gen byl použit jiný protokol.

Protokol pro ITS-2: jeden cyklus 94°C, 10 min; 30 cyklů: 94°C, 30 s, 50°C, 30 s; 72°C, 1 min; jeden cyklus 72°C 7 min. Po skončení reakce byla naprogramována konstantní teplota 4°C.

Protokol pro 16S: jeden cyklus 95°C, 10 min; 50°C, 2 min; 72°C, 1,5 min; 4 cykly 93°C, 15 s; 50°C, 15 s; 72°C, 1,5 min; 25 cyklů 93°C, 5 s; 50°C, 8 s; 72°C, 1 min; jeden cyklus 72°C. Po skončení reakce byla naprogramována konstantní teplota 4°C.

Výsledek PCR byl vyhodnocen pomocí gelové elektroforézy.

Gelová elektroforéza a purifikace PCR

Pro gelovou elektroforézu byla použita vanička (Clever Scientific Ltd) se zdrojem (Hoefler PS300 – B). Do 1 % agarózového gelu byla pro každý vzorek napipetována směs: 10 µl PCR produktu, 2 µl 5x DNA loading buffer, tri-colour (Bioline), 0,5 µl SYBR[®] Green I (Invitrogen). Jako marker byl použit Hypperladder IV (Bioline) s příměsí 0,5 µl SYBR[®] Green I (Invitrogen). Celá reakce probíhala při napětí 120 V. Výsledek byl vyhodnocen pod UV lampou a vyfotografován. V případě prokázání jednoho jasně odděleného signálu, probíhala následná purifikace přímo ze zbylých 15 µl původní PCR reakce. Při průkazu vícenásobného signálu bylo nutné produkt o požadované velikosti vyříznout skalpelem, a ten poté purifikovat. Přímá purifikace produktů PCR reakce probíhala pomocí komerčně dodávaného kitu MinElute[®] PCR Purification Kit (Qiagen), z gelu pomocí MinElute gel extraction kit (Qiagen). Koncentrace výsledného produktu byla měřena na spektrofotometru

ND-1000 (NanoDrop[®]). Purifikovaný PCR produkt byl uskladněn v -20°C pro pozdější sekvenační reakci.

Příprava vzorků na sekvenační reakci

Směs na sekvenační reakci byla připravena do celkového objemu 14 µl. Skládala se z 50 ng templátu, 0,3 µl 10 mM primeru (Tab. 3. 1. a 3. 2) a deionizované autoklávované vody doplněné do požadovaného objemu. Takto připravený vzorek byl odeslán do sekvenační laboratoře PřF UK v Praze.

Vyhodnocení výsledků sekvenační reakce

Sekvenační reakcí byla pro každou sekvenci získána dvě čtení. Tyto sekvence byly upraveny v programu Chromas ze softwarového balíku DNASTAR[®] (Lasergene). Byly seříznuty sekvence primerů a opraveny chyby při čtení. Takto upravené sekvence byly srovnány s databází NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) pro předběžné zjištění druhu.

Ze všech opravených sekvencí byl pro každý gen vytvořen alignment pomocí programu BioEdit Sequence Alignment Editor, verze 7.0.9.0 (Hall 1999). Alignment musel být ručně upraven. Fylogenetické stromy byly vytvořeny pomocí programu PAUP 4.0b10 (Swofford 1998) metodou Neighbor-joining (distance LogDet) v bootstrappingu s 1000 opakováním a upraveny v programu FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), Finální grafické úpravy byly provedeny v programu Adobe[®]Photoshop 7.0.1 CE (Adobe)

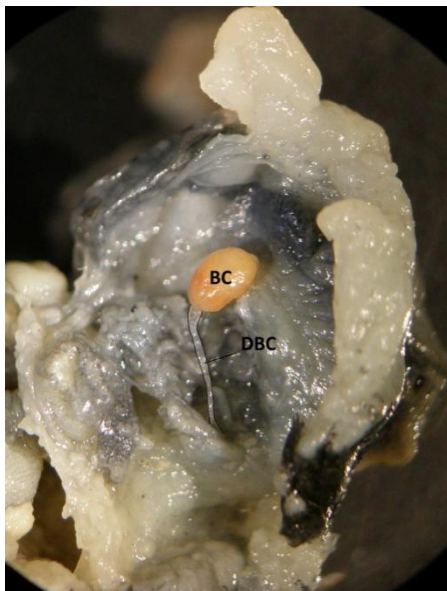
3. 3. Determinace dle morfologických znaků

Pitva

Část plžů byla determinována dle morfologických znaků pohlavní soustavy. Sledováno bylo umístění kopulační burzy v plášťové dutině, tvar kopulační burzy, a délka a tvar ductu kopulační burzy. Z každé lokality bylo pitváno 3 - 5 největších jedinců. Tělo plže bylo z ulity vyjmuto pinzetou. Přední část pláště a část nohy bylo uchována v 96% etanolu pro pozdější molekulární analýzu. Plži byli pitváni v Petriho misce pod stereolupou (NOVEX RZ-RANGE). Nejprve byla odstřižena přední část pláště, pod níž je uložen corpus pyriforme krytý vazivovou blánou (Obr.3. 4.). Po odstranění vazivové blány bylo možno pozorovat tvar a uložení kopulační burzy a jejího ductu. Výsledky byly zhodnoceny a slovně zaznamenány,

některé byly vyfotografovány. Tělo bylo uschováno v 96% etanolu pro případnou pozdější analýzu. Ulity plžů byly označeny a uchovány pro pozdější určení.

Obr. 3. 4: sledované znaky samičí části pohlavní soustavy *R. auricularia*



Vysvětlivky: BC – kopulační burza, DBC – duktus kopulační burzy

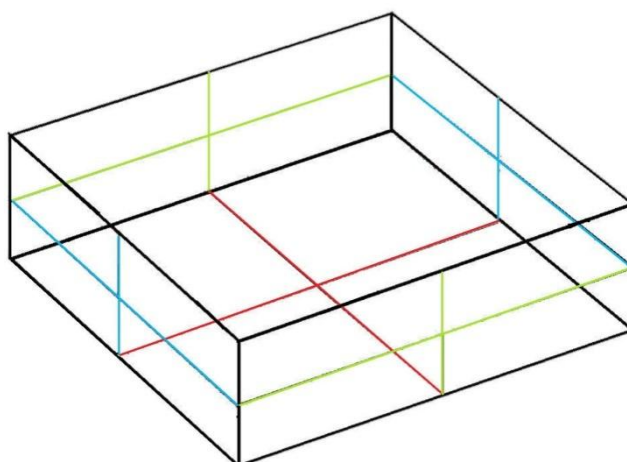
Determinace dle morfologie ulity

Pro získání konchologických parametrů pro následnou determinaci byly pořízeny detailní fotografie každé proměřované ulity pomocí digitálního fotoaparátu (Canon EOS 550D) upevněného v posuvném stojanu s objektivy CanonMP – E 65mm a Canon EF 50mm. Konečná fotografie byla vytvořena z více dílčích snímků složených pomocí softwaru Heliconfocus (HeliconSoft) pro dosažení celkové ostrosti fotografie.

Standardizace polohy ulity při focení

Aby metoda měření ulit dle fotografií měla vypovídací hodnotu a mohla být běžně využívána, bylo třeba definovat přesnou polohu ulity. Pro tento účel byla sestrojena tzv. standardizační komůrka (Obr. 3. 5). Ta byla vyrobena ze skla s přesně definovanými ryskami, které byly naznačeny diamantovým hrotem. V této komůrce byla ulita polohována a poté snímána z šesti pohledů.

Obr. 3. 5: Standardizační komůrka



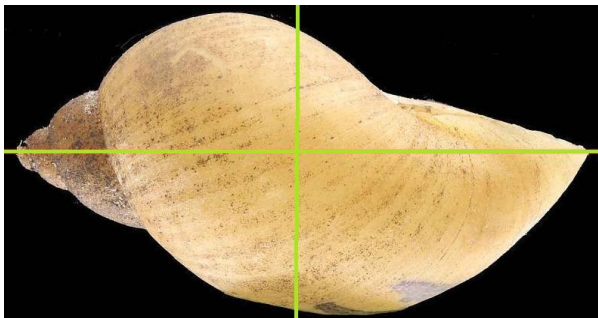
Ulita byla do komůrky upevněna pomocí kousku modelíny tímto způsobem: Při pohledu shora protínala jedna ryska na dně komůrky ulitu v jejím vrcholu a v nejvzdálenějším bodě obústí. Zároveň byla druhým jmenovaným bodem vedena tečna kolmá na první přímku (Obr. 3. 6).

Obr. 3. 6: Horní pohled na ulitu *R. labiata* při standardizaci polohy před focením



Při pohledu zleva splynuly naznačené svislé rysky na protilehlých stranách komůrky, přičemž vodorovná protínala ulitu v jejím vrcholu a v nejvzdálenějším bodě obústí (Obr. 3. 7). Při pohledu zprava byl postup stejný (Obr. 3. 8)

Obr. 3. 7: Pohled zleva na ulitu *R. labiata* při standardizaci polohy před focením



Obr. 3. 8: Pohled zprava na ulitu *R. labiata* při standardizaci polohy před focením



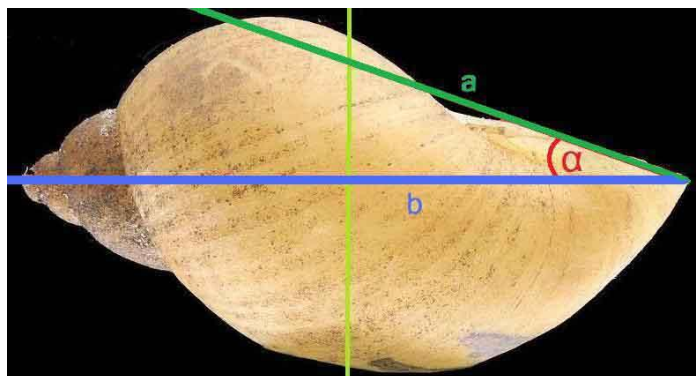
Při pohledu na vrchol kolmice na protilehlých stranách splynuly a průnik kolmic byl přesně ve středu vrcholu (Obr. 3. 9)

Obr. 3. 9: Pohled na vrchol ulity na ulitu *R. labiata* při standardizaci polohy před focením



Nastavení ulity při pohledu směrem k ústí bylo nejvíce problematické. Plocha ústí (na obr. 7 označena jako a), nebyla souběžně s rovinou celé ulity (na obr. 7 označena jako b), nýbrž s ní svírala ostrý úhel α (Obr. 3. 10).

Obr. 3. 10: Úhel roviny ulity a plochy ústí. *R. labiata* při standardizaci polohy před focením



Vysvětlivky: a – rovina ústí, b – rovina ulity, c – úhel roviny ulity a plochy ústí

Správného nastavení ulity bylo docíleno tak, že při pohledu směrem k ústí byla **celá komůrka** (nikoliv ulita) nakláněna tak dlouho, než plocha ústí splynula v přímku, která musela být vodorovně se dnem komůrky (Obr. 3. 11 a 3.12)

Obr. 3. 11: Ulita *R. labiata* před nakloněním standardizační komůrky



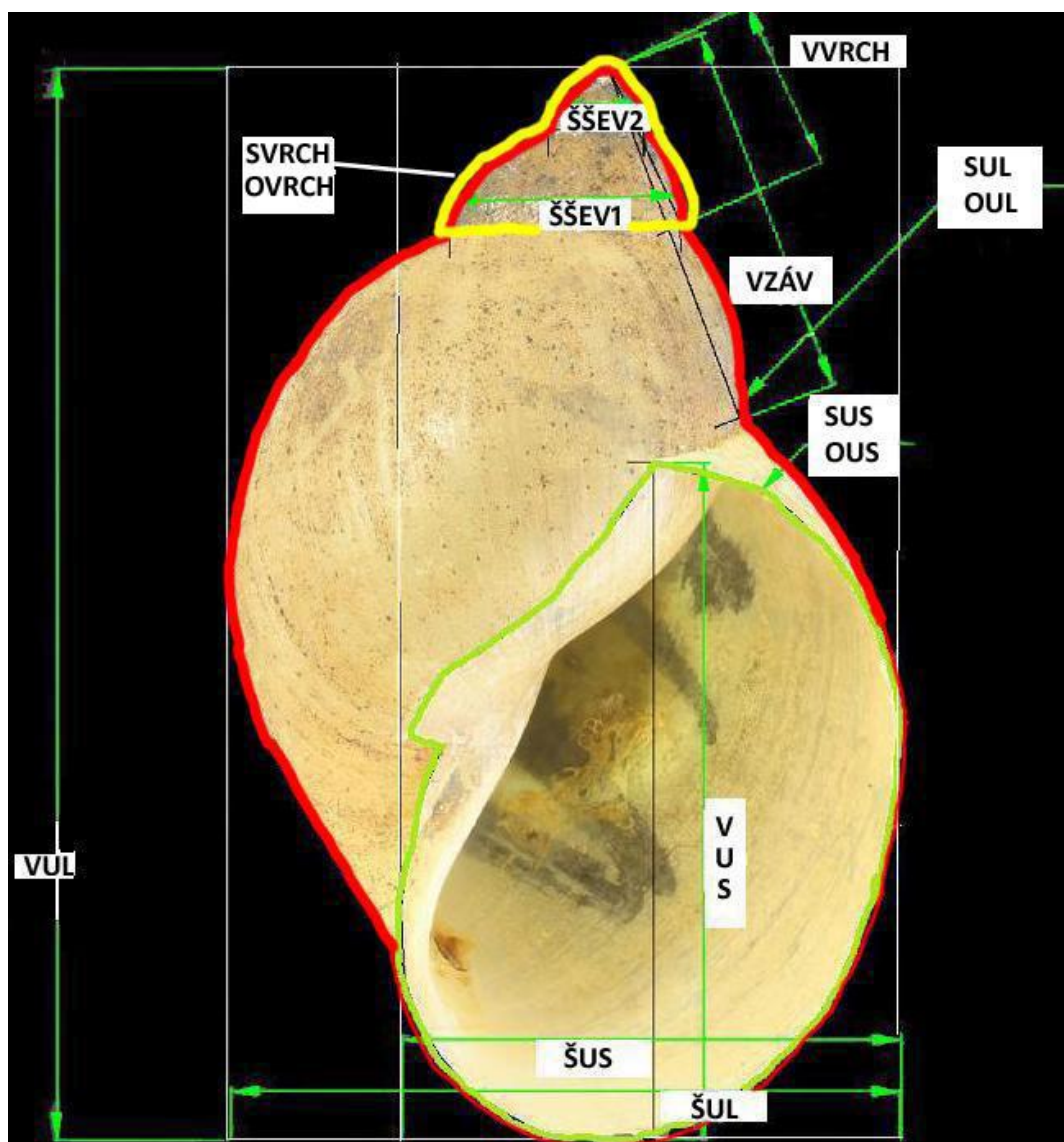
Obr. 3. 12: Ulita *R. labiata* po naklonění standardizační komůrky



3. 3. 4. Proměrování fotografií

Fotografie byly proměřovány pomocí programu Quick Photo Micro 2.2. (Promicra). Sledovány byly následující znaky: Výška ulity, šířka ulity, výška ústí, šířka ústí, šířka předposledního švu, šířka posledního švu, výška kotouče k poslednímu švu, výška kotouče, plocha obrysu ulity a plocha ústí (Obr. 3. 13).

Obr. 3. 13: Ulita *R. labiata* a Označení sledovaných znaků



Vysvětlivky: VUL – výška ulity, ŠUL – šířka ulity, VUS – výška ústí, ŠUS – šířka ústí, ŠŠEV1 – šířka 2. švu, ŠŠEV2 – šířka 3. švu, VVRCH – vzdálenost od vrcholu k 3. švu, VZÁV – vzdálenost od vrcholu k 4. švu, SUL – plocha obrysu ulity, OUL – obvod obrysu ulity, SUS – plocha ústí, OUS – obvod ústí, SVRCH – plocha obrysu prvních dvou závitů (žlutě), OVRCH – obvod obrysu prvních dvou závitů (žlutě)

Po změření sledovaných znaků bylo nutné upravit naměřené hodnoty na reálnou velikost. Při focení ulit byl na stejné nastavení fotoaparátu vyfocen „objektivní mikrometr“, který byl poté změřen programem Quick Photo Micro 2.2. (Promicra). Následně byl vypočítán koeficient pro převod naměřených hodnot na hodnoty reálné. Statistické zpracování bylo provedeno Mgr. Alenou Černíkovou, Ph.D (Ústav aplikací matematiky a výpočetní techniky, PřF UK,

Praha) v programu R verze 2.10.1. Pro zjištění, zda se jednotlivé druhy od sebe liší ve sledovaných parametrech, byla použita analýza rozptylu - ANOVA, v případě, že nebyla splněna podmínka shody rozptylu nebo normálního rozdělení, byl použit Kruskal-Wallis test. Shoda rozptylu byla ověřena Bartlettovým testem, normální rozdělení bylo ověřeno Shapiro-Wilk testem. Vzájemné odlišení konkrétních druhů dle jednotlivých parametrů bylo provedeno Tukey-Cramerovým párovým porovnáním. Pro rozlišení jednotlivých druhů pomocí všech sledovaných znaků byla použita diskriminační analýza, kterou byly vypočítány tzv. klasifikační proměnné, dle kterých probíhalo zpětné zařazování do skupin předem určených molekulárními metodami.

3. 4. Experimentální nákazy plžů

Z důvodu studia kompatibility parazit – meziphostitel byla testována vnímavost třech druhů plžů rodu *Radix* na dva druhy motolic (Tab. 3. 14). Názvosloví v této kapitole je použito dle Bargues a kol. (2001) Jako kontrolní skupina byli použiti vnímaví meziphostitelé pro dané motolice. Pro *F. magna* to byla *Pseudosuccinea columella* a pro *T. regenti* to byl *R. lagotis*.

Tab. 3. 14: Testování vnímavosti plžů rodu *Radix*. ☑ - testováno, ✘ - netestováno

	<i>Fascioloides magna</i>	<i>Trichobilharzia regenti</i>
<i>R. lagotis</i>	☑	✘
<i>R. labiata</i>	☑	✘
<i>R. peregra</i>	☑	☑
<i>R. natalensis</i>	☑	✘

Plži zahrnutí do infekčních pokusů pocházeli z chovů PřF UK (*R. lagotis*), z akvária od chovatele akvarijských rybek (*R. natalensis*) nebo z volné přírody (*R. labiata*, *R. peregra*). U plžů z volné přírody bylo třeba před samotným infekčním pokusem vyloučit nákazu jinými motolicemi, jež by měla za následek zkreslení výsledného pokusu. Proto na lokalitě s výskytem daného plže byly sbírány spolu s dospělci i snůšky vajíček. Plži vylíhnutí v laboratoři byli následně zařazeni do infekčních pokusů. Plži byli chováni ve skleněných akváriích s molitanovým filtrem. Krmení byli hlávkovým salátem. Pro infekční pokusy byli vybíráni plži ve velikosti 3 – 5 mm. Umístění byli po jednom do nakažovacích komůrek. Ke každému plži bylo přidáno 4 - 6 miracidíí. Takto byli plži vystaveni naze minimálně 5 hodin, a poté přemístěni do společné nádoby. Po šesti až osmi týdnech byli plži pomocí pitvy vyšetřováni na přítomnost vývojových stadií motolic.

Získávání miracidíí pro infekční pokusy

Miracidia *T. regenti* byla získána z experimentálně nakažených kachen (viz níže) z chovů PŘF UK. Nakažené kachny byly po 21 dnech usmrceny a byla jim odebrána nosní sliznice, která byla umístěna do Petriho misek a zalita vodou. Během hodiny se začala líhnout miracidia. Vajíčka *F. magna* byla získána pitvou jater infikované volně žijící zvěře a uložena v nádobkách s vodou do teploty 4°C. Pro líhnutí miracidíí byly vajíčka umístěna do inkubátoru s termostatem nastaveným na 30°C. První miracida se začala líhnout po 14 ti dnech.

3. 5. Experimentální nálazy kachen

V případě nálezu infikovaného plže motolicemi čeledi Schistosomatidae bylo nutné provést experimentální nákazu definitivního hostitele – kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) z důvodu získání dospělých jedinců. Ti jsou nezbytní v případě popisu nového druhu. Paralelně probíhala determinace cercárií pomocí molekulárních technik (jediná metoda pro spolehlivé druhové rozlišení cercárií rodu *Trichobilharzia* (Dvořák a kol. 2001, Jouet a kol. 2010).

Kachny staré 6 – 8 dní byly nakažovány stovkami cercárií vyloučenými infikovaným plžem. Ptáci byli fixováni tak, že měli nohy ponořené po dobu 60 min. ve vodě s cercáriemi. Někdy byla na plovacích blánách pozorována kožní reakce na proniknuvší cercárie. Poté byly kachny umístěny do klecí s pravidelným světelným režimem (12 hodin světlo a 12 hodin tma). 15. - 21. den po nákaze byl sbírán trus. Dvanáct hodin před sběrem trusu neměly kachny přístup k vodě, aby trus neobsahoval tekutou složku a v případě úspěšné infekce se miracidia nevylihla už v kleci. Trus byl resuspendován ve vodě a pomocí světla byla miracidia koncentrována do horní části nádoby. Kachny byly po 19, 20 nebo 21 dnech usmrceny a byla provedena pitva, při níž byli hledáni dospělci. Prohlíženy byly plíce, cévy kolem tenkého střeva a nosní sliznice. Pitva byla provedena i při negativním nálezu miracidíí v případě, že by se jednalo o unisexuální infekci.

3. 6. Determinace cercárií molekulárními analýzami

Izolace DNA

Dna byla izolována z cercárií uchovávaných v 96% etanolu. Použito bylo 100 – 200 cercárií. Izolace probíhala podle protokolu komerčně dodávaného kitu (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN). Získaná DNA byla uchována v EB pufru při teplotě – 20°C.

PCR

Pro molekulární analýzu byl vybrán mitochondriální gen pro cytochromoxidázu I (COI). Tento gen byl zvolen pro relativně krátkou sekvenci (1225 bp) (Lockyer a kol. 2003), a proto nebylo nutné klonování genu do bakteriálního plasmidu. Byly použity primery Cox1_Schisto_5' a Cox1_Schisto_3' (Generi Biotech),(Tab. 3. 15)

Tab. 3. 15: použité primery pro gen kódující COI (Lockyer a kol., 2003)

Název primeru	Sekvence primeru
Cox1_Schisto_5'	5'- TAATGCATMGGAAAAACA - 3'
Cox1_Schisto_3'	5'- TCTTTRGATCATAAGCG - 3'

PCR reakce probíhala v celkovém objemu reakční směsi 25 μ l. (Tabulka 3. 16)

Tabulka 3. 16: Reakční směs pro PCR

10X Sahara reaction buffer (Bioline)	2,5 μ l
Sahara DNA polymerase 4u/ μ l (Bioline)	0,3 μ l
50 mM MgCl ₂ (Bioline)	1 μ l
2,5 mM dNTP (Bioline)	2 μ l
10 mM primer Cox1_Schisto_5' (tabulka 3. 15)	0,5 μ l
10mM primer Cox1_Schisto_3' (tabulka 3. 15.)	0,5 μ l
DNA templát	50 ng
H ₂ O deionizovaná, autoklávovaná	Zbytek do celkového objemu 25 μ l

Vlastní PCR probíhala na přístroji My Cycler[™] Thermal Cycler (Bio-rad). Pro amplifikaci byl použit následující protokol: jeden cyklus 94°C, 8 min; 40 cyklů: 94°C, 30 s, 52°C, 30 s; 68°C, 2 min; jeden cyklus 68°C 7 min. Po skončení reakce byla naprogramována konstantní teplota 4°C.

3. 6. 3. Gelová elektroforéza, purifikace PCR a příprava na sekvenční reakci

Postup byl shodný s postupem v kapitole 3. 2. 3. a 3. 2. 4.

4. VÝSLEDKY

4. 1. Sběr vodních plžů

Plži rodu *Radix* byli sbíráni v období od srpna 2009 do června 2011. Celkem bylo sebráno 3397 plžů *Radix* spp. z 59 lokalit (Česká republika - 56, Slovenská republika - 1, Island - 1, Ukrajina - 1) a 860 plžů *Galba truncatula* z 5 lokalit (Česká republika). Poloha a charakter lokality, počty sebraných a determinovaných plžů jsou znázorněny v Tab. 4. 1 a na obr. 4. 2

Tab. 4. 1: Seznam lokalit, počty sebraných a determinovaných plžů *R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra*, *R. ampla*

Označení lokality	Název lokality	GPS souřadnice	<i>Radix</i> sp. Počet sebraných/ pitvaných*	Počet sekvenovaných		<i>G. truncatula</i> Počet sebraných
				ITS-2 **	16S ***	
1	Jevany	49°58'3.829"N, 14°50'50.023"E	56/4	4	4	0
12	Mnichovka	49°57'48.468"N, 14°42'38.619"E	186/4	4	4	200
13	Bohumilský p.	49°57'31.35''N 14°50'1.92''E	18/5	4	5	0
14	Černé Voděrady	49°57'23.346"N, 14°49'13.09"E	8/3	2	2	0
17	Lipišský potok	49°48'11.02"N, 14°9'22.469"E	167/4	3	2	0
19	Trnová	49°47'55.410"N, 14°9'55.682"E	98/2	2	2	0
20	Trnovský potok	49°47'44.939"N 14°9'20.421"E	1/1	1	1	0
21	Hlubošský potok	49°45.128'N, 14°01.100'E	50/3	3	4	0
23	Všenorský potok	49°54'43.294"N 14°19'40.294"E	13/2	2	0	0

29	Boletický potok	48°49'48.405"N, 14°13'20.669"E	23/4	3	3	20
48	Okor	50°9'50.389"N, 14°15'23.26"E	121/4	4	4	0
24	Černolice (tůňka)	49°55'5.526"N, 14°18'45.675"E	232/2	3	4	0
26	Lužnice	48°58'29.089"N, 14°51'35.219"E	1/1	1	1	0
32	Velký Osek	50°7'4.947"N, 15°10'33.575"E	3/3	3	3	0
34	Obecnice	49°42'40.623"N, 13°57'49.906"E	329/3	3	2	350
35	Koželužka	49°50'8.583"N, 13°42'16.769"E	128/0	3	3	0
40	Přívětice	49°50'17.791"N, 13°36'26.006"E	6/0	3	2	0
56	Praha	50°5'2.181"N, 14°27'47.433"E	113/0	3	3	0
2	Novohradské hory	48°43'49.886"N, 14°34'1.649"E	28/5	5	5	0
54	Rožnov p. R.	49°27'39.787"N, 18°9'18.108"E	23/0	3	2	260
61	Sedliště (mimo oboru)	49°32'39.048"N 13°38'40.879"E	320/0	0	0	0
62	Sedliště (obora)	49°32'27.708"N 13°38'40.347"E	155/0	1	0	30
58	Jeskyně Starý lopač	49°22'45.502"N, 16°45'36.35"E	91/0	0	0	0
3	Velký Jemnický r.	49°46'8.482"N, 12°45'5.564"E	24/4	3	3	0
4	Bezděkovský r.	49°45'17.717"N, 12°42'40.757"E	12/3	3	3	0

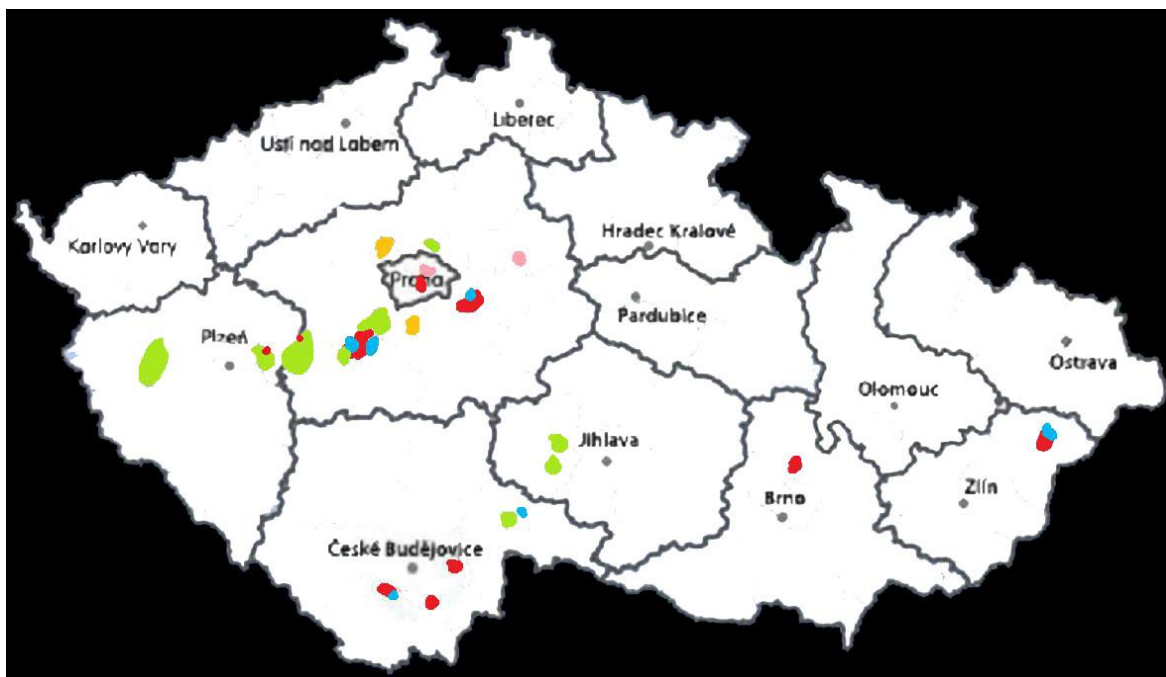
6	Novomlýnský r.	49°42'58.683"N, 12°41'1.021"E	47/2	2	2	0
7	Mochov	49°43'22.894"N, 12°42'57.747"E	2/1	0	0	0
8	Lužná	49°43'5.878"N, 12°44'8.747"E	40/3	3	3	0
9	Doly	49°44'0.579"N, 12°44'19.716"E	4/4	1	1	0
10	Liščí r.	49°44'7.845"N, 12°46'37.482"E	63/4	4	4	0
16	Voznice	49°49'5.63"N, 14°13'1.716"E	214/5	3	4	0
22	Trhové Dušníky	49°43'3.715"N 14°0'59.893"E	63/3	3	3	0
28	Vlkovský r.	49°8'54.551"N 14°43'42.555"E	8/4	3	3	0
30	ú. n. Trnávka	49°30'54.334"N, 15°11'41.496"E	5/3	3	3	0
U	Ústrašinský r.	49°22'44.72"N, 15°9'59.026"E	9/5	5	5	0
33	Kozelská tůň	50°15'14.135"N, 14°32'46.489"E	48/0	2	3	0
36	Kařez	49°49'12.916"N, 13°47'0.225"E	28/0	3	3	0
37	Dolejší r.	49°48'47.557"N, 13°46'50.553"E	14/0	3	3	0
38	Trnovský r.	49°47'24.048"N, 13°38'54.889"E	52/0	2	3	0
39	Nový r.	49°47'6.419"N, 13°35'16.526"E	11/0	3	3	0
41	Přívětice	49°50'15.981"N, 13°36'27.634"E	1/0	1	1	0
42	Těchařovice	49°36'2.287"N, 14°2'53.899"E	82/0	4	3	0
43	Hořejany	49°35'20.504"N, 14°1'4.034"E	48/0	3	3	0

44	Horčápsko	49°34'52.959"N, 13°58'32.291"E	7/0	3	3	0
46	Tochovice	49°35'44.096"N, 13°59'26.442"E	28/0	3	3	0
47	Čápský r.	49°50'18.902"N, 13°46'50.459"E	2/0	2	2	0
49	Otín	49°7'57.538"N, 15°3'54.734"E	83/	1	0	0
50	Slapy	49°45'25.124"N, 14°25'47.684"E	18/0	3	3	0
51	Estany de Ratera	42° 35' 19.47" N 0° 59' 37.17" E	9/0	2	3	0
53	Gabčíkovo	47°54'48.525"N, 17°27'13.166"E	17/0	3	3	0
55	rybník Labuť	50°2'3.096"N, 14°27'30.152"E	2/0	1	1	0
60	Island	64°06'23.89" N, 21°46' 10.13" W	50/0	3	0	0
63	Obecnice (vojenský prostor)	49°43'4.980"N 13°55'32.047"E	226/0	1	0	0
45	Březnice	49°33'26.408"N, 13°57'15.104"E	3/0	2	2	0
52	Dněpr (Kyjev)	0°26'52.199"N, 30°30'20.434"E	12/8	3	3	0
Celkem			3397/95	142	135	860

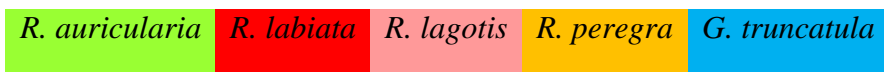
Vysvětlivky: * pitvy za účelem determinace,** Internal Transcribed Spacer 2 (oblast jederné DNA), *** segment velké podjednotky mitochondriální rDNA

potok	tůňka, paměniště	kaluž, příkop	ponorný potok (krasová jeskyně)	rybník, jezero	řeka
-------	---------------------	------------------	------------------------------------	----------------	------

Obr. 4. 2: Orientační vyznačení oblastí, ve kterých byly prováděny sběry na vybraných lokalitách.



Vysvětlivky:



4. 2. Vyšetřování plžů na přítomnost vývojových stadií motolic

Celkem bylo vyšetřeno 3385 plžů rodu *Radix* (nebyli vyšetřováni jedinci z Ukrajiny, kteří již byli fixováni etanolem) a 860 jedinců *G. truncatula*. Nejčastěji byly nalézány xifidiocerkárie a cercárie echinostomních motolic. Na dvou lokalitách byli nalezeni plži s nákazou motolicemi čeledi Notocotyliidae (Okoř, Botanická zahrada Praha). Na jedné lokalitě byla zaznamenána nákaza *Sanguinicola inermis* (Řevnice).

Nákazy motolicemi rodu *Trichobilharzia*

Motolice rodu *Trichobilharzia* byly nalezeny v devíti plžích ze tří lokalit. Dle molekulárních metod byly cercárie určeny jako *Trichobilharzia franki*. Nálezy jsou zaznamenány v Tab. 4. 3

Tab. 4. 3: Infekce z přírodních lokalit *R. auricularia* infikování motolicí *T. franki*

Číslo lokality	Název lokality	Druh plže	GPS souřadnice	Počet vyšetřovaných plžů (<i>Radix</i> sp.)	Počet infikovaných plžů	Prevalence (%)
16	Voznice	<i>R. auricularia</i>	49°49'5.63"N, 14°13'1.716"E	214	4	1,9
55	rybník Labuť	<i>R. auricularia</i>	50°2'3.096"N, 14°27'30.152"E	1	1	100
49	Otín	<i>R. auricularia</i>	49°7'57.538"N, 15°3'54.734"E	83	1	1,2
22	Trhové Dušníky	<i>R. auricularia</i>	49°43'3.715"N 14°0'59.893"E	63	3	4,7
Celkem				361	9	2,5

Nákazy motolicí *Fascioloides magna*

Nákazy motolicí *F. magna* byly zaznamenány celkem ze tří lokalit. Nákazy byly potvrzeny u plžů *R. labiata* a *G. truncatula*. Plži byli vyšetřováni pitevně ve spolupráci s Janem Pankrácem a Monikou Košťákovou. Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 4. 4 a Tab. 4. 5. Nalezená vývojová stadia byla určena dle sekvenace ITS-2 oblasti Veronikou Sieglou. V případě vyšetření na nákazu *F. magna* se neosvědčila vyplouvací metoda (viz kapitola 3. 1).

Tab. 4. 4: Infekce z přírodních lokalit *R. labiata* motolicí *F. magna*

Číslo lokality	Název lokality	GPS souřadnice	Počet pitvaných plžů (<i>Radix</i> sp.)	Počet infikovaných plžů	Prevalence (%)
62	Sedliště (obora)	49°32'27.708"N 13°38'40.347"E	155	1	0,6
63	Obecnice (vojenský prostor)	49°43'4.980"N 13°55'32.047"E	226	1	0,4
Celkem			381	2	0,5

Tab. 4. 5: Infekce z přírodních lokalit *G. truncatula* motolicí *F. magna*

Číslo lokality	Název lokality	GPS souřadnice	Počet pitvaných plžů	Počet infikovaných plžů	Prevalence (%)
62	Sedliště(obora)	49°32'27.708"N 13°38'40.347"E	30	1	3,3
34	Obecnice (obora)	49°42'40.623"N, 13°57'49.906"E	24*	20	83
celkem			54	21	38

Vysvětlivky: * Tito plži byli nejprve vyšetřováni vyplovací metodou, výsledek byl negativní.

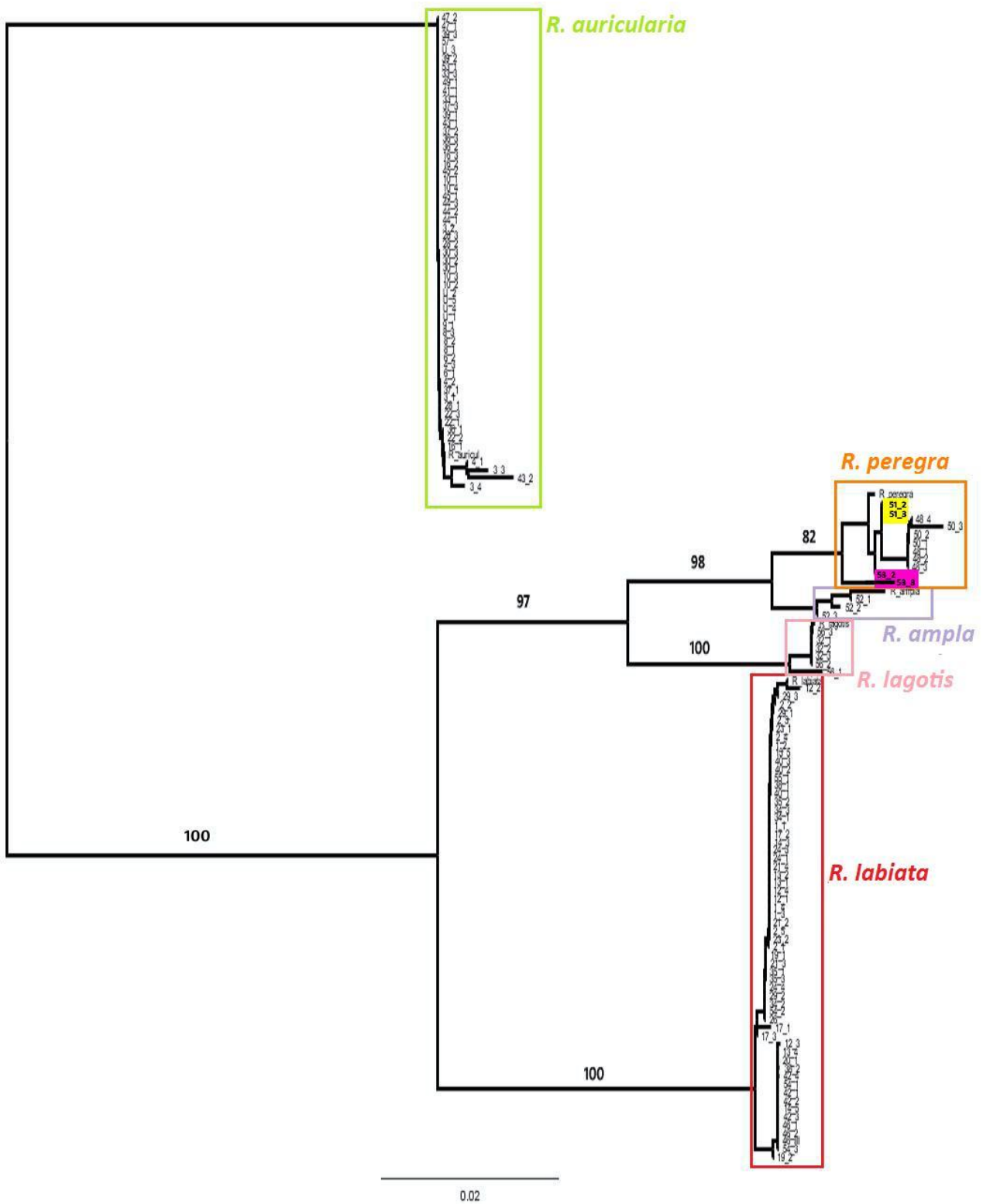
4. 3. Determinace plžů

4. 3. 1. Molekulární analýza

V rámci molekulární analýzy byly sekvenovány dva geny, a to pro ITS2 a 16S. Celkem bylo osekvenováno 151 plžů rodu *Radix* z 57 lokalit. Sekvence ITS2 byly získány ze 142 plžů a sekvence 16S ze 135 plžů. Na základě získaných sekvencí byl pro každý gen sestaven jeden fylogenetický strom (Obr.4. 6 a 4. 7). Oba fylogenetické stromy rozdělily analyzované plže do 5 skupin. Ke každé skupině byla přiřazena sekvence z databáze NCBI dle Barguesové a kol. 2001, s názvy *R. auricularia*, *R. labiata*, *R. peregra*, *R. lagotis* a *R. ampla*¹. Analýzy obou genů určily *R. auricularia* jako nejodlišnější druh v rámci rodu *Radix*. Druhy *R. peregra*, *R. lagotis* a *R. ampla* si byly navzájem blízké. V rámci obou stromů byly pozorovány i rozdíly. Analýza sekvencí genu pro ITS2 ukázala větší příbuznost *R. ampla* a *R. peregra*. Analýza sekvencí genu pro 16S ukázala větší příbuznost *R. ampla* a *R. lagotis*. Dále bylo zjištěno rozdílné druhové zařazení některých jedinců v rámci jednotlivých stromů. Jedinci s označením 51.2, 51.3, 53.2 a 53.3 byli dle sekvencí ITS2 určeni jako *R. peregra*. Dle 16S byli jedinci 51.2 a 51.3 určeni jako *R. auricularia* a jedinci 53.2 a 53.3 jako *R. lagotis* (viz Obr. 4. 6 a 4. 7)

¹ Jednotlivým skupinám ve stromu pro 16S byly přiřazeny sekvence izolátů (Remigio 2002): **R. sp. Rumunsko** (*R. auricularia sensu* Bargues a kol. 2001), **R. sp. Kanada** (*R. auricularia sensu* Bargues a kol. 2001), **R. peregra** (*R. labiata sensu* Bargues a kol. 2001) a **R. auricularia** (*R. lagotis sensu* Bargues a kol. 2001). Databáze NCBI neobsahuje sekvenci 16S pro *R. ampla*. Nicméně pro přehlednost bylo dále užíváno názvosloví dle Bargues a kol. (2001) pro oba dva geny.

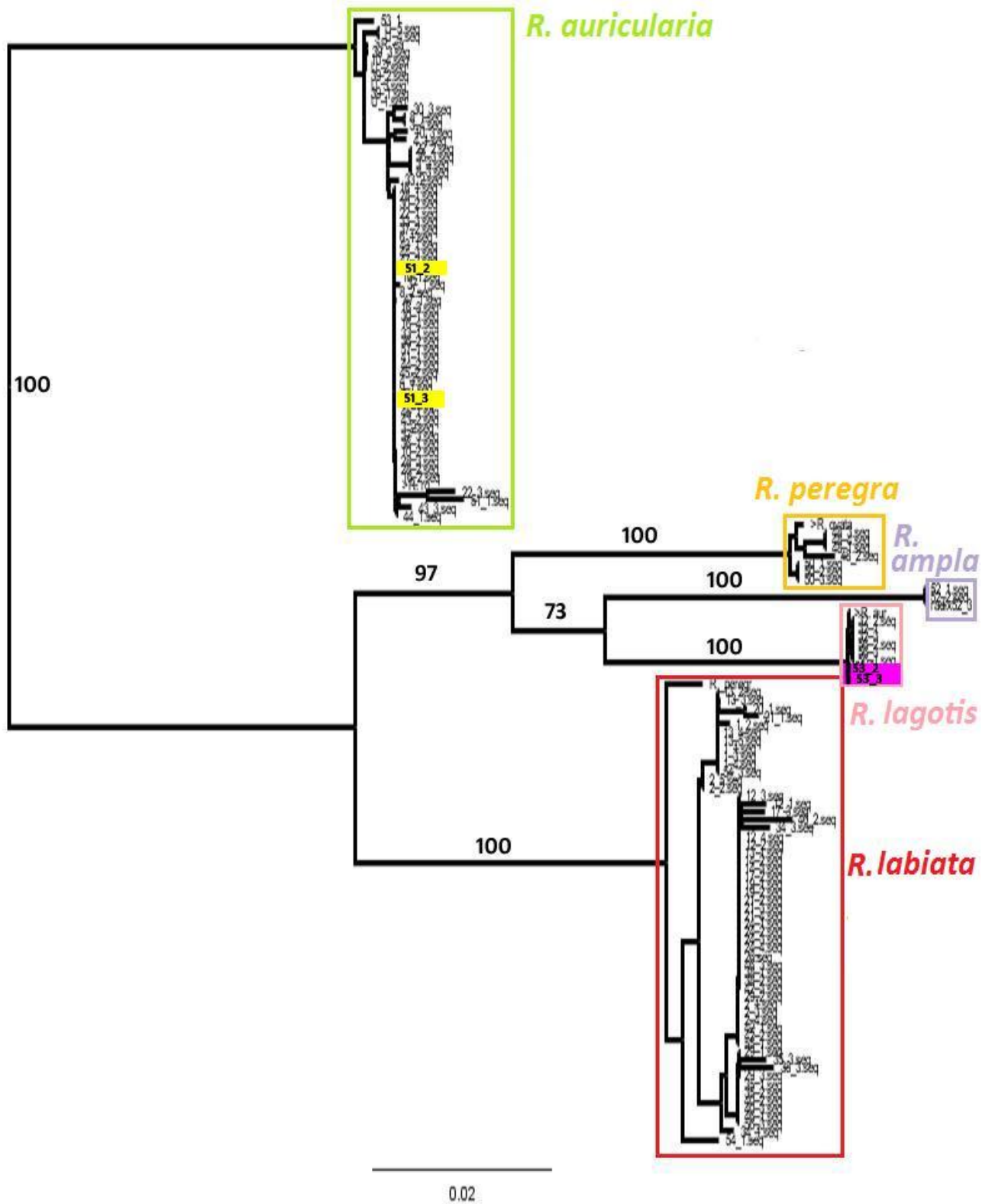
Obr. 4. 6: Fylogenetický strom pro gen ITS2, znázorňující mezidruhové vztahy rodu *Radix* vytvořen metodou Neighbour – joining



Vysvětlivky: – označení rozdílného umístění plžů 53.2 a 53.3 v obou fylogenetických stromech

- označení rozdílného umístění plžů 51.2 a 51.3 v obou fylogenetických stromech. Čísla jednotlivých větví označují procentuální věrohodnost větvení odhadnuté pomocí bootstrappingu s 1000 opakováním

Obr. 4. 7: Fylogenetický strom pro gen 16S, znázorňující mezidruhové vztahy rodu *Radix* vytvořen metodou Neighbour – joining



Vysvětlivky: – označení rozdílného umístění plžů 53.2 a 53.3 v obou fylogenetických stromech

- označení rozdílného umístění plžů 51.2 a 51.3 v obou fylogenetických stromech. Čísla jednotlivých větví označují procentuální věrohodnost větvení odhadnuté pomocí bootstrappingu s 1000 opakováním

4. 3. 2. Pitvy pohlavní soustavy

Celkem bylo vypitváno 95 plžů z 31 lokalit. Sledované znaky (umístění a tvar kopulační burzy, tvar duktu kopulační burzy) se podařilo najít u 51 jedinců z 19 lokalit. V průběhu práce bylo od determinace dle morfologie pohlavní soustavy upuštěno z důvodu časté destrukce pohlavní soustavy vývojovými stadii motolic. Důvodem bylo i zjištění heterogenity sledovaných znaků u jedinců stejného druhu (viz obr. 4. 8 a 4. 9).

R. labiata

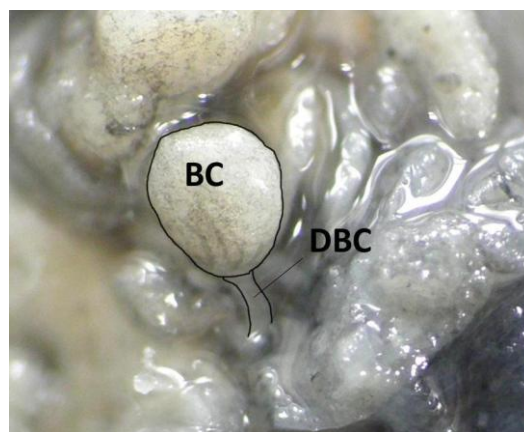
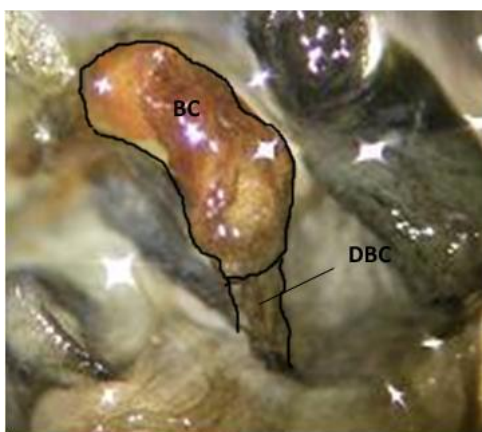
Celkem bylo pitváno 43 jedinců ze 13 lokalit. U 24 (56%) byly nalezeny hledané determinační znaky. U 11 (26%) jedinců byla v důsledku nákazy vývojovými stadii motolic zničena pohlavní soustava, u 8 (19%) se nepodařilo determinační znaky nalézt. V rámci tohoto druhu byla pozorována variabilita ve tvaru kopulační burzy. Kopulační burza byla uložena v pravé části plášťové dutiny (obr. 4. 10). Tvar kopulační burzy plynule přecházel od kulovité (4 jedinci, 17%), přes hruškovitou (8 jedinců, 33%) až po protáhlou (12 jedinců, 50%). Tvarová variabilita byla pozorována také u duktu kopulační burzy. Ten byl krátký a silný (20 jedinců, 83%), nebo krátký a tenký (4 jedinci, 17%), viz Obr. 4. 8 a Obr. 4. 9.

Obr. 4. 8: Kopulační burza a její duktus u

Obr.4. 9: Kopulační burza a její

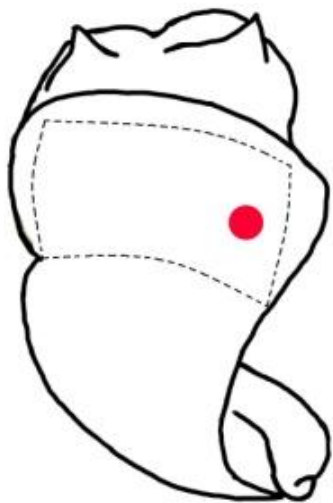
R. labiata

duktus u *R. labiata*



Vysvětlivky pro Obr. 4. 8 a 4. 9: BC – kopulační burza, DBC – duktus kopulační burzy, konturami jsou zvýrazněny sledované znaky

Obr. 4. 10: Dorzální pohled na uložení kopulační burzy u *R. labiata* při pitvě (autor: Leontovyč nepublikováno)

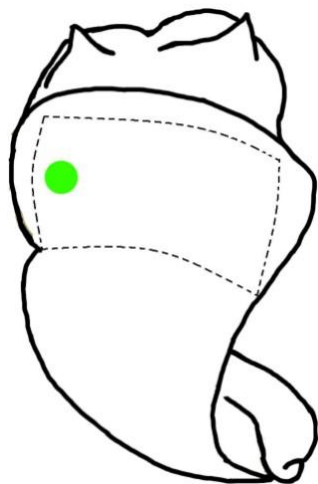


Vysvětlivky: ● - kopulační burza, přerušovanou čarou je naznačeno otevření plášťové dutiny při pitvě

R. auricularia

Celkem bylo pitváno 45 jedinců z 12 lokalit. U 30 (67%) byly nalezeny hledané determinační znaky. U 5 (11%) jedinců byla v důsledku nákazy vývojovými stadii motolic zničena pohlavní soustava, u 10 (22%) se nepodařilo determinační znaky nalézt. V rámci tohoto druhu byla pozorována minimální variabilita ve tvaru kopulační burzy. Kopulační burza byla kulovitá (28 jedinců, 93%) (viz Obr. 4. 12), nebo protáhlá (2 jedinci, 7%) Kopulační burza byla uložena v levé části plášťové dutiny (obr.4. 11). Duktus kopulační burzy byl u všech jedinců dlouhý a tenký (viz obr.4. 11).

Obr. 4. 11: Dorzální pohled na uložení kopulační burzy *R. auricularia* při pitvě
(autor: Leontovyč, nepublikováno)



Vysvětlivky: ● - kopulační burza, burza, přerušovanou čarou je naznačeno burzy otevření plášťové dutiny při pitvě jsou zvýrazněny sledované znaky

Obr. 4.12: Kopulační burza a její duktus *R. auricularia*

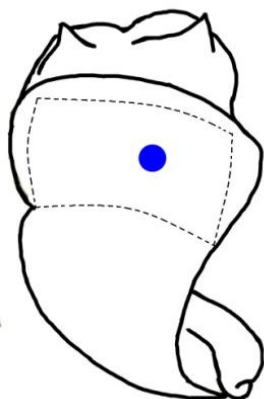


Vysvětlivky: BC – kopulační
DBC - duktus kopulační
konturami

R. lagotis

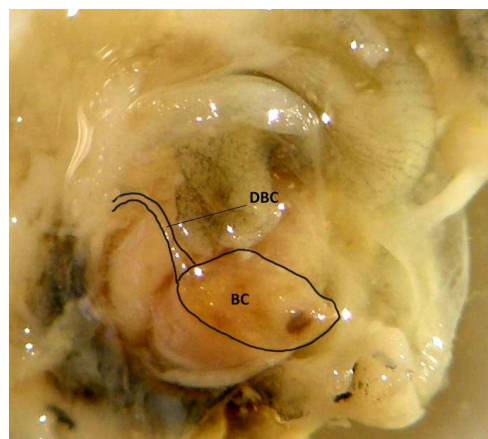
Celkem bylo pitváno 16 jedinců ze 3 lokalit. U 5 jedinců z jedné lokality (31 %) byly nalezeny hledané determinační znaky. U 11 (69%) se nepodařilo determinační znaky nalézt. Kopulační burza byla oválná a její duktus byl středně dlouhý a tenký (Obr. 4.14) Kopulační burza byla uložena v prostřední části plášťové dutiny, ale posunutá lehce k pravé straně (Obr. 4. 13)

Obr. 4. 13: Dorzální pohled na uložení kopulační burzy *R. lagotis* při pitvě
(autor: Leontovyč, nepublikováno)



Vysvětlivky: ● - kopulační burza, burza, přerušovanou čarou je naznačeno burzy otevření plášťové dutiny při pitvě zvláště sledované znaky

Obr. 4.14: Kopulační burza a její duktus *R. lagotis*

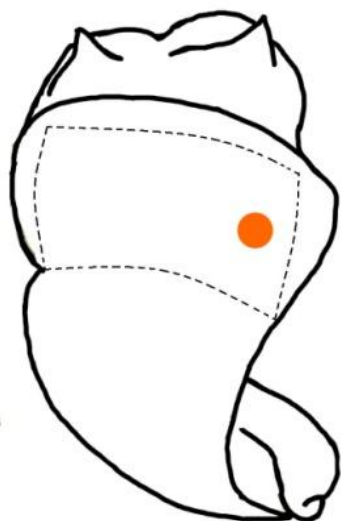


Vysvětlivky: BC – kopulační burza
DBC - duktus kopulační
konturami jsou

R. peregra

Celkem bylo pitváno 10 jedinců ze 2 lokalit. U 1 jedince z jedné lokality (10 %) byly nalezeny hledané determinační znaky. U 5 (50%) jedinců byla v důsledku nákazy vývojovými stadii motolic zničena pohlavní soustava. U 4 (40 %) se nepodařilo determinační znaky nalézt. Kopulační burza byla kulovitá a její duktus byl středně dlouhý a tenký (Obr. 4. 16). Kopulační burza byla uložena v pravé části plášťové dutiny (obr. 4. 15).

Obr. 4. 15: Dorzální pohled na uložení kopulační burzy *R. peregra* při pitvě (autor:Leontovyč,nepublikováno)

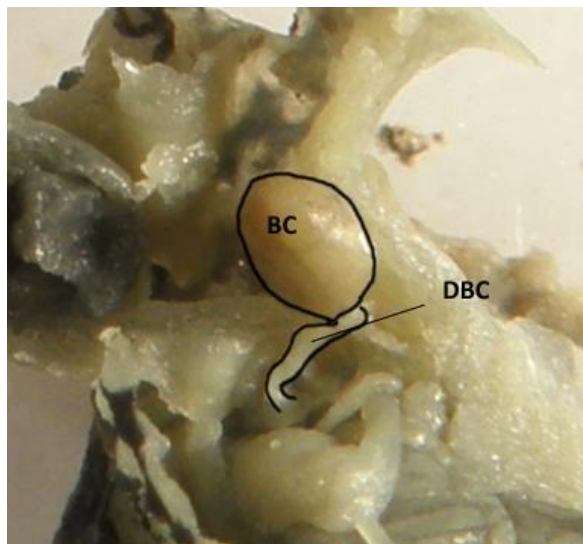


Vysvětlivky: ● - kopulační burza, přerušovanou čarou je naznačeno otevření plášťové dutiny při pitvě znaky

R. ampla

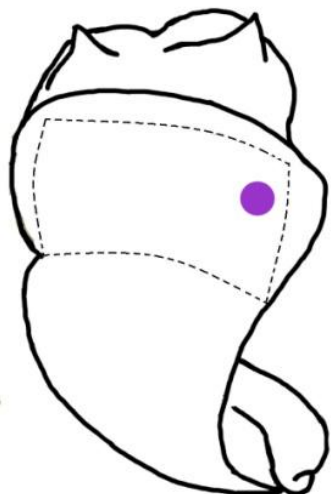
Celkem bylo pitváno 7 jedinců z 1 lokality. U 1 jedince (14 %) byly nalezeny hledané determinační znaky. U 4 jedinců (57 %) byla v důsledku nákazy vývojovými stadii motolic zničena pohlavní soustava. U 2 jedinců (29 %) se nepodařilo determinační znaky nalézt. Kopulační burza byla kulovitá a její duktus byl krátký silný a viditelně odděloval kopulační burzu od vagíny (Obr. 4. 18). Kopulační burza byla uložena v pravé části plášťové dutiny (Obr.4. 17).

Obr. 4.16: Kopulační burza a její duktus *R. peregra*



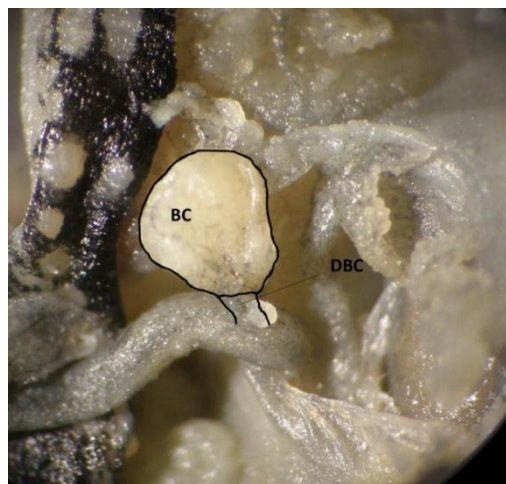
Vysvětlivky: BC – kopulační burza, DBC - duktus kopulační burzy konturami jsou zvýrazněny sledované

Obr.4. 17 Dorzální pohled na uložení kopulační burzy *R. ampla* při pitvě (autor: Leontovyč, nepublikováno)



Vysvětlivky: ● - kopulační burza, přerušovanou čarou je naznačeno otevření plášťové dutiny při pitvě znaky

Obr. 4. 18: Kopulační burza a její duktus *R. ampla*



Vysvětlivky: BC – kopulační burza, DBC - duktus kopulační burzy konturami jsou zvýrazněny sledované

4. 3. 3. Morfometrie ulity

Cílem morfometrické analýzy mělo být nalezení determinačních znaků, které by umožnily zpětné zařazení studovaných plžů do skupin určených pomocí molekulárních technik. Z důvodu časové náročnosti celého procesu byl analyzován jeden exemplář z každé lokality (výjimkou byl druh *R. ampla*, kde byly k dispozici jedinci pouze z 1 lokality – analyzováni byli 3 jedinci). Celkem bylo proměřeno 54 ulit z 51 lokalit. Pro každou ulitu byla získána fotografie z 6 pohledů, každá pohled se skládal v průměru z 6 fotografií (viz kapitola 3. 3). Celkem tedy bylo pořízeno 1944 fotografií. Data byla získána pro všech 5 druhů (viz příloha 8. 7 – 8. 9) analyzovaných molekulárně - *R. auricularia* (22 jedinců), *R. labiata* (20 jedinců), *R. lagotis* (3 jedinci), *R. peregra* (6 jedinců) a *R. ampla* (3 jedinci). Celkem bylo sledováno 14 parametrů (viz kapitola 3. 3) Hodnoty jednotlivých měření viz příloha 8. 5

Pro statistické zpracování byly použity poměrové hodnoty jednotlivých parametrů, které byly zpracovány v programu R verze 2.10.1. (<http://www.r-project.org/>) Mgr. Alenou Černíkovou,

Ph.D. Pro statistickou analýzu bylo použito 11 poměrových hodnot (SUS/SUL, VZAV/VUL, OUS/OUL, SSEV1/ŠUL, ŠUS/VUS, VVRCH/SZAV, VVRCH/VZAV, ŠUS/VUL, VUS/VUL, ŠUS/ŠUL, ŠUL/VUL), které nebyly závislé na velikosti ulity.

4. 3. 3. 1.Deskriptivní statistika

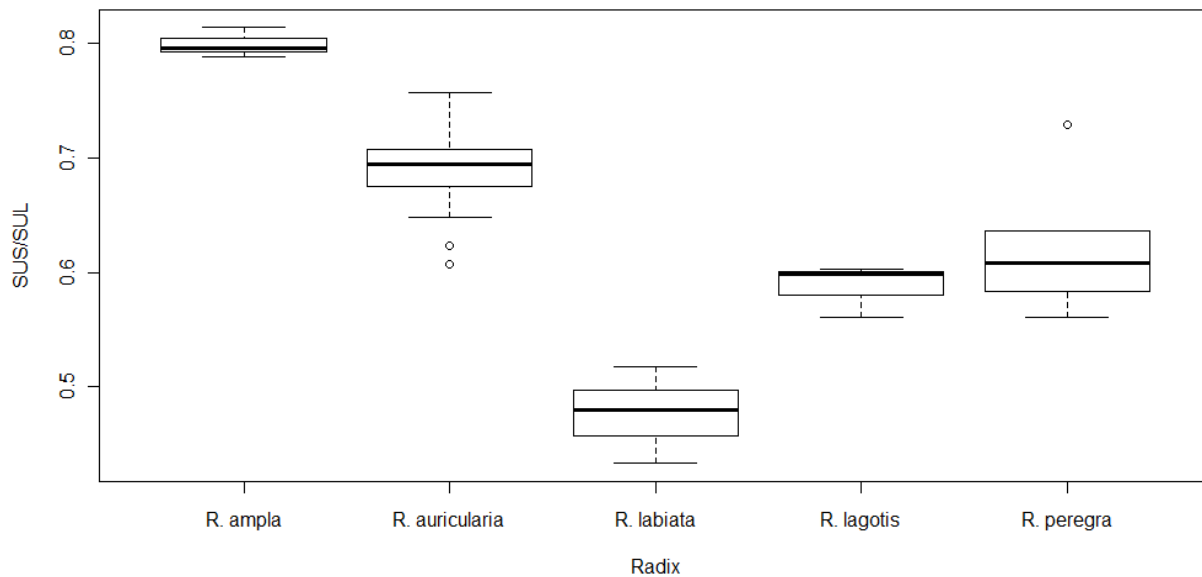
V rámci deskriptivní statistiky byly pro jednotlivé sledované znaky získány tyto hodnoty: průměr hodnot, směrodatná odchylka, minimum, dolní kvartil, medián, horní kvartil, maximum. (viz příloha 8. 1). Souhrn průměrů hodnot pro jednotlivé druhy viz Tab. 4. 19 Tyto hodnoty jsou vyneseny v grafech, které znázorňují odlišnosti druhů dle jednotlivých sledovaných parametrů (Obr 4. 20 – 4. 30). Výsledky ukazují, že nejpodobnějšími druhy dle většiny sledovaných znaků jsou dvojice *R. labiata* - *R. lagotis*, a dvojice *R. auricularia* - *R. peregra*. Výjimku tvoří poměr SUS/SUL, kde si jsou podobné druhy *R. lagotis* - *R. peregra* (viz Obr. 4. 20). *Radix ampla* byla dobře odlišitelná ve všech poměrech, s výjimkou poměru VVRCH/VZÁV, kde však byla pozorována homogenita v rámci všech pěti druhů (Obr. 4. 28).

Tab. 4. 19: Průměry poměrů měřených hodnot jednotlivých parametrů při determinaci plžů rodu *Radix*

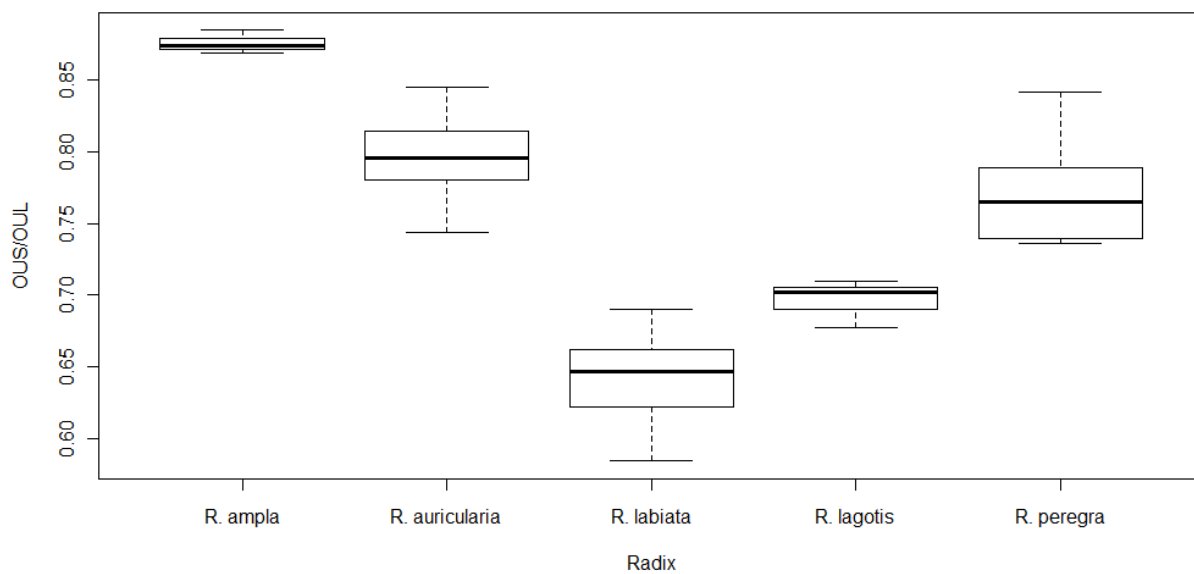
Druh plže	Průměry poměrů										
	SUS/ SUL	VZAV/ VUL	OUS/ OUL	SSEV1/ ŠUL	ŠUS/ VUS	VVRCH/ SZAV	VVRCH/ VZAV	ŠUS/ VUL	VUS/ VUL	ŠUS/ ŠUL	ŠUL/ VUL
<i>R.ampla</i>	0,800	0,137	0,873	0,123	0,890	0,533	0,433	0,793	0,890	0,930	0,850
<i>R.auricularia</i>	0,688	0,240	0,795	0,186	0,739	0,704	0,375	0,569	0,769	0,815	0,698
<i>R.labiata</i>	0,478	0,390	0,644	0,381	0,716	0,765	0,442	0,429	0,600	0,725	0,592
<i>R.lagotis</i>	0,587	0,350	0,697	0,310	0,730	0,750	0,403	0,463	0,637	0,767	0,607
<i>R.peregra</i>	0,622	0,260	0,773	0,242	0,763	0,613	0,392	0,575	0,750	0,810	0,712

Vysvětlivky: VUL – výška ulity, ŠUL – šířka ulity, VUS – výška ústí, ŠUS – šířka ústí, ŠSEV1 – šířka 2. švu, VVRCH – vzdálenost od vrcholu k 3. švu, VZÁV – vzdálenost od vrcholu k 4. švu, SUL – plocha obrysu ulity, OUL – obvod obrysu ulity, SUS – plocha ústí, OUS – obvod ústí

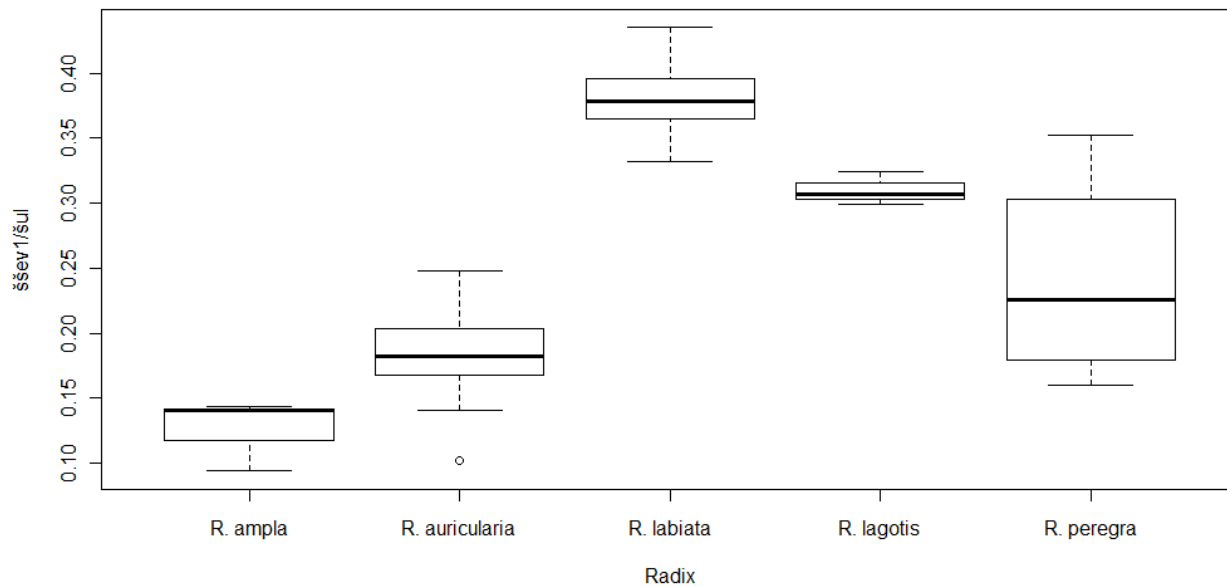
Obr.4. 20: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru plocha ústí /plocha obrysu ulity



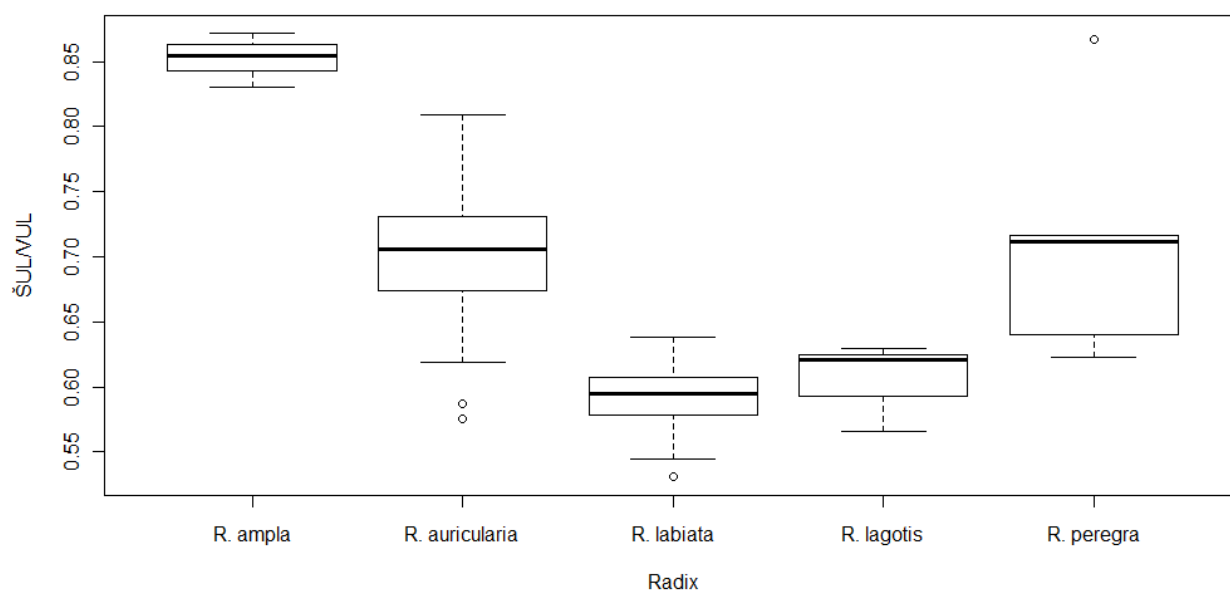
Obr. 4. 21: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru obvod ústí/obvod obrysu ulity



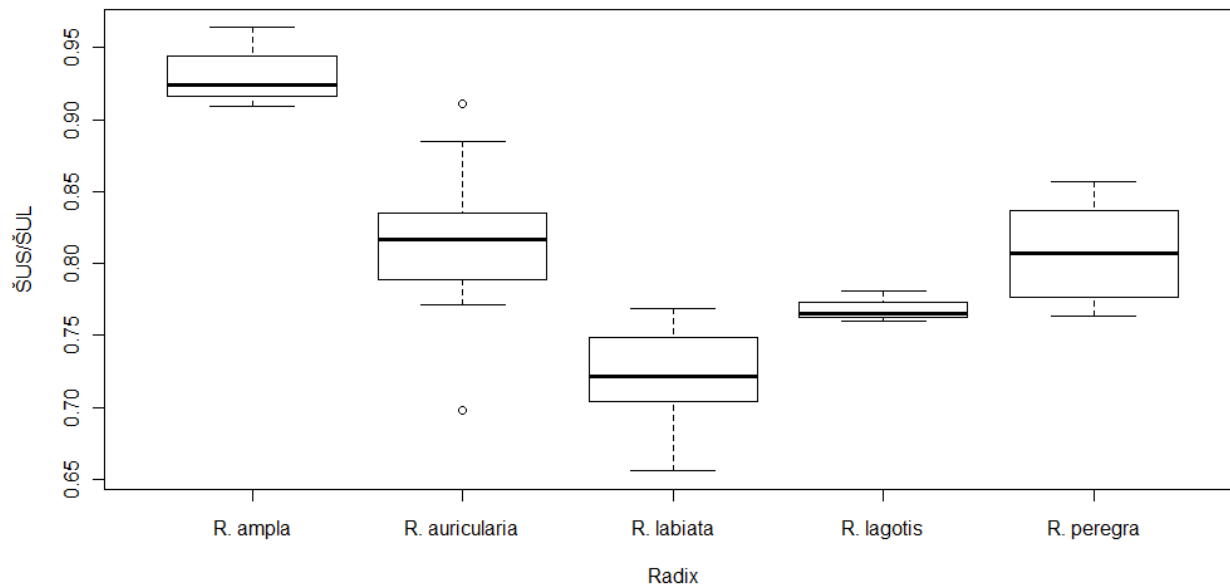
Obr.4. 22: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru šířka druhého švu/šířka ulity



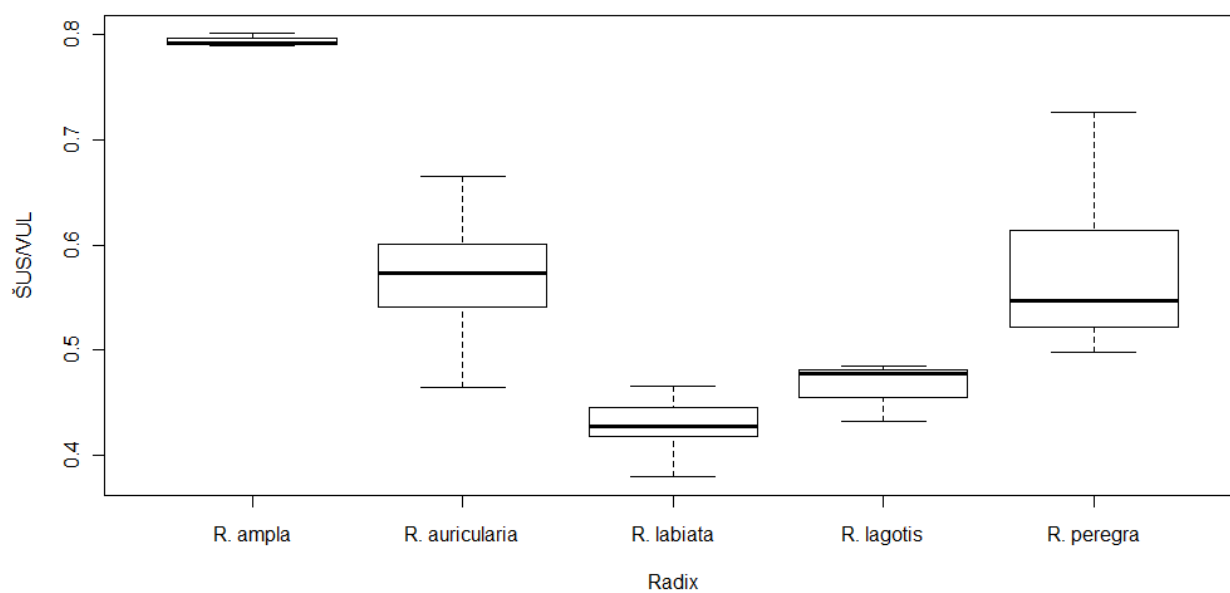
Obr. 4. 23: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru šířka ulity/výška ulity



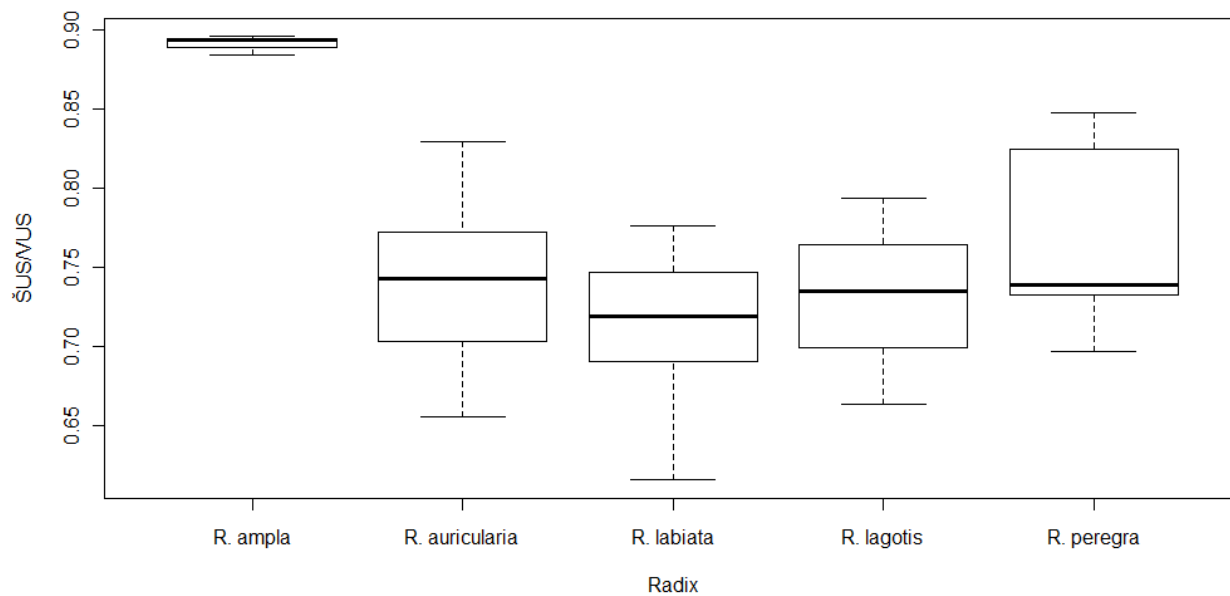
Obr. 4. 24: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru šířka ústí/šířka ulity



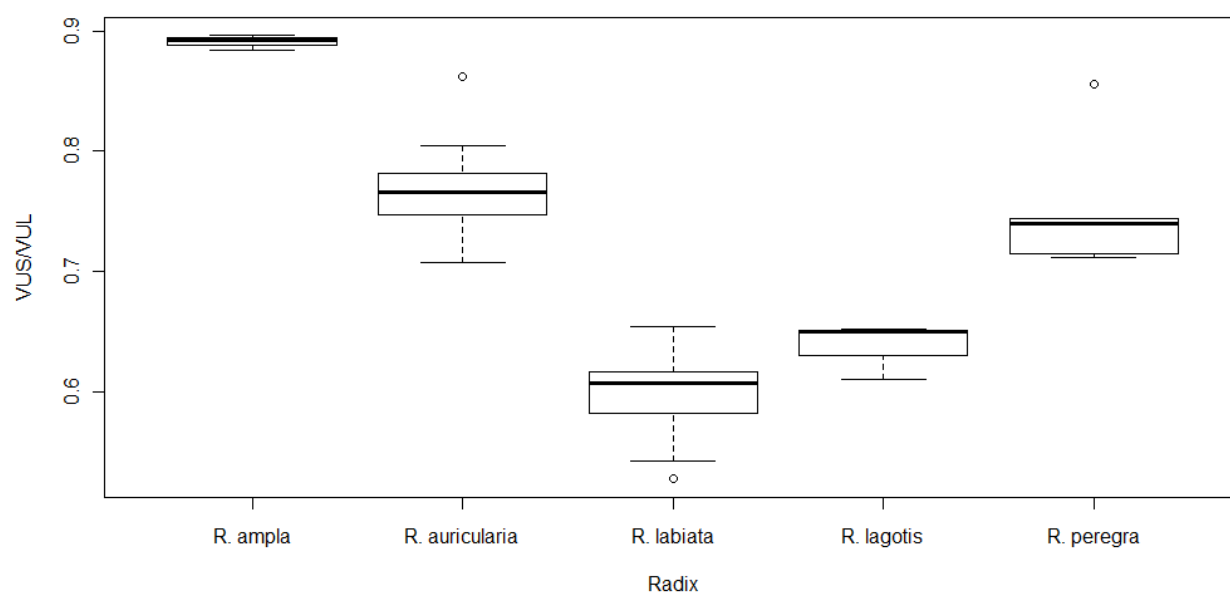
Obr. 4. 25: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru šířka ústí/výška ulity



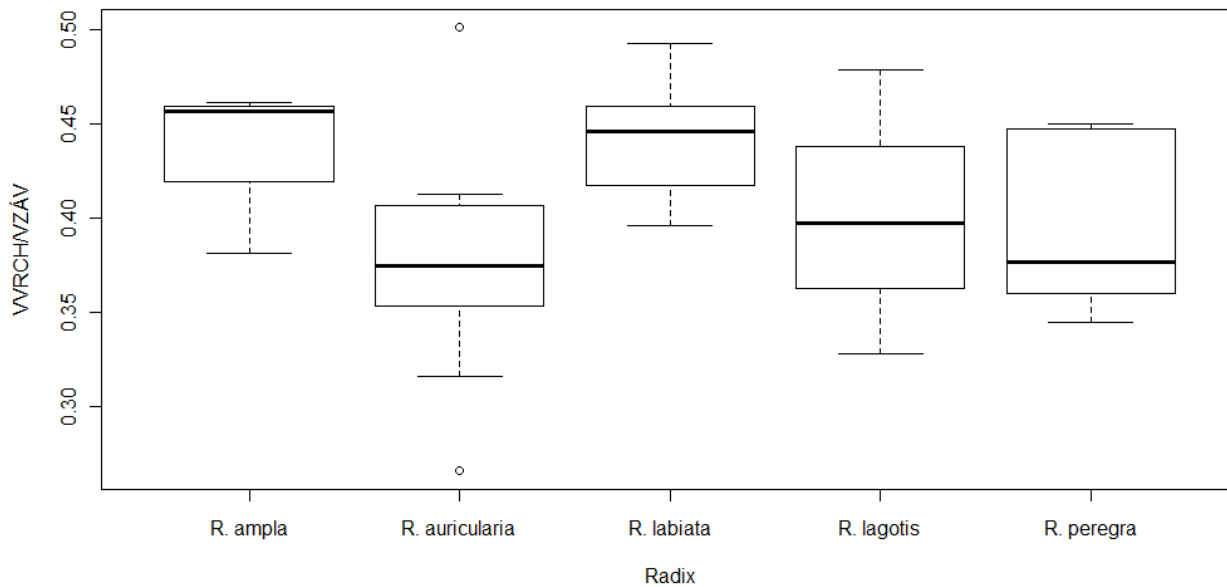
Obr. 4. 26: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru šířka ústí/výška ústí



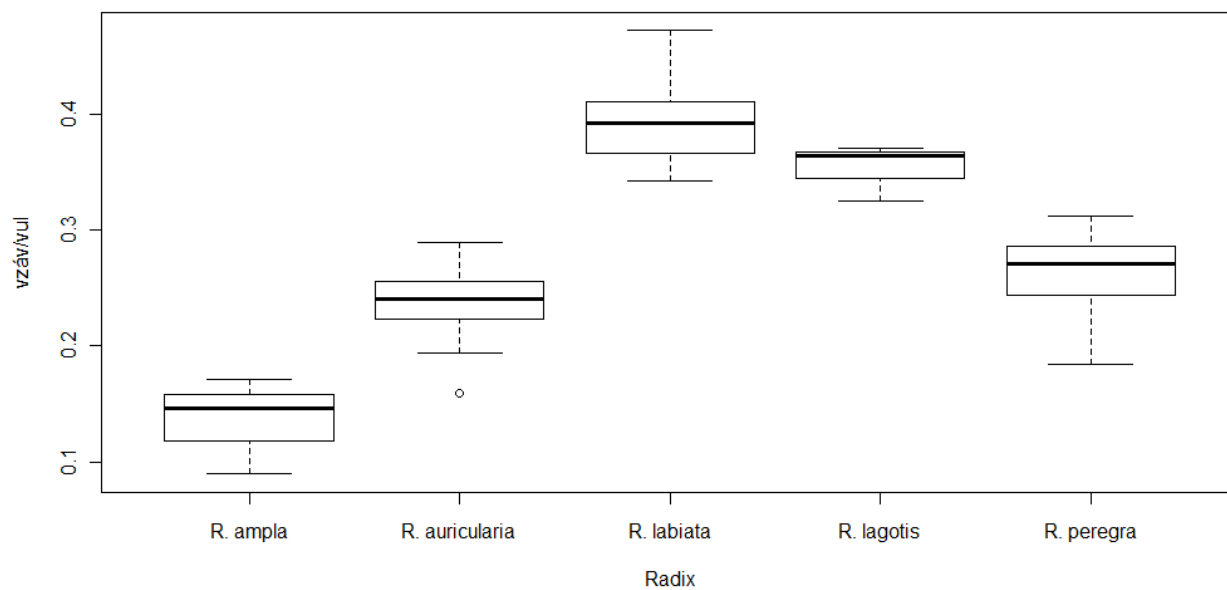
Obr. 4. 27: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru výška ústí/výška ulity



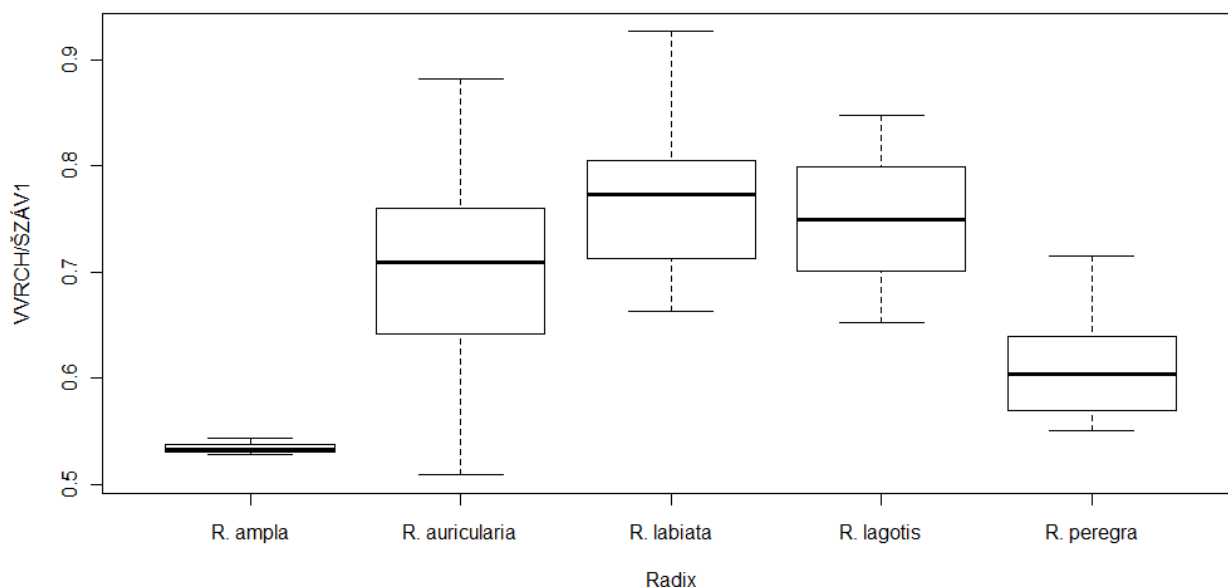
Obr. 4. 28: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru vzdálenost od vrcholu k 3. švu / vzdálenost od vrcholu k 4. švu



Obr. 4. 29: Znázornění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru vzdálenost od vrcholu k 4. švu / výška ulity



Obr.4. 30: Znárodnění rozdílů mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix* dle poměru vzdálenost od vrcholu k 4. švu / šířka 2. švu



4. 3. 3. 2. Analýza rozptylu

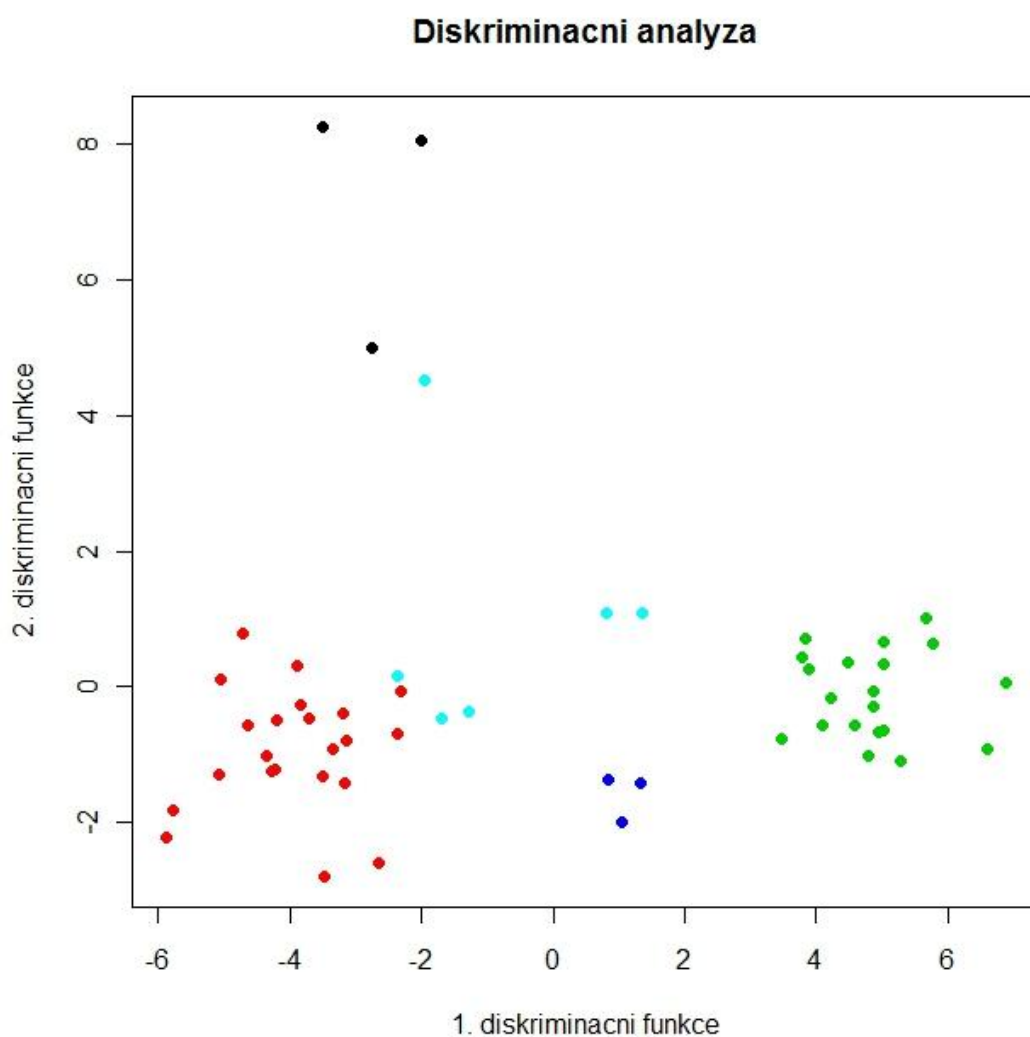
Výsledkem analýzy rozptylu mělo být zjištění, zda se jednotlivé druhy mezi sebou významně liší ve sledovaných znacích. Pro znaky, které měly normální rozdělení, a byla splněna podmínka shody rozptylu, byla použita metoda ANOVA, v ostatních případech byl použit Kruskal-Wallis test. Výsledky ukázaly, že jednotlivé druhy se mezi sebou významně liší vzhledem ke všem sledovaným proměnným, proto bylo použito Tukey-Cramerovo párové porovnání pro rozlišení konkrétních druhů. Ukázalo se, že pro každou dvojici druhů lze najít alespoň jednu sledovanou proměnnou, ve které se tyto dva druhy významně liší.

4. 3. 3. 3. Diskriminační analýza

Diskriminační analýza měla ověřit použitelnost sledovaných znaků pro zpětné zařazení jednotlivých plžů do druhů určených dle molekulárních metod. V rámci jednotlivých druhů, byl vypočítán pro každý sledovaný poměr koeficient (viz tab příloha 8. 2) Pomocí koeficientů všech parametrů byly vypočítány klasifikační proměnné (Klasp). Pro zařazení plže je nutné vypočítat klasifikační proměnnou pro každý druh, tedy 5 klasifikačních proměnných. Plž je

zařazen do druhu, jehož klasifikační proměnná nabude nejvyšší hodnoty (příklad viz příloha 8. 2). Ze všech 54 analyzovaných plžů se podařilo všechny zařadit do druhů, které byly určeny dle molekulárních metod. Průměrná hodnota úspěšnosti zařazení byla 99%, nejnižší úspěšnost byla 86%. Hodnoty pro jednotlivé plže jsou shrnuty v příloze 8. 3. Pomocí diskriminačních funkcí (viz příloha 8. 4) byl sestrojen „scatter-plot“ (Obr. 4. 31), který graficky znázorňuje odlišnosti jednotlivých druhů. Ze „scatter-plotu“ je patrné, že ve sledovaných znacích se dají velmi dobře odlišit druhy: *R. ampla*, *R. auricularia*, *R. lagotis* a *R. labiata*. *Radix peregra* vykazuje největší rozptyl, nicméně i tento druh se podařilo spolehlivě odlišit (viz výše).

Obr. 4. 31: „Scatter-plot“ prvních dvou diskriminačních funkcí, znázorňující rozlišení druhů *R. ampla*, *R. auricularia*, *R. lagotis*, *R. labiata*, a *R. peregra*.



Vysvětlivky: *R. auricularia* *R. labiata* *R. peregra* *R. lagotis* *R. ampla*

Výsledky statistické analýzy ukázaly, že dle sledovaných jedenácti znaků je možné s vysokou pravděpodobností zařadit plže do druhů, a tím pádem se jeví jako významné determinační znaky.

4. 3. 4. Experimentální nákazy plžů

Z důvodu zjištění vnímavosti vybraných druhů rodu *Radix* k infekcím jednotlivými motolicemi byly prováděny experimentální nákazy. V rámci pokusů byly použity druhy *R. lagotis* (chovy PřF UK), *R. labiata* (Mnichovka), *R. peregra* (Okoř), *R. natalensis* (od chovatele akvarijských rybek). Nákazy byly prováděny motolicemi *F. magna* a *T. regenti*. Počty plžů určených k nákaze byly omezené, proto nebyla možná unifikace jednotlivých experimentů. Ty měly pouze potvrdit nebo vyvrátit kompatibilitu dvojice parazit - meziphostitel. Schopnost miracidii infikovat meziphostitele byla ověřena infekcemi vnímavých meziphostitelů v rámci zavedených laboratorních cyklů, které prováděli Jan Pankrác (*F. magna*) a Vladimír Skála (*T. regenti*), tzn. každé experimentální infekci byli nakaženi stejnými miracidii i vnímaví plži v laboratorních cyklech (vždy úspěšně). Experimentální nákazy plžů jsou shrnuty v tabulkách 4. 32 a 4. 33

Tab. 4. 32: Experimentální nákazy plžů rodu *Radix* motolicí *F. magna*

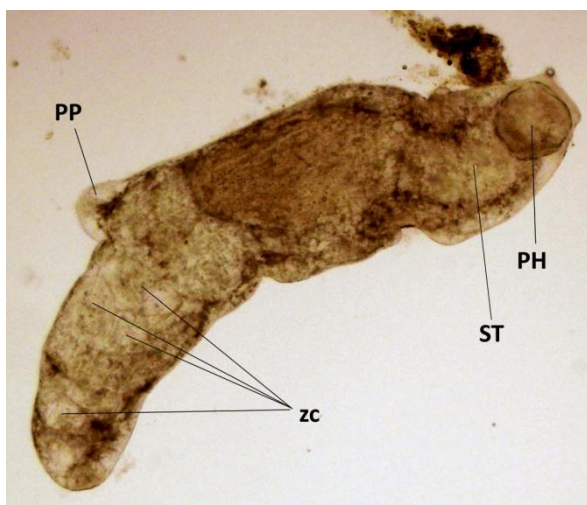
Druh plže	Experimentálně exponování plži					
	Počet plžů v experimentu	Počet miracidii na jednoho plže	Počet dnů infekce	Počet živých plžů	Počet úspěšně nakažených plžů	Počet redií v jednom plži
<i>R. lagotis</i>	70	3 - 5	44	42 (60 %)	2 (4,8 %)	13, 14
<i>R. lagotis</i>	72	8 - 10	57	30 (42 %)	0	0
<i>R. peregra</i>	41	5 - 6	40	11 (28 %)	0	0
<i>R. labiata</i>	24	20	35	20 (57 %)	1 %	30
<i>R. natalensis</i>	20	8 - 10	57	12	0	0

Tab. 4. 33: Experimentální nákazy plžů rodu *Radix* motolicí *T. regenti*

Druh plže	Experimentálně exponovaní plži				
	Počet plžů v experimentu	Počet miracidíí na jednoho plže	Počet dnů infekce	Počet živých plžů	Počet úspěšně nakažených plžů
<i>R. peregra</i>	48	3 - 5	32	47 (98 %)	30 (64 %)

Motolicí *F. magna* se podařilo úspěšně infikovat *R. lagotis*, redie však byly nedostatečně vyvinuté a bez přítomnosti cercárií. Dále byla pozorována úspěšná nákaza *R. labiata*, kde byly v rediích patrné zárodky budoucích cercárií (Obr. 4. 34)

Obr. 4. 34: Redie z experimentálně nakaženého plže *R. labiata* (zvětšeno 40X)



Vysvětlivky: PH – farynx, PP – porodní pór, ZC – zárodky cercárií, ST - střevo

4. 3. 5. Experimentální nákazy kachen

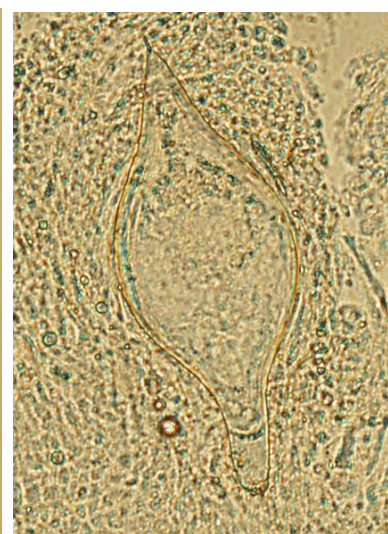
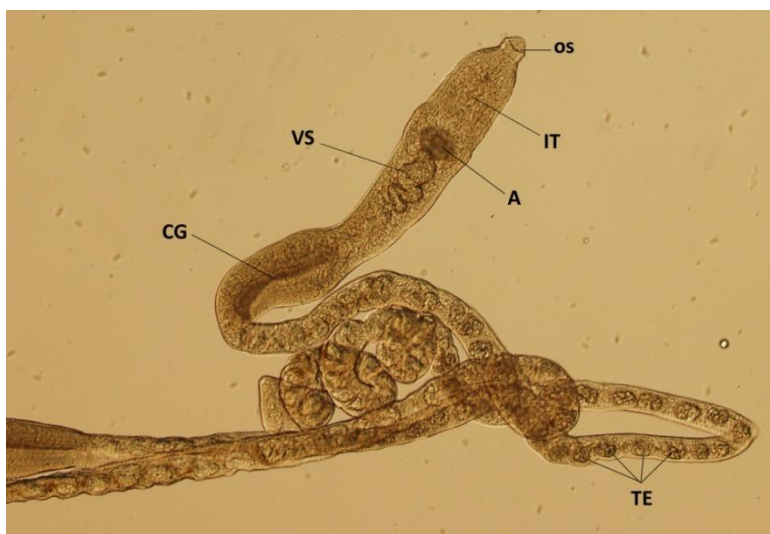
Experimentální nákazy probíhaly za účelem pozorování morfologie dospělců, pokud by se jednalo o nový druh ptačích schistosom. Nicméně molekulární analýzy probíhající během prepatentní doby, určily všechny cercárie jako *T. franki*. Celkem byly nakaženy 4 kachny schistosomními cercáriemi z plžů ze 3 lokalit. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 4. 35

Tab. 4. 35: Výsledky pitev experimentálně nakažených kachen cercáriemi z plžů z volné přírody

Plž	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Název lokality	Voznice, Brdy	Voznice, Brdy	Trhové Dušníky, Brdy	Rybník Labuť, Praha
Číslo lokality	16	16	22	55
Nález po pitvě	Dospělci v cévách kolem tenkého střeva, vajíčka ve stěně střeva (Obr. 4. 36a 4. 37)	Dospělci v cévách kolem tenkého střeva, vajíčka ve stěně střeva	Dospělci v cévách kolem tenkého střeva (pouze samci)	negativní
Druh motolice (sekvenace COI z cercárií)	<i>T. franki</i>	<i>T. franki</i>	<i>T. franki</i>	<i>T. franki</i>

Obr. 4. 36: Dospělý samec *T. franki* (zvětšeno 55X)

Obr.4. 37: Vejce *T. franki* (zvětšeno 130x)



Vysvětlivky: OS – ústní přísavka, IT – střevo, VS vesicula seminalis, A – acetabulum, CG – canalis gynaeophorus, T - testes

5. DISKUSE

5. 1. Sběry a vyšetření plžů z přírody

Plži byli sbíráni na různých typech lokalit. Výskyt některých druhů byl poměrně silně závislý na charakteru lokality a většinou se shodoval s popisy uváděnými v literatuře (Uličný 1825, Ložek 1951, Jackiewicz 2000, Beran 2002). Například *R. auricularia* nebyl nikdy nalezen v rychleji proudící vodě. Naopak *R. peregra* byl zaznamenán v potoce s poměrně silným proudem. Rozdílný charakter lokality výskytu můžeme pozorovat také u druhů *R. labiata* a *R. lagotis*. Nálezy *R. labiata* byly vázané na menší potoky, lesní tůně a prameniště, často se semiakvatickým charakterem. Na takovýchto lokalitách nebyl *R. lagotis* zaznamenán. *Radix lagotis* byl pozorován na dvou lokalitách, které se svým charakterem podobaly lokalitám vyhovujícím *R. auricularia*. Ložek (1951) uvádí pro *R. lagotis*, mimo jiné, potoky a velké prameny, tedy lokality, na kterých byl v rámci této práce nacházen druh *R. labiata*. Je ale možné, že jedinci uvádění Ložkem na těchto lokalitách byli ve skutečnosti *R. labiata*. *Radix ampla* byla v této práci obdržena z Dněpru (hlavní tok), tedy z velkého vodního toku, což je často uváděná typická lokalita (Ložek 1951, Jackiewicz 2000, Beran 2002). Nicméně ti samí autoři uvádějí jako možnou lokalitu výskytu stojaté vody a ramena řek, tady místa, kde se můžeme setkat s druhem *R. auricularia*. Z výše uvedeného vyplývá, že charakter lokality výskytu není zvláště spolehlivým determinačním kritériem, ale může v některých případech sloužit jako jedno z vodítek při druhové determinaci plžů rodu *Radix*.

V rámci vyšetřování plžů z přírody byla zjištěna nízká prevalence nákazy motolicemi čeledi Schistosomatidae. Celkem bylo nalezeno 9 plžů vylučujících schistosomní cercárie z celkového počtu 3385, prevalence tedy byla 0,27 %. Tyto výsledky se téměř shodují s výsledky Holické (2009), která pozorovala nákazu ptačími motolicemi u 14 plžů rodu *Radix* z celkových 5929 (prevalence 0,24 %). Oproti tomu Huňová (2008-) na území ČR neuvádí žádný pozitivní nález čeledi Schistosomatidae, což může být zapříčiněno menším počtem vyšetřovaných plžů (1568). Nízké prevalence (0,007 – 3 %) jsou také hlášeny na území Evropy (Loy and Hass 2001, Jouet a kol. 2008, Skirnisson a kol. 2009). V literatuře se však můžeme setkat i s údaji o prevalencích v řádech desítek procent (Beer & Voronin 2007, Valdovinos & Balboa 2008, Skirnisson o kol. 2009), nicméně jedná se o ojedinělé případy, které mohou být způsobené aktuálními příznivými podmínkami pro přenos a vývoj trichobilharzií. V rámci této práce byli plži sbíráni také na lokalitách, jako jsou lesní strouhy,

prameniště, ponorný potok v krasové jeskyni, tedy místech, kde je pravděpodobnost výskytu ptačích motolic velmi malá z důvodu silného proudění vody (překážka při nakažení plžů miracidiiem a konečného hostitele cercárii) nebo absence výskytu definitivních hostitelů. Proto by bylo v publikacích vhodné uvádět i doplňující informaci o prevalenci na lokalitách, kde je reálná možnost se s ptačími motolicemi setkat, tzn. stojatá nebo mírně tekoucí voda, bez nadměrné eutrofizace, dostatek mezihostitelů a definitivních hostitelů. Pokud by byly v rámci této práce uvažovány pouze lokality splňující tato kritéria, prevalence by tak stoupla téměř na dvojnásobek (0,47%), jelikož by nebyli uvažováni plži z lokalit nevhodných pro přenos ptačích schistosom.

Ve všech případech nalezených infikovaných plžů se jednalo o druh *R. auricularia* s nákazou *T. franki*. *Trichobilharzia regenti*, která se vyskytuje na našem území (Horák a kol. 1998), nebyla nalezena. Příčinou může být malé množství vyšetřených plžů *R. lagotis* (116 jedinců ze 2 lokalit), kteří slouží jako mezihostitelé. *Trichobilharzia regenti* může infikovat i druh *R. labiata* (Vostrý 2010), který byl hojně sbírán a vyšetřován, nicméně tento druh se většinou vyskytoval na lokalitách, které byly pro ptačí schistosomy nevhodné z výše uvedených důvodů. Velmi časté byly nálezy xifidiocercárií a echinostomních cercárií. Redie echinostomních motolic jsou oproti sporocystám schistosom zvýhodněné dravým způsobem života, což může být také důvodem celkově nízké prevalence trichobilharzií, které mohou být těmito rediemi likvidovány. Nicméně byl nalezen jeden plž se smíšenou infekcí echinostomními cercáriemi a *T. franki*. Vývoj nákazy však nemohl být sledován, neboť infikovaný plž rychle uhynul. Dá se předpokládat, že by vývoj nákazy dopadl ve prospěch redií echinostomní motolice, jak ve své práci uvádí Podhorský (2006). Plži nakažení *Fascioloides magna* byli zaznamenáni na třech lokalitách. Byli nalezeni infikovaní plži *R. labiata* a *G. truncatula*. Ve všech případech se jednalo o lokality s vysokou prevalencí *F. magna* u volně žijící spárkaté zvěře (Kašný, ústní sdělení). Zatímco celková prevalence u *G. truncatula* byla 38 %, u rodu *Radix* byla pouze 0,5 %. Ve dvou případech na stejné lokalitě žili jak plži *Galba truncatula*, tak plži rodu *Radix*. Na lokalitě, kde se vyskytovala *G. truncatula* v hojném počtu (v řádu stovek) a byla u ní zjištěna prevalence 83 %, nebyl žádný z nalezených plžů *R. labiata* infikovaný. Naopak na lokalitách, kde byl výskyt plžů *G. truncatula* sporadický nebo nebyl vůbec zaznamenán, byla infekce plže *R. labiata* potvrzena. Z výše uvedeného tedy lze usuzovat, že pokud má *F. magna* k dispozici dostatek standardních mezihostitelů, neinfikuje mezihostitele náhradní. Tento výsledek však nelze srovnat s výsledky jiných prací, neboť jediná publikace, týkající se infekce plže rodu *Radix* z volné přírody motolicí *F. magna* (Faltýnková a kol. 2006), neuvádí četnost standardních hostitelů na

dané lokalitě. Důležitým poznatkem je také to, že v případě vyšetřování plžů na vývojová stadia motolice *F. magna* je vyplouvací metoda (detaily viz kapitola 3. 1) nevhodná. Zatímco touto metodou bylo 350 jedinců *G. truncatula* označeno za negativní, po umístění do akvária za účelem chovu byly po několika týdnech pozorovány na skle metacerkárie. Kontrolní pitva 24 plžů ukázala 83% prevalenci. Toto by mohl být důvod, proč infikování plži rodu *Radix* unikají pozornosti parazitologů. Ačkoli není vyplouvací metoda optimálním řešením při vyšetření plžů na vývojová stadia motolic (Kolářová a kol. 2010), je přesto často používána.

5. 2. Experimentální infekce plžů rodu *Radix*

Do experimentálních pokusů byly zahrnuty 4 druhy plžů (*R. lagotis*, *R. labiata*, *R. peregra* a *R. natalensis*), kteří byli vystaveni infekci *F. magna* (všichni výše uvedení) a *T. regenti* (*R. peregra*). *R. natalensis* je významným mezihostitelem *F. gigantea* a jeho zapojení do infekčních pokusů mělo ověřit kompatibilitu s *F. magna*. Největším problémem bylo získat plže, kteří mohli být v infekčních pokusech použiti. Hlavním předpokladem bylo vyloučení nákazy vývojovými stadii motolic, proto plži z odchytů nepřipadali v úvahu z důvodu zdlouhavého vyšetřování. Proto byly sbírány snůšky vajec z jedné lokality a vylíhnutí se jedinci byli experimentálně infikováni. Počty plžů v pokusech byly proto omezené, což se negativně odrazilo na množství informací, které dané pokusy mohly poskytnout. Například nemohla být použita negativní kontrola, tudíž nemohla být sledována mortalita nestandardních mezihostitelů po nákaze *F. magna*. Jediným relevantním údajem, který byl výsledkem této části práce, bylo zjištění, zda je konkrétní druh možno nakazit daným parazitem.

Infekce motolicí *F. magna*

Výsledky nálezů *R. peregra* a *R. natalensis* byly negativní. Nicméně *R. natalensis* byl nakažen pouze v počtu 24 jedinců, tudíž na základě tohoto pokusu nelze jeho kompatibilitu s *F. magna* vyloučit. Podařilo se infikovat druhy *R. lagotis* a *R. labiata*. Pitvy však prokázaly malou úspěšnost nákazy - *R. lagotis* 1,4 % a *R. labiata* 1 %. Pozorovány byly jen málo vyvinuté redie se zárodky cercárií, což bylo patrně způsobeno krátkou dobou infekce - 44 dní u *R. lagotis* a 35 dní u *R. labiata*. Faltýnková a kol. (2006) pozorovali plně vyvinuté cercárie u *R. labiata* až po 119 dnech po nakažení a u *G. truncatula* již po 60 dnech. Druh *R. peregra* se nakazit nepodařilo, ačkoliv Erhardová-Kotrlá (1971) ve své práci tento druh úspěšně nakazila, avšak nejpokročilejší vývojové stadium, které pozorovala, byla mateřská redie. Z výše uvedeného je zřejmé, že ani jeden z plžů není pro *F. magna* vhodným mezihostitelem. Zatím

nebyla publikována práce, ve které by se podařilo dovést vývojový cyklus *F. magna* v plži rodu *Radix* do stadia schopného infikovat definitivního hostitele, což je podmínka pro potvrzení plžů rodu *Radix* jako mezihostitelů tohoto závažného patogena.

Infekce motolicí *T. regenti*

Infekční pokus, kdy byli nakažováni plži *R. peregra* motolicí *T. regenti*, měl pozitivní výsledek. Nakažení plži vylučovali po 32 dnech plně vyvinuté cercárie. Tento výsledek se shoduje s výsledkem Jouet a kol. (2008), kteří zaznamenali nákazu *R. peregra* motolicí *T. regenti* z volné přírody.

5. 3. Determinace dle molekulárních metod

Molekulárně fylogenetická analýza byla založena na sekvenci dvou genů, jaderného pro ITS2 a mitochondriálního pro 16S. Finálním výstupem bylo vytvoření dvou fylogenetických stromů. Stromy pro oba geny se shodovaly v rozdělení sledovaných plžů do 5 jasně oddělených skupin a označily *R. auricularia* jako nejodlišnější v rámci rodu. Tento výsledek je ve shodě s výsledky Bargesové a kol. 2001, Remigia 2002 a Huňové (2008). Ve stromě pro 16S je patrná větší vnitrodruhová variabilita druhů *R. labiata* a *R. auricularia*, což je způsobeno častějšími substitucemi v jednotlivých sekvencích. Strom pro ITS2 vykazuje větší vnitrodruhovou homogenitu. Stejný trend u obou genů popisuje i Puslednik (2006) u lymnaeidních plžů rodu *Austropeplea*, který má k plžům rodu *Radix* z fylogenetického hlediska velmi blízko. Nicméně mezi oběma stromy byly pozorovány i rozdíly.

- 1) Jednotlivé stromy se neshodovaly v interpretaci příbuzenských vztahů druhů *R. ampla*, *R. lagotis* a *R. peregra*. Analýza genu pro 16S označila za příbuznější *R. ampla* a *R. lagotis*, pro ITS2 byli označeny jako příbuznější *R. lagotis* a *R. peregra*. Srovnání s dostupnou literaturou je poměrně složité. V případě genu pro 16S nejsou dostupná data pro *R. ampla*. Výsledky analýzy genu pro ITS2 (Barges a kol. 2001) nedokážou vzájemnou příbuznost těchto tří druhů rozlišit. Jakési vodítko při řešení tohoto problému nám může poskytnout práce Correai a kol. (2010), kteří označili za příbuznější druhy *R. ampla* a *R. lagotis*, a to dle kombinovaného stromu sestaveného na základě sekvencí 16S, ITS1 a ITS2. Nicméně pro tři námi analyzované druhy (*R. ampla*, *R. lagotis* a *R. peregra*) měl sekvence všech tří genů pouze pro *R. peregra*.

2) Phylogenetické stromy se neshodovaly v zařazení 4 jedinců do druhu. Plži s označením 51.2, 51.3, 53.2 a 53.3 byli dle sekvencí ITS2 určeni jako *R. peregra*. Dle 16S byli jedinci 51.2 a 51.3 určeni jako *R. auricularia* a jedinci 53.2 a 53.3 jako *R. lagotis*. Tato situace je v molekulární fylogenetice nestandardní, nicméně výsledek byl potvrzen opakovanou sekvenací, tudíž je záměna vzorků vyloučena. Pro tuto situaci se hledá vysvětlení jen velmi obtížně. Důvodem by mohlo být křížení druhů *R. peregra* s *R. lagotis*, případně s *R. auricularia*. Pokud by potomci získali mitochondriální gen pro 16S (dědí se jen po mateřské linii) od jednoho předka a jaderný gen pro ITS2 od druhého, byla by tato situace vysvětlena. Tento fakt by vysvětloval také nelogické přiřazení názvu *R. auricularia* k sekvencím 16S uloženým v NCBI (Remigio 2002), které dle ITS2 náleží *R. lagotis*. Ačkoliv si jsou některé druhy rodu *Radix* tvarem ulity velmi podobné, záměna *R. auricularia* s *R. lagotis* je nepravděpodobná. Ovšem v případě, že by Remigio pracoval s plži, jako byl v našem případě jedinec s označením 53.3 (viz příloha 8. 6), bylo by označení tohoto jedince jako *R. auricularia* pochopitelné. Nicméně je nutné podotknout, že jedinci, pro které se neshodovalo zařazení ve fylogenetických stromech nepocházejí z ČR.

Rozdílné výsledky obou stromů naznačují, že fylogenetická analýza by měla být založena na datech získaných z více genů a ideálně kombinovat geny jaderné a mitochondriální DNA.

5. 4. Determinace dle morfologie pohlavní soustavy

Při determinaci dle morfologie pohlavní soustavy byly vybrány tyto znaky: tvar a uložení kopulační burzy, délka a tloušťka ductu kopulační burzy. Značná variabilita byla pozorována ve tvaru kopulační burzy.

R. labiata – Kopulační burza byla podlouhlá nebo téměř pravidelně kulovitá, uložená v pravé části plášťové dutiny. Tvarová variabilita kopulační burzy je patrně způsobena fází reprodukčního cyklu plže, ve které byl jedinec pitván (Dr. L. Juříčková, ústní sdělení). Variabilita byla pozorována i u ductu kopulační burzy *R. labiata*. Byly nalezeny 2 odlišné varianty:

- 1) Duktus tenčí, zřetelně oddělující kopulační burzu od vaginy. Popis se shoduje s popisem pro *R. labiata* (Glöer 2002), také se ale shoduje s popisem pro *R. peregra* (Hubendick 1951), nicméně toto srovnání nemá velkou vypovídací hodnotu, jelikož autor pod označením *R. peregra* uvádí tvarové formy *lagotis*, *peregra*, *ampla* a *ovata*, (dle molekulární analýzy provedené v této práci se s nejvyšší pravděpodobností jednalo o samostatné druhy). U těchto forem sice popisuje určitou variabilitu anatomických

znaků, nicméně přesně neuvádí (s výjimkou formy *ampla*), k jaké formě náleží které anatomické znaky.

2) Duktus krátký a silný, splývá s kopulační burzou v jeden útvar. Popis se shoduje s popisem pro *R. labiata* (Huňová 2008, Jackiewicz 2000²), a pro *R. peregra* (Hubendick 1951), stejná situace viz výše. Dále se shoduje s popisem pro *R. balthica* (Glöer 2002)

Z výše uvedeného vyplývá, že ve většině případů se výsledky pitev této práce shodují s výsledky uváděnými v literatuře, uvážíme-li, že *R. peregra* (Hubendick 1951) mohl být *R. labiata*. Výjimku tvoří výsledky Glöera (2002), který pro každou variantu popsanou v této diplomové práci uvádí jiný druh. Může to být způsobeno tím, že ve skutečnosti pracoval s plži jednoho druhu, ale z důvodu variability jim přiřadil různé názvy (*R. labiata* a *R. balthica*). Druhá možnost je, že Glöer (2002) skutečně analyzoval odlišné druhy, které mají shodné anatomické znaky jako druh *R. labiata* analyzovaný v této práci, a tudíž by nebylo možné druhy *R. balthica* a *R. labiata* dle morfologie pohlavní soustavy od sebe rozlišit.

R. lagotis – Kopulační burza byla oválná, uložená ve střední části plášťové dutiny a její duktus byl tenký a dlouhý. Tento popis se shoduje s popisem pro *R. lagotis** a *R. peregra** (Hubendick 1951), nicméně tentýž autor uvádí pro *R. lagotis** z jiné lokality duktus krátký a tlustý. Srovnání s výsledky Hubendicka (1951) je tedy kontroverzní, jelikož jedinci (označení hvězdičkou) u kterých byla Hubendickem popsána morfologie pohlavní soustavy, pocházeli z muzejních sbírek a názvy k těmto plžům přiřadili neznámí autoři. S přihlédnutím na fakt, že jedinci pocházeli z různých lokalit Asie a Evropy, je pravděpodobné, že se ve skutečnosti jednalo o odlišné druhy. Morfologie znaků pohlavní soustavy *R. lagotis* je dobře porovnatelná s výsledky Huňové (2008). Jedinci analyzovaní v rámci této práce pocházeli ze stejné populace jako jedinci analyzovaní Huňovou (chovy PřF UK) a měli shodnou sekvenci genu pro ITS2. Zatímco Huňová uvádí duktus kopulační burzy relativně krátký a silný, v této práci byl pozorován duktus dlouhý a tenký. Vysvětlení může být i to, že *R. lagotis* vykazuje podobnou variabilitu jako *R. labiata* (viz výše). Sledovaný znak se v rámci této práce podařilo

² V originále používá Jackiewicz (2000) označení *R. peregra*, nicméně v tomto případě se jedná o synonymum pro *R. labiata*

nalézt jen u jednoho jedince, tudíž případná variabilita nemohla být zaznamenána. Také se mohlo jednat o defektního jedince

R. peregra – Kopulační burza byla kulovitá, uložena v pravé části plášťové dutiny, s delším tenkým duktem. Tento popis odpovídá popisu *R. lagotis** a *R. peregra** (Hubendick 1951). I v případě těchto plžů (označení hvězdičkou) se jednalo o jedince z muzejních sbírek a platí stejná situace, viz výše. Huňová (2008) ve své práci popisuje stejné znaky pohlavní soustavy pro *R. peregra*, navíc uvádí i sekvenci genu pro ITS2, která se shoduje se sekvencemi plžů analyzovaných v této práci.

R. ampla – Kopulační burza byla kulovitá, uložena v pravé části plášťové dutiny, s krátkým silným duktem. Tento popis se shoduje s popisem pro *R. ovata** (muzejní sbírky, viz výše) a *R. peregra* forma *ampla* (Hubendick 1951). Jediný dostupný popis pohlavní soustavy *R. ampla* jako samostatného druhu (Vinarski a kol. 2009) se neshoduje s popisem *R. ampla* v této práci pouze tvarem kopulační burzy. V této práci byla pozorována kulovitá kopulační burza, Vinarski (2009) uvádí kopulační burzu značně protáhlou. Tvar kopulační burzy však může být variabilní i v rámci jednoho druhu (viz výše).

R. auricularia – kopulační burza kulovitá, uložená v levé části plášťové dutiny, s velmi dlouhým a tenkým duktem. Tento popis se shoduje s popisem pro *R. auricularia* (Hubendick 1951, Jackiewicz 2000, Glöer 2002 a Huňová 2008).

Analýza morfologie pohlavní soustavy dokázala odlišit všechny druhy (*R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* a *R. ampla*) sledované v rámci této práce. Nicméně u druhů *R. lagotis*, *R. peregra* a *R. ampla* byly výsledky založeny pouze na sledování malého počtu jedinců, tudíž mohla být přehlédnuta vnitrodruhová variabilita sledovaných znaků. Jak z výsledků této práce, tak z dostupné literatury (Hubendick 1951, Jackiewicz 2000, Glöer 2002 a Huňová 2008) vyplývá, že nejlépe odlišitelný druh v rámci rodu *Radix* je *R. auricularia*. Všichni autoři, kteří se zabývali determinací plžů rodu *Radix*, dle morfologie pohlavních orgánů, se v popisu kopulační burzy a jejího duktů shodují.

5. 5. Determinace dle morfometrie ulity

Pro určení plžů rodu *Radix* dle morfometrie ulity bylo vybráno 11 poměrných hodnot (viz kapitola 3. 3) měřených z fotografií pomocí softwaru. Předpokladem bylo, aby ulity při pořizování snímků byly vždy ve stejné pozici. Za tímto účelem byla sestrojena

„standardizační komůrka“, která zaručila vždy stejnou polohu ulity při fotografování³. Pomocí statistické analýzy byly pro každý druh získány koeficienty, s jejichž pomocí byl sestaven determinační vzorec. Po dosazení sledovaných parametrů libovolného plže, který byl předem určen molekulárními metodami, byl plž zařazen do odpovídajícího taxonu s průměrnou pravděpodobností 99%. Správné zařazení dle morfologie ulity se podařilo i u plžů, kteří na první pohled byli zcela odlišní (viz příloha 8. 6). Nicméně díky nízkým počtům proměřených ulit u druhů *R. ampla*, *R. lagotis* a *R. peregra* nemusela být zachycena vnitrodruhová variabilita, proto by bylo vhodné celé hodnocení zopakovat se statisticky významným počtem plžů výše zmíněných druhů.

V dostupné literatuře nalezneme pouze 2 práce, ve kterých autoři uvádějí přesné hodnoty parametrů ulity. Hubendick (1951) sledoval variabilitu tvaru ulity u druhu *R. peregra*. V rámci tohoto druhu uvádí 4 tvarové formy: *peregra* (pravděpodobně *R. labiata* sensu Bargues a kol. 2001), *lagotis*, *ovata* (pravděpodobně *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001) a *ampla*. U jednotlivých forem sleduje 2 poměrové parametry: šířka ulity/výška ulity a výška ústí/výška ulity. Dle jeho výsledků není zřejmé, které formy od sebe lze odlišit a které ne. V grafickém znázornění překryvů jednotlivých forem uvádí pouze lokalitu, odkud sledovaní jedinci pochází, nikoliv do jaké formy náleží. Huňová (2008) sledovala 3 poměrové parametry: výška ulity/výška ústí, výška ulity/šířka ústí a šířka ulity/šířka ústí u druhů *R. auricularia*, *R. lagotis*, *R. labiata* a *R. peregra*. Ve své práci uvádí, že není možné rozeznat *R. peregra* a *R. auricularia* dle poměrů výška ulity/výška ústí, výška ulity/šířka ulity a šířka ulity/šířka ústí. Dále nelze rozeznat *R. labiata* a *R. lagotis* dle poměrů výška ulity/šířka ulity a šířka ulity/šířka ústí. Výsledky této diplomové práce se shodují s tvrzením obou autorů, tedy uvedené znaky (výška ulity/výška ústí, výška ulity/šířka ústí a šířka ulity/šířka ústí) nejsou dostačující pro spolehlivé rozlišení jednotlivých druhů plžů rodu *Radix* (viz jednotlivé grafy poměrů v kapitole 4. 3. 3. 1.). Morfometrickou analýzu je tedy nutné založit na větším počtu znaků.

Pokud bychom pro determinaci plžů sledovaných v této práci dle morfometrie ulity aplikovali postupy, které uvádějí klasické určovací klíče (Uličný 1892, Ložek 1951, Glöer 2002), zjistili bychom, že pomocí těchto postupů není možné plže rodu *Radix* jednoznačně určit. Tyto klíče jsou použitelné pouze pro jedince, kteří jsou „standardem“ v rámci druhu, a i tak správné

³ Při pořízení snímků stejné ulity v průběhu několika měsíců se parametry lišili v řádu mikrometrů

zařazení vyžaduje velkou dávku zkušeností. Jakékoli tvarové odchylky sledovaných jedinců nejsou schopny tyto klíče pokrýt a výsledkem může být často nesprávné určení plže. Příkladem jsou někteří zástupci druhu *R. peregra* (lokalita 48 a 53), kteří dle určovacího klíče (Ložek 1951) byli určeni jako *R. auricularia* nebo *R. ampla*. Dalším příkladem je chybné určení *R. lagotis* (lokalita 32 a 56), kteří byli dle určovacího klíče (Ložek 1951) určeni jako *R. labiata*.

Jak se zdá, navržená metoda determinace dle uvedených 11 znaků (viz kapitola 3. 3) by mohla být v praxi použitelná, nicméně je časově náročnější a vyžaduje speciální software. Je ale nutné podotknout, že byla zatím testována pouze na omezeném vzorku plžů a zůstává proto otázkou, zda by byla použitelná i pro jiné spektrum plžů; další výzkum a ověření této metody je proto žádoucí.

Závěrem tedy je, že molekulárně fylogenetická analýza se zdá jako nejspolehlivější metoda determinace plžů rodu *Radix*, nicméně je důležité, aby byla dávana do souvislosti s ostatními přístupy.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zmapovat druhové složení plžů rodu *Radix* na území ČR, srovnat různé přístupy k determinaci, a to dle molekulárních metod a hodnocením morfologie ulity a pohlavní soustavy. Uvedené srovnání mělo napomoci definovat nové morfometrické znaky, dle kterých by bylo možné rozlišit jednotlivé druhy. Dalším úkolem bylo zjistit mezihostitelskou specifitu identifikovaných plžů rodu *Radix*, a to pro infekce motolicemi *Fascioloides magna* a *Trichobilharzia regenti*.

V rámci diplomové práce se podařilo:

1. Vypracovat fylogenetickou analýzu zejména českých zástupců rodu *Radix* pomocí sekvencí genů pro ITS2 a 16S a potvrdit výskyt 4 druhů rodu *Radix* na území ČR (*R. auricularia*, *R. lagotis*, *R. labiata* a *R. peregra*). Identifikovány byly kompletní sekvence genů ITS2 a 16S pro druhy *R.auricularia*, *R. lagotis*, *R. labiata* *R. peregra* a *R. ampla*
2. Zdokumentovat samičí část pohlavní soustavy (kopulační burza a její duktus) u plžů *R.auricularia*, *R. lagotis*, *R. labiata*, *R. peregra* a *R. ampla*, určených dle molekulárních metod. Pořídít fotografie všech výše uvedených druhů, pomocí nové metody a nalézt 11 konchologických znaků, využitelných pro odlišení zmíněných druhů.
3. Potvrdit nákazu *R. labiata* motolicí *F. magna* ve volné přírodě a experimentálně nakazit touto motolicí *R. labiata* a *R. lagotis* a potvrdit tak možnost přenosu motolice *F. magna* těmito plži. Potvrdit přenos *T. regenti* druhem *R. peregra*.

Ačkoliv se taxonomickou situací plžů rodu *Radix* v minulosti zabývalo mnoho autorů, stále ještě není zcela přehledná. Na poli taxonomie rodu *Radix* se střetává mnoho názorů a přístupů. Použití molekulárních metod k druhové determinaci se jeví jako velmi vhodný vhodný a spolehlivé kritérium, nicméně je třeba ho brát jen jako součást komplexního přístupu k determinaci a dávat ho do souvislostí s ostatními přístupy. V rámci této práce byla navržena nová metoda determinace dle konchologických znaků. Pokud by se potvrdila její použitelnost pro běžnou praxi, mohla by být široce využívána v malakologii. Výsledky této práce poukazují na možnost přenosu motolice *F. magna* některými plži rodu *Radix*, avšak možnost dokončení jejich vývoje v plžích do stadia cercárií by ještě měla být ověřena dalšími experimenty.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Almeyda – Artigas R. J., Bargues M. D., Mas – Coma S. (2000): ITS – 2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 86, 537 – 544.

Bargues M. D., Vigo M., Horák P., Dvořák J., Patzner R. A., Pointier J. P., Jackiewicz M., Meier–Brook C., Mas–Coma S. (2001): European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate host of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 1, 85–107.

Beer S.A. & Voronin M.V. (2007) Cercariases in Urban Ecosystems. *Nauka*, Moscow.

Beran L. (2002): Vodní měkkýši ČR – rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam. Sborník přírodovědného klubu v Uherském Hradišti, Supplementum 10.

Caron Y., Lasri S., Losson B., (2007): *Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium *Veterinary Parasitology*, 149:95–103

Chanová M., Vuong S. & Horák P. (2007): *Trichobilharzia szidati*: the lung phase of migration within avian and mammalian hosts. *Parasitology Research*, 100, 1243-1247.

Correa A. C., Escobar J. S., Durand P., Renaud F., David P., Jarne P., Pointier J.-P., Hurtrez-Boussès S. (2010): Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology* 2010 10:381.

Daszak P., Cunningham A., Hyatt A. D., (2000): Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-447.

Dvorak J., Vanacova S., Hampl V., a kol. (2002): Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology* 124, 307 – 313.

Erhardová-Kotrlá B. (1971): The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Prague; Academia.

Esteban J.-G., Flores A., Angles R., Mas-Coma S., (1999): High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia,. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93:155-156

Faltýnková A., Horácková E., Hirtová L., Novobilský A., Modrý D., Scholz T. (2006): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitol.* 51, 87-90.

Feldmeyer B., Hoffmeier K., Pfenninger M. (2010): The complete mitochondrial genome of *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora), obtained by low coverage shot gun next generation sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57, 1329–1333

Genicot B., Mouligneau F., Lekeux P., (1991): Economic and Production Consequences of Liver Fluke Disease in Double-Muscled Fattening Cattle. *Journal of Veterinary Medicine*, 38, 203-208

Glöer P. (2002): Die Süßwassergastropoden Nord-und Mitteleuropas. 2. neubearbeitete Auflage, *Conchbooks*.

Hall T. A (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95 – 98.

Holická M., (2009): Ptčí schistosomy v plžích a volně žijících ptácích v Evropě. Diplomová práce, PřF UK Praha

Horák P., Kolářová L., Dvořák J. (1998): *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5, 349 – 357.

Horák P., Kolářová L., Adema C. M. (2002): Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology* 52, 155–233.

Horák P., Mikeš L., Rudolfová J., Kolářová L. (2008): Penetration of *Trichobilharzia* cercariae into mammals: dangerous or negligible event? *Parasite*, 15, 299-303

Horák P., Kolářová L., (2011): Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology* 56, 779–790.

Hrádková K., Horák P. (2002): Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology* 76, 137-142.

Hubendick, B. (1951): Recent Lymnaeidae: their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *Kungliga Svenska Vetenskaps Akademiens Handlingar*, 3: 1 - 233

Huňová K. (2008): Taxonomické problémy studia plžů rodu *radix* (čeleď Lymnaeidae), mezihostitelů ptačích motolic. *Diplomová práce*, PřF UK Praha

Jackiewicz M. (2000): Blotniarki Europy (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae), Wydawnictwo Kontekst, Poznań.

Jouet, D., Ferte, H., Depaquit, J., Rudolfová, J., Latour, P., Zanella, D., Kaltenbach, M.L. & Leger, N. (2008) *Trichobilharzia* sp. in natural conditions in Annecy Lake, France. *Parasitology Research* 103, 51–58.

Jouet D., Skírnisson K., Kolářová L., Ferte H. (2010): Molecular diversity of *Trichobilharzia franki* in two intermediate hosts (*Radix auricularia* and *Radix peregra*): A complex of species. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 1218–1227

Kolářová L. (2007): Schistosomes causing cercarial dermatitis: a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity. *Folia parasitologica* 54: 81–87

Kruglov N. D., Staroborotov Y. I. (1993): Guide to recent molluscs of northern Eurasia. *Ruthenica* 3 (2), 161 – 180.

Lafferty KD (1993): Effects of parasitic castration on growth, reproduction and population dynamics of the marine snail *Cerithidea californica*. *Mar Ecol Prog Ser* 96:229–237

Laursen J.R., and Stromberg B.E., (1993). *Fascioloides magna* intermediate snail hosts: habitat preferences and infection parameters. *J. Parasitol.*, 79, 302.

Lockyer A.E., Olson,P.D., Ostergaard,P., Rollinson,D.,Johnston,D.A., Attwood,S.W., Southgate,V.R., Horak,P., Snyder,S.D., Le,T.H., Agatsuma,T., McManus,D.P., Carmichael,A.C., Naem,S. and Littlewood,D.T.J (2003) The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858 *Parasitology* 126 (PT 3), 203-224

Lotfy W. M., Brant S. V., DeJong R. J., Le T. H., Demiaszkiewicz A., Rajapakse R. P. V.

J., Perera V. B. V. P., Laursen J. R., Loker E. S. (2008): Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am. J. Trop. Med.Hyg.* 79, 248-255.

Loy C. & Haas W. (2001): Prevalence of cercariae from *Lymnaea stagnalis* snails in a pond system in Southern Germany. *Parasitology Research*, 87, 878–882.

Ložek V. (1956): Klíč československých měkkýšů. Vydavatel'stvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.

Mas-Coma, S., 2004. Human fascioliasis. In: Cotruvo J.A., Dufour A., Rees G., Bartram J., Carr R., Cliver D.O., Craun G.F., Fayer R., Gannon, V.P.J. (Eds.), World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. *IWA Publishing*, London, UK, 305–322.

Mas-Coma S., Valero MA., Bargues MD. (2009): Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in parasitology*, 69:41-146.

Našincová V. (1992): Vývojová stádia motolic v našich vodních plžích a vývojové cykly vybraných druhů čeledi Omphalometridae a Echinostomatidae. *Kandidátská dizertační práce*, Parazitologický ústav ČSAV České Budějovice.

Novobilský A. (2007): The giant liver fluke *Fascioloides magna* in the Czech republic: distribution, intermediate hosts, and immunodiagnosics. *Disertacní práce*. FVHE VFU Brno.

Podhorský M. (2006): Taxonomie a morfologie larválních stádií schistosom. *Diplomová práce*, PřF UK Praha.

Puslednik L. (2006): Systematics of the Australasian Lymnaeidae, *PhD Thesis*, School of Biological Sciences, University of Wollongong

Relf V., Good B., McCarthy E., de Waal T. (2009): Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family Succineidae in Ireland. *Veterinary Parasitology*, 163:152–155

Remigio E. A. (2002): Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon sampling. *Parasitology Research* 88, 687 – 696.

Rim H. J. (1994). Food-borne trematodes: ignored or emerging?
Parasitology today, 10: 207 - 209.

Rudolfová J., Sitko J., Horák P. (2006): Unusual finding of *Trichobilharzia* sp. in *Motacilla alba* in the Czech Republic. *Journal of Helminthology* 80, 83-85.

Rudolfová, J., Littlewood, D.T., Sitko, J. & Horák, P. (2007) Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland. *Folia Parasitologica* 54, 88–93.

Skírnisson K., Aldhoun J.A.&Kolářová L. (2009)A review on swimmers itch and the occurrence of bird schistosomes in Iceland. *Journal of Helminthology*, 83, 165–171.

Simon C., Franke A., & Martin A., (1991): The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: *Molecular techniques in taxonomy* (G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston & J.P.W. Young, eds) *Springer-Verlag*, 329-355

Simon–Martin F. a Simon-Vicente F. (1999): The life cycle of *Trichobilharzia salmanticensis* n. sp. (digenea: schistosomatidae), related to cases of human dermatitis. *Research and Reviews in Parasitology*, 59, 13-18

Sinitsin D.F., (1933): The life histories of some American liver flukes. *Z. Parasit*, 6, 170-191.

Uličný J. (1892): Měkkýši čeští. Přírodovědecký klub, Praha, , 208 pp.

Valdovinos C. & Balboa C. (2008) Cercarial dermatitis and lake eutrophication in South-Central Chile. *Epidemiology and Infection*, 136, 391–394.

Vignoles P., Dreyfuss G., Rondelaud D. (2002): Radial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *Journal of Helminthology*, 76, 269–272

Vinarski M.V.(2009): *Lymnaea ampla*(Hartmann,1821) (Gastropoda:Pulmonata: Lymnaeidae) in northern Asia. The Bulletin of the Russian Far East *Malacological Society*, 13, pp. 34–46

Vostrý M. (2010): Imunitní systém lymnaeidních plžů a jeho interakce s trichobilharziemi. *Diplomová práce*, PřF UK Praha

Ward P. I., Goater C. P., Mikos M. (1997): Shell variation in sympatric freshwater *Lymnaea peregra* and *L. ovata* (Gastropoda : Lymnaeidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 61, 139 – 149.

Wullschleger E. B., Wiehn J., Jokela J. (2002) Reproductive character displacement between the closely related freshwater snails *Lymnaea peregra* and *L. ovata*. *Evolutionary Ecology Research*, 4: 247–257

Pfenninger M., Cordellier M., Streit B. (2006): Comparing the efficacy of morphologic and DNA – based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC Evolutionary Biology* 6 (100).

Swales W. E. (1935): The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) the large liver fluke of ruminants, in Canada. With observation on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioloides magna* and control measures. *Can. J. Res.* 12,177-215.

Swofford D. L. (1998): PAUP* . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Strong E. E., Gargominy O., Ponder W. F., Bouchet P., 2008: Global diversity of gastropods (Gastropoda: Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 149-166.

Zmuda K., Chroust K., (2001): Motoličnatost skotu v okrese Frýdek-Místek. *Veterinářství*, 51,181-183.77

8. PŘÍLOHY

Příloha 8.1.: Hodnoty jednotlivých parametrů ulity plžů rodu *Radix* použitých pro jejich druhové zařazení

SUS/SUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,800	0,010	0,79	0,80	0,80	0,81	0,81
<i>R. auricularia</i>	22	0,688	0,039	0,61	0,67	0,70	0,71	0,76
<i>R. labiata</i>	20	0,478	0,027	0,43	0,46	0,48	0,50	0,52
<i>R. lagotis</i>	3	0,587	0,023	0,56	0,58	0,60	0,60	0,60
<i>R. peregra</i>	6	0,622	0,061	0,56	0,58	0,61	0,64	0,73

VZAV/VUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,137	0,042	0,09	0,12	0,15	0,16	0,17
<i>R. auricularia</i>	22	0,240	0,031	0,16	0,22	0,24	0,26	0,29
<i>R. labiata</i>	20	0,390	0,032	0,34	0,37	0,39	0,41	0,47
<i>R. lagotis</i>	3	0,350	0,026	0,32	0,34	0,36	0,37	0,37
<i>R. peregra</i>	6	0,260	0,046	0,18	0,25	0,27	0,29	0,31

OUS/OUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,873	0,006	0,87	0,87	0,87	0,88	0,88
<i>R. auricularia</i>	22	0,795	0,025	0,74	0,78	0,80	0,81	0,85
<i>R. labiata</i>	20	0,644	0,027	0,58	0,63	0,65	0,66	0,69
<i>R. lagotis</i>	3	0,697	0,015	0,68	0,69	0,70	0,71	0,71
<i>R. peregra</i>	6	0,773	0,038	0,74	0,75	0,77	0,79	0,84

SSEVI/ŠUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,123	0,029	0,09	0,12	0,14	0,14	0,14
<i>R. auricularia</i>	22	0,186	0,033	0,10	0,17	0,18	0,20	0,25
<i>R. labiata</i>	20	0,381	0,027	0,33	0,37	0,38	0,40	0,44
<i>R. lagotis</i>	3	0,310	0,010	0,30	0,31	0,31	0,32	0,32
<i>R. peregra</i>	6	0,242	0,072	0,16	0,19	0,23	0,28	0,35

ŠUS/VUS

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,890	0,010	0,88	0,89	0,89	0,90	0,90
<i>R. auricularia</i>	22	0,739	0,048	0,66	0,70	0,75	0,77	0,83
<i>R. labiata</i>	20	0,716	0,039	0,62	0,70	0,72	0,75	0,78
<i>R. lagotis</i>	3	0,730	0,066	0,66	0,70	0,74	0,77	0,79
<i>R. peregra</i>	6	0,763	0,059	0,70	0,73	0,74	0,80	0,85

VVRCH/ŠZAV

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,533	0,006	0,53	0,53	0,53	0,54	0,54
<i>R. auricularia</i>	22	0,704	0,082	0,51	0,64	0,71	0,76	0,88
<i>R. labiata</i>	20	0,765	0,064	0,66	0,72	0,77	0,80	0,93

<i>R. lagotis</i>	3	0,750	0,100	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85
<i>R. peregra</i>	6	0,613	0,058	0,55	0,58	0,61	0,64	0,71

VVRCH/VZAV

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,433	0,046	0,38	0,42	0,46	0,46	0,46
<i>R. auricularia</i>	22	0,375	0,047	0,27	0,36	0,38	0,41	0,50
<i>R. labiata</i>	20	0,442	0,027	0,40	0,42	0,45	0,46	0,49
<i>R. lagotis</i>	3	0,403	0,075	0,33	0,37	0,40	0,44	0,48
<i>R. peregra</i>	6	0,392	0,047	0,34	0,36	0,38	0,43	0,45

ŠUS/VUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,793	0,006	0,79	0,79	0,79	0,80	0,80
<i>R. auricularia</i>	22	0,569	0,050	0,46	0,54	0,58	0,60	0,67
<i>R. labiata</i>	20	0,429	0,025	0,38	0,42	0,43	0,44	0,47
<i>R. lagotis</i>	3	0,463	0,029	0,43	0,46	0,48	0,48	0,48
<i>R. peregra</i>	6	0,575	0,085	0,50	0,53	0,55	0,60	0,73

VUS/VUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,890	0,010	0,88	0,89	0,89	0,90	0,90
<i>R. auricularia</i>	22	0,769	0,032	0,71	0,75	0,77	0,78	0,86
<i>R. labiata</i>	20	0,600	0,033	0,53	0,59	0,61	0,62	0,65
<i>R. lagotis</i>	3	0,637	0,023	0,61	0,63	0,65	0,65	0,65
<i>R. peregra</i>	6	0,750	0,056	0,71	0,72	0,74	0,74	0,86

ŠUS/ŠUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,930	0,026	0,91	0,92	0,92	0,94	0,96
<i>R. auricularia</i>	22	0,815	0,043	0,70	0,79	0,82	0,83	0,91
<i>R. labiata</i>	20	0,725	0,030	0,66	0,70	0,72	0,75	0,77
<i>R. lagotis</i>	3	0,767	0,012	0,76	0,76	0,76	0,77	0,78
<i>R. peregra</i>	6	0,810	0,037	0,76	0,79	0,81	0,84	0,86

ŠUL/VUL

Druh plže	Počet měřených plžů	Průměr hodnot pměrů	Směrodatná odchylka	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
<i>R. ampla</i>	3	0,850	0,020	0,83	0,84	0,85	0,86	0,87
<i>R. auricularia</i>	22	0,698	0,059	0,58	0,67	0,71	0,73	0,81
<i>R. labiata</i>	20	0,592	0,027	0,53	0,58	0,60	0,61	0,64
<i>R. lagotis</i>	3	0,607	0,032	0,57	0,60	0,62	0,63	0,63
<i>R. peregra</i>	6	0,712	0,088	0,62	0,66	0,71	0,72	0,87

Vysvětlivky: VUL – výška ulity, ŠUL – šířka ulity, VUS – výška ústí, ŠUS – šířka ústí, ŠŠEV1 – šířka 2. švu, VVRCH – vzdálenost od vrcholu k 3. švu, VZÁV – vzdálenost od vrcholu k 4. švu, SUL – plocha obrysu ulity, OUL – obvod obrysu ulity, SUS – plocha ústí, OUS – obvod ústí

Příloha 8.2.: Příklad zařazení plže dle klasifikačních koeficientů

Jako příklad použití klasifikačních proměnných budiž zařazení plže s označením 12.2. Nejprve je třeba získat poměry jednotlivých hodnot rozměrů ulity (viz kapitola 3. 3), ty jsou znázorněny v Tab. 8. 2. Dále je třeba znát hodnoty jednotlivých koeficientů potřebných pro vypočítání klasifikační proměnné, které byly pro jednotlivé druhy stanovené statistickou analýzou a jsou pevně dané (viz Tab. 8. 1). Předpis pro výpočet klasifikační proměnné pro *R. ampla* zní: $\text{Klasp} = -14211,27 - 2219,53 \cdot \text{SUS/SUL} + 2336,43 \cdot \text{VZAV/VUL} + 1190,97 \cdot \text{OUS/OUL} + 1055,74 \cdot \text{SSEVI/ŠUL} + 16706,19 \cdot \text{ŠUS/VUS} + 1236,52 \cdot \text{VVRCH/SZAV} - 176,08 \cdot \text{VVRCH/VZAV} - 37804,26 \cdot \text{ŠUS/VUL} + 23894,65 \cdot \text{VUS/VUL} + 11969,96 \cdot \text{ŠUS/ŠUL} + 12764,61 \cdot \text{ŠUL/VUL}$. Do tohoto vzorce dosadíme jednotlivé hodnoty parametrů testovaného plže. Výsledná hodnota klasifikační proměnné pro *R. ampla* je tedy **14137,99**. Stejným způsobem vypočítáme klasifikační proměnné pro další druhy, ty jsou následující: *R. auricularia* = **14154,74**, *R. labiata* = **14174,23**, *R. lagotis* = **14170,45**, *R. peregra* = **14167,57**. Testovaný plž je zařazen do druhu, jehož klasifikační proměnná nabývá nevyšší hodnoty. Námí testovaný plž tedy patří do druhu *R. labiata*.

Tab.8. 1: Koeficienty pro výpočet Klasp pro jednotlivé druhy plžů rodu *Radix*

	<i>R.ampla</i>	<i>R.auricularia</i>	<i>R.labiata</i>	<i>R.lagotis</i>	<i>R.peregra</i>
constant	-14211,27	-14666,78	-14050,51	-14171,98	-14620,55
SUS/SUL	-2219,53	-2180,73	-2249,49	-2089,78	-2291,66
VZAV/VUL	2336,43	2202,82	2079,57	2193,14	2214,63
OUS/OUL	1190,97	1373,69	1175,04	1340,69	1307,36
SSEVI/ŠUL	1055,74	1167,95	1347,43	1226,91	1194,26
ŠUS/VUS	16706,19	17045,40	16522,80	16591,31	16868,45
VVRCH/SZAV	1236,52	1343,71	1310,17	1291,23	1298,93
VVRCH/VZAV	-176,08	-363,80	-322,33	-316,73	-287,56
ŠUS/VUL	-37804,26	-38754,60	-37909,55	-38130,12	-38664,67
VUS/VUL	23894,65	24177,61	23484,05	23451,15	24002,25
ŠUS/ŠUL	11969,96	12158,61	12109,20	12117,05	12330,21
ŠUL/VUL	12764,61	13104,93	13156,95	13157,70	13311,07

Tab.8. 2: Naměřené hodnoty jednotlivých peremetrů plže s označením 12.2

Označení poměrů	SUS/SUL	VZAV/VUL	OUS/OUL	SSEVI/ŠUL	ŠUS/VUS	VVRCH/SZAV	VVRCH/VZAV	ŠUS/VUL	VUS/VUL	ŠUS/ŠUL	ŠUL/VUL
Hodnoty poměrů	0,52	0,37	0,67	0,33	0,68	0,71	0,41	0,45	0,65	0,70	0,64

Příloha 8.3.: Pravděpodobnosti zařazení jednotlivých plžů do druhů pomocí klasifikačních proměnných

Druh plže	Označení plže	<i>R.ampla</i>	<i>R.auricularia</i>	<i>R.labiata</i>	<i>R.lagotis</i>	<i>R.peregra</i>
-----------	---------------	----------------	----------------------	------------------	------------------	------------------

<i>R. labiata</i>	20.2	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	2.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	1.4	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	24.3	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	12.2	0,000	0,000	0,999	0,001	0,000
<i>R. labiata</i>	29.2	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	40.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	14.2	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	54.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	13.5	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	55	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	42.3	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	19.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	46.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	21.3	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	34.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	23.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	17.2	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	38.1	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. labiata</i>	35.2	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>R. lagotis</i>	32.2	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
<i>R. lagotis</i>	56.1	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
<i>R. lagotis</i>	ch1	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
<i>R. ampla</i>	52.2	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. ampla</i>	52.3	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. ampla</i>	52.1	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	7.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	41.1	0,000	0,994	0,000	0,000	0,006
<i>R. auricularia</i>	9.4	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	3.1	0,000	0,999	0,000	0,000	0,001
<i>R. auricularia</i>	44.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	6.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	57	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	8.2	0,000	0,954	0,000	0,000	0,046
<i>R. auricularia</i>	39.1	0,000	0,978	0,000	0,000	0,022
<i>R. auricularia</i>	30.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	10.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	22.2	0,000	0,999	0,000	0,000	0,001
<i>R. auricularia</i>	37.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	28.1	0,000	0,998	0,000	0,000	0,002
<i>R. auricularia</i>	53.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	45.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	4.3	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	43.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	47.1	0,000	0,999	0,000	0,000	0,001
<i>R. auricularia</i>	36.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	49.1	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. auricularia</i>	33.2	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
<i>R. peregra</i>	50.1	0,000	0,005	0,000	0,000	0,995
<i>R. peregra</i>	60.1	0,000	0,000	0,058	0,005	0,937
<i>R. peregra</i>	51.2	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
<i>R. peregra</i>	48.1	0,000	0,087	0,000	0,000	0,913
<i>R. peregra</i>	53.3	0,026	0,000	0,000	0,000	0,974
<i>R. peregra</i>	53.2	0,000	0,141	0,000	0,000	0,859

Vysvětlivky:

<i>R. labiata</i>	<i>R. lagotis</i>	<i>R. ampla</i>	<i>R. auricularia</i>	<i>R. peregra</i>	pravděpodobnost
-------------------	-------------------	-----------------	-----------------------	-------------------	-----------------

Příloha 8.4.: Hodnoty diskriminačních funkcí

	Diskriminační funkce			
Poměry hodnot	LD1	LD2	LD3	LD4
SUS/SUL	-6,58	-11,94	-44,28	-17,69
VZAV/VUL	-15,40	24,67	-5,45	-40,36
OUS/OUL	-20,86	-25,37	1,07	-34,30
SSEV1/ŠUL	24,31	-24,87	6,30	26,70
ŠUS/VUS	-63,46	-28,11	50,34	49,32
VVRCH/SZAV	-3,27	-15,90	3,80	22,66
VVRCH/VZAV	3,04	30,36	-0,66	-27,02
ŠUS/VUL	100,04	95,51	-157,45	44,01
VUS/VUL	-86,50	-7,96	89,23	94,52
ŠUS/ŠUL	-6,67	-16,71	75,08	-69,94
ŠUL/VUL	7,62	-42,28	82,88	-87,51

Vysvětlivky: VUL – výška ulity, ŠUL – šířka ulity, VUS – výška ústí, ŠUS – šířka ústí, ŠSEV1 – šířka 2. švu, VVRCH – vzdálenost od vrcholu k 3. švu, VZAV – vzdálenost od vrcholu k 4. švu, SUL – plocha obrysu ulity, OUL – obvod obrysu ulity, SUS – plocha ústí, OUS – obvod ústí

Příloha 8. 5 Výsledky měření morfometrických parametrů ulit

	označení plže	SUL	SUS/SUL	SUS	SVRCH	OVRCH	VZÁV/VUL	OUS	OUS/OUL	OUL	ŠŠEV1/ŠUL	ŠŠEV2	ŠSUS/VUS	ŠŠEV1	VZÁV	ŠUL	ŠUS	ŠSUS/VUL	VUS	VVRCH	VVRCH/VZÁV	VUL	VUS/VUL	ŠSUS/ŠUL	ŠUL/VULVUL
<i>R. labiata</i>	20.2a	32,40	0,45	14,71	2,48	6,65	0,41	14,26	0,63	22,80	0,44	1,11	0,73	2,39	3,70	5,48	3,86	0,42	5,27	1,65	0,45	9,11	0,58	0,70	0,60
	2.1	55,19	0,50	27,46	3,75	8,27	0,40	19,56	0,65	30,04	0,41	1,40	0,75	2,83	4,80	6,92	5,31	0,44	7,10	2,19	0,46	11,98	0,59	0,77	0,58
	1.4a	69,68	0,51	35,60	3,18	8,05	0,35	22,66	0,69	32,84	0,35	1,13	0,74	2,86	4,54	8,17	6,05	0,47	8,13	2,06	0,45	12,98	0,63	0,74	0,63
	24.3a	65,08	0,45	29,60	5,50	9,70	0,47	19,85	0,60	33,08	0,39	1,61	0,76	3,05	6,24	7,80	5,49	0,41	7,18	2,49	0,40	13,23	0,54	0,70	0,59
	12.2	86,35	0,52	44,65	1,88	5,83	0,37	24,97	0,67	36,99	0,33	1,48	0,68	3,06	5,32	9,23	6,47	0,45	9,46	2,17	0,41	14,47	0,65	0,70	0,64
	29.2	106,37	0,51	54,34	4,08	9,32	0,36	27,67	0,69	40,36	0,36	1,80	0,71	3,49	5,77	9,62	7,39	0,47	10,36	2,32	0,40	15,89	0,65	0,77	0,61
	40.1	123,24	0,44	53,86	7,33	12,31	0,39	28,30	0,64	44,20	0,39	2,13	0,70	4,23	6,98	10,80	7,47	0,42	10,72	3,44	0,49	17,69	0,61	0,69	0,61
	14.2	129,82	0,46	59,64	7,56	12,20	0,36	29,40	0,64	46,20	0,37	1,95	0,62	3,96	6,77	10,80	7,08	0,38	11,50	3,13	0,46	18,67	0,62	0,66	0,58
	54.1	134,60	0,45	60,08	9,82	13,39	0,42	29,91	0,62	48,26	0,41	2,19	0,71	4,41	7,83	10,78	7,94	0,42	11,14	3,51	0,45	18,77	0,59	0,74	0,57
	13.5	148,74	0,51	75,51	3,89	8,45	0,38	32,44	0,66	48,79	0,38	2,24	0,72	4,36	7,27	11,61	8,66	0,45	12,02	3,37	0,46	19,37	0,62	0,75	0,60
	55	154,78	0,47	72,48	6,76	11,92	0,34	32,46	0,66	49,45	0,37	2,04	0,71	4,29	6,78	11,55	8,68	0,44	12,17	2,96	0,44	19,85	0,61	0,75	0,58
	42.3	162,49	0,50	80,62	9,03	13,26	0,37	33,09	0,64	51,57	0,34	2,16	0,72	4,23	7,60	12,46	8,84	0,43	12,33	3,39	0,45	20,51	0,60	0,71	0,61
	19.1	184,47	0,46	84,68	9,59	14,14	0,39	35,38	0,65	54,18	0,38	2,30	0,68	4,95	8,54	13,14	9,12	0,42	13,33	3,70	0,43	21,65	0,62	0,69	0,61
	46.1	197,00	0,49	97,39	10,97	15,14	0,39	38,01	0,66	57,27	0,40	2,31	0,67	5,05	9,12	12,74	9,63	0,41	14,40	3,92	0,43	23,39	0,62	0,76	0,54
	21.3	210,40	0,48	100,67	13,88	16,27	0,41	36,86	0,62	59,64	0,36	2,49	0,75	5,10	9,87	14,11	10,05	0,42	13,42	4,12	0,42	23,85	0,56	0,71	0,59
	34.1	255,62	0,49	124,41	13,97	16,19	0,36	41,87	0,66	63,33	0,37	2,61	0,75	5,78	9,07	15,42	11,40	0,46	15,20	4,14	0,46	24,99	0,61	0,74	0,62
	23.1	246,18	0,46	113,27	18,85	18,72	0,42	39,32	0,62	63,75	0,40	2,91	0,78	6,00	10,60	15,16	10,97	0,43	14,13	5,04	0,48	25,33	0,56	0,72	0,60
	17.2	228,68	0,43	98,92	18,65	18,78	0,43	37,07	0,58	63,42	0,41	2,92	0,72	5,58	11,12	13,67	9,84	0,38	13,59	5,17	0,47	25,77	0,53	0,72	0,53
	38.1	357,41	0,48	171,68	19,96	19,41	0,37	49,70	0,65	76,13	0,38	2,89	0,66	6,64	11,55	17,49	12,58	0,41	19,05	4,81	0,42	30,83	0,62	0,72	0,57
	35.2	409,48	0,49	201,49	19,83	20,50	0,40	52,53	0,64	81,67	0,38	3,25	0,75	7,16	12,86	18,80	14,23	0,44	19,08	5,09	0,40	32,52	0,59	0,76	0,58
<i>R. lagotis</i>	32.2	27,89	0,60	16,82	1,64	5,33	0,32	15,44	0,71	21,77	0,32	0,73	0,66	1,60	2,83	4,93	3,77	0,43	5,68	1,36	0,48	8,72	0,65	0,76	0,57
	56.1	67,50	0,56	37,83	2,43	6,92	0,37	22,30	0,68	32,90	0,30	1,01	0,79	2,40	4,78	8,02	6,26	0,48	7,88	1,57	0,33	12,92	0,61	0,78	0,62
	ch1	181,37	0,60	108,58	8,27	12,73	0,36	38,30	0,70	54,58	0,31	1,90	0,74	4,17	7,86	13,58	10,32	0,48	14,03	3,12	0,40	21,58	0,65	0,76	0,63
<i>R. ampla</i>	52.2	392,83	0,81	319,80	0,82	4,26	0,09	65,12	0,88	73,62	0,09	0,36	0,89	1,93	2,21	20,55	19,81	0,80	22,17	1,02	0,46	24,74	0,90	0,96	0,83
	52.3	447,84	0,79	353,26	2,69	7,67	0,15	69,40	0,87	79,40	0,14	0,74	0,88	3,24	3,86	22,52	20,81	0,79	23,52	1,76	0,46	26,36	0,89	0,92	0,85
	52.1	573,51	0,80	456,47	3,83	9,10	0,17	79,00	0,87	90,95	0,14	1,21	0,90	3,67	5,12	26,14	23,76	0,79	26,52	1,95	0,38	30,00	0,88	0,91	0,87
<i>R. auricularia</i>	7.1a	25,44	0,62	15,87	0,65	3,42	0,29	15,15	0,74	20,38	0,25	0,57	0,66	1,17	2,36	4,71	3,80	0,46	5,80	0,91	0,38	8,19	0,71	0,81	0,58
	41.1a	40,11	0,69	27,80	0,68	3,67	0,21	19,94	0,80	24,95	0,24	0,69	0,70	1,41	2,10	5,94	5,26	0,52	7,48	0,84	0,40	10,11	0,74	0,89	0,59
	9.4a	46,16	0,70	32,21	0,62	3,39	0,23	21,30	0,80	26,51	0,18	0,33	0,72	1,22	2,37	6,79	5,71	0,56	7,95	0,76	0,32	10,20	0,78	0,84	0,67
	3.1a	70,27	0,71	49,73	1,12	4,56	0,22	26,74	0,81	32,84	0,20	0,57	0,78	1,64	2,73	8,27	7,54	0,61	9,67	1,02	0,37	12,28	0,79	0,91	0,67
	44.1	95,40	0,61	57,95	2,18	6,33	0,28	29,45	0,76	38,66	0,23	0,95	0,66	2,18	4,26	9,52	7,35	0,48	11,18	1,60	0,38	15,38	0,73	0,77	0,62
	6.1a	164,19	0,68	112,17	2,48	6,81	0,23	39,65	0,79	50,11	0,18	1,07	0,69	2,39	4,32	13,22	10,30	0,54	14,84	1,70	0,39	19,02	0,78	0,78	0,69
	57a	178,01	0,65	115,31	2,21	6,72	0,25	42,70	0,82	51,81	0,18	0,89	0,78	2,46	4,92	13,70	11,44	0,59	14,67	1,58	0,32	19,40	0,76	0,83	0,71
	8.2a	222,95	0,62	139,06	3,33	8,32	0,25	44,55	0,77	57,86	0,19	1,15	0,67	2,98	5,45	15,79	11,02	0,51	16,39	2,03	0,37	21,47	0,76	0,70	0,74
	39.1a	248,70	0,66	164,00	3,03	7,97	0,25	47,50	0,78	60,89	0,17	1,14	0,78	2,77	5,59	16,74	13,20	0,60	16,88	2,27	0,41	22,14	0,76	0,79	0,76
	30.1a	257,67	0,71	182,24	3,29	8,11	0,24	50,00	0,80	62,73	0,17	1,14	0,77	2,73	5,45	16,26	13,73	0,60	17,79	2,03	0,37	22,76	0,78	0,84	0,71
	10.1a	276,06	0,70	192,40	3,83	8,67	0,24	51,96	0,80	64,84	0,18	1,14	0,77	3,04	5,58	17,30	14,17	0,60	18,37	2,08	0,37	23,69	0,78	0,82	0,73
	22.2a	270,24	0,68	184,04	3,85	9,05	0,25	50,23	0,79	63,77	0,21	0,84	0,73	3,51	6,07	16,94	13,36	0,56	18,27	2,25	0,37	23,87	0,77	0,79	0,71
	37.1a	267,92	0,71	191,25	4,44	9,56	0,26	51,30	0,79	64,57	0,19	1,39	0,75	3,31	6,12	17,27	13,80	0,58	18,34	2,52	0,41	23,90	0,77	0,80	0,72
	28.1a	307,95	0,68	210,32	3,60	8,41	0,26	53,53	0,78	68,42	0,16	1,12	0,81	3,00	6,18	19,00	14,91	0,62	18,38	1,95	0,32	24,24	0,76	0,78	0,78
	53.1a	307,83	0,74	228,20	2,66	7,26	0,19	56,08	0,84	67,02	0,14	1,09	0,75	2,56	4,80	18,14	14,89	0,60	19,95	1,97	0,41	24,80	0,80	0,82	0,73
	45.1a	285,06	0,68	192,65	5,26	10,24	0,28	52,02	0,78	66,66	0,22	1,22	0,69	3,55	7,27	16,24	13,43	0,52	19,45	2,37	0,33	26,04	0,75	0,83	0,62
	4.3a	315,03	0,67	212,57	2,42	6,67	0,28	54,63	0,77	70,66	0,18	1,25	0,83	3,32	7,24	18,12	15,63	0,60	18,83	2,56	0,35	26,23	0,72	0,86	0,69
	43.1	349,20	0,72	252,21	8,24	12,69	0,24	58,71	0,79	74,64	0,20	1,84	0,74	3,91	6,88	19,23	15,67	0,55	21,18	3,45	0,50	28,45	0,74	0,81	0,68
	47.1a	439,29	0,70	308,57	4,51	9,74	0,22	65																	

	36.1	520,40	0,74	383,39	6,09	11,30	0,22	72,47	0,82	88,67	0,17	1,52	0,70	3,92	7,14	23,14	18,50	0,56	26,26	2,95	0,41	32,80	0,80	0,80	0,71
	49.1a	1600,89	0,76	1211,81	6,21	11,15	0,16	127,74	0,85	151,17	0,10	1,56	0,77	4,32	8,27	42,21	34,70	0,67	44,95	2,20	0,27	52,17	0,86	0,82	0,81
	33.2 a	1404,78	0,70	982,41	21,87	21,11	0,23	117,00	0,80	146,52	0,19	2,56	0,74	7,00	12,64	37,73	31,44	0,57	42,55	5,18	0,41	55,18	0,77	0,83	0,68
<i>R. peregra</i>	50.1	30,17	0,58	17,59	0,51	3,29	0,27	16,07	0,77	20,92	0,23	0,50	0,73	1,28	2,19	5,67	4,33	0,54	5,90	0,79	0,36	7,96	0,74	0,76	0,71
	60.1a	37,06	0,59	21,84	1,63	5,42	0,31	17,64	0,74	23,97	0,35	0,86	0,70	2,04	2,89	5,79	4,63	0,50	6,64	1,30	0,45	9,29	0,71	0,80	0,62
	51.2	49,19	0,56	27,59	1,60	5,64	0,29	20,07	0,74	27,15	0,30	0,76	0,73	2,04	3,00	6,73	5,48	0,52	7,48	1,12	0,37	10,52	0,71	0,82	0,64
	48.1	90,47	0,64	57,57	1,23	4,96	0,24	28,95	0,79	36,69	0,18	0,83	0,82	1,73	3,26	9,61	8,23	0,61	9,98	1,23	0,38	13,40	0,74	0,86	0,72
	53.3a	193,45	0,73	141,14	1,81	6,38	0,18	44,02	0,84	52,32	0,16	1,02	0,85	2,48	3,29	15,53	13,00	0,73	15,33	1,47	0,45	17,91	0,86	0,84	0,87
	53.2	332,52	0,63	208,22	5,61	11,21	0,27	53,57	0,76	70,33	0,23	1,36	0,75	4,26	7,05	18,83	14,62	0,55	19,60	2,43	0,34	26,50	0,74	0,78	0,71

R. labiata
R. lagotis
R. ampla
R. auricularia
R. peregra
 Vysvětlivky:

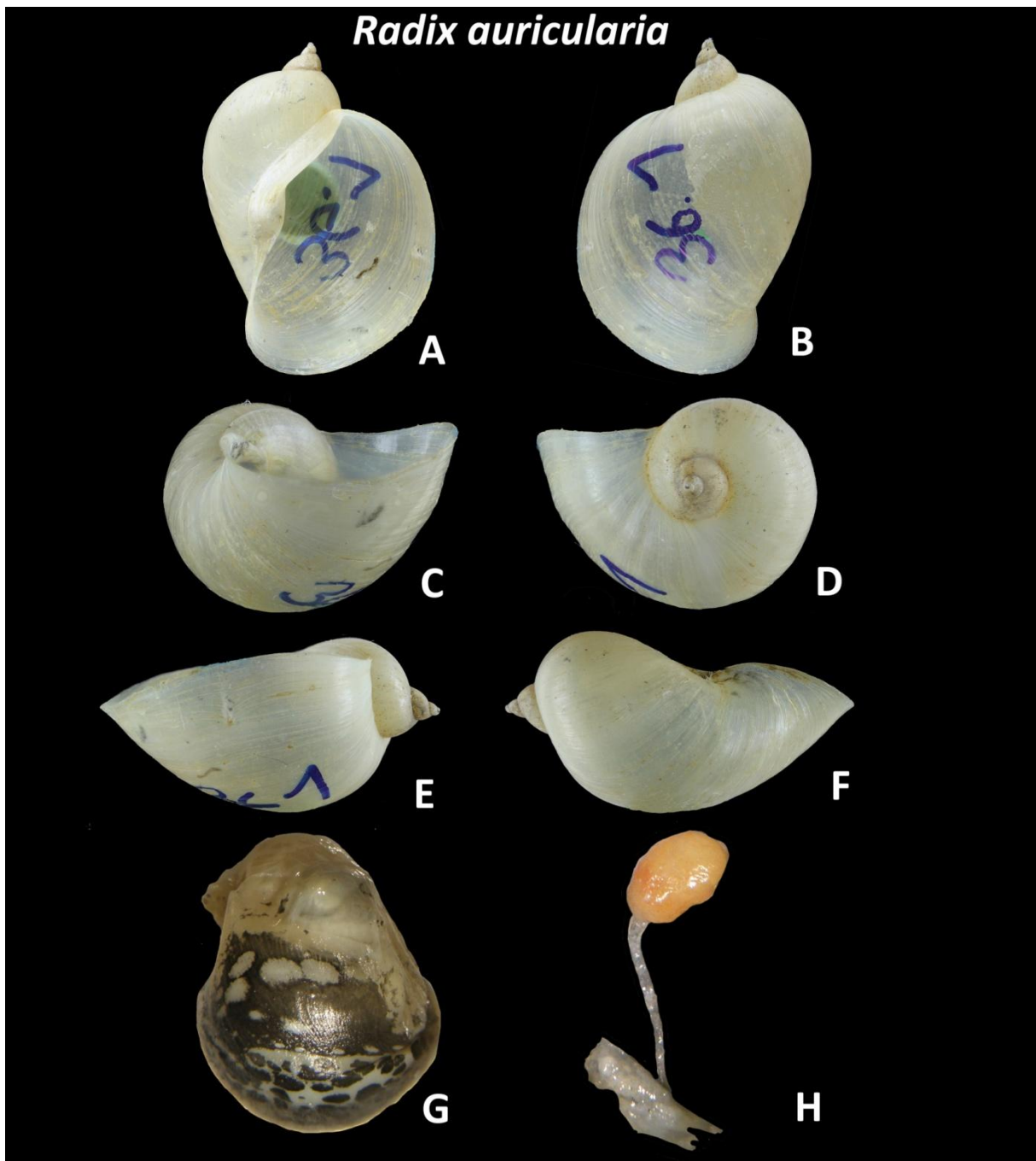
VUL – výška ulity, ŠUL – šířka ulity, VUS – výška ústí, ŠUS – šířka ústí, ŠŠEV1 – šířka 2. švu, ŠŠEV2 – šířka 3. švu, VVRCH – vzdálenost od vrcholu k 3. švu, VZÁV – vzdálenost od vrcholu k 4. švu, SUL – plocha obrysu ulity, OUL – obvod obrysu ulity, SUS – plocha ústí, OUS – obvod ústí, SVRCH – plocha obrysu prvních dvou závitů, OVRCH - obvod obrysu prvních dvou závitů (grafické znázornění viz obr. ???)

Příloha 8. 6: Tvarové varianty druhu *R. peregra*. vlevo jedinec s označením 53.3 v pravo 50.1



Příloha 8. 7: Ulita, tělo, kopulační burza a její duktus plže

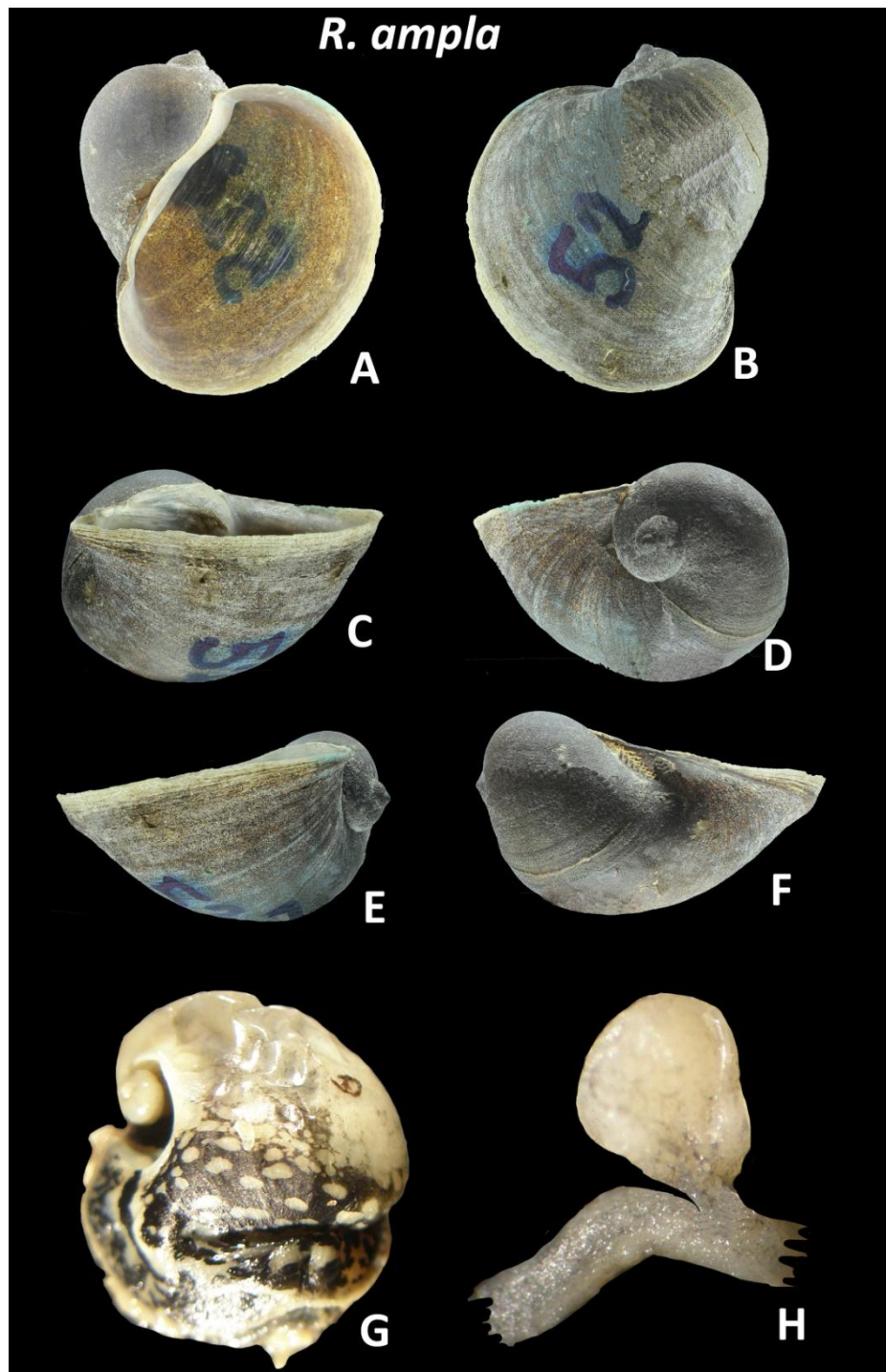
R. auricularia



Vysvětlivky: A –F různé pohledy ulity, G – tělo plže, Kopulační burza a její duktus

Příloha 8. 8: Ulita, tělo, kopulační burza a její duktus plže

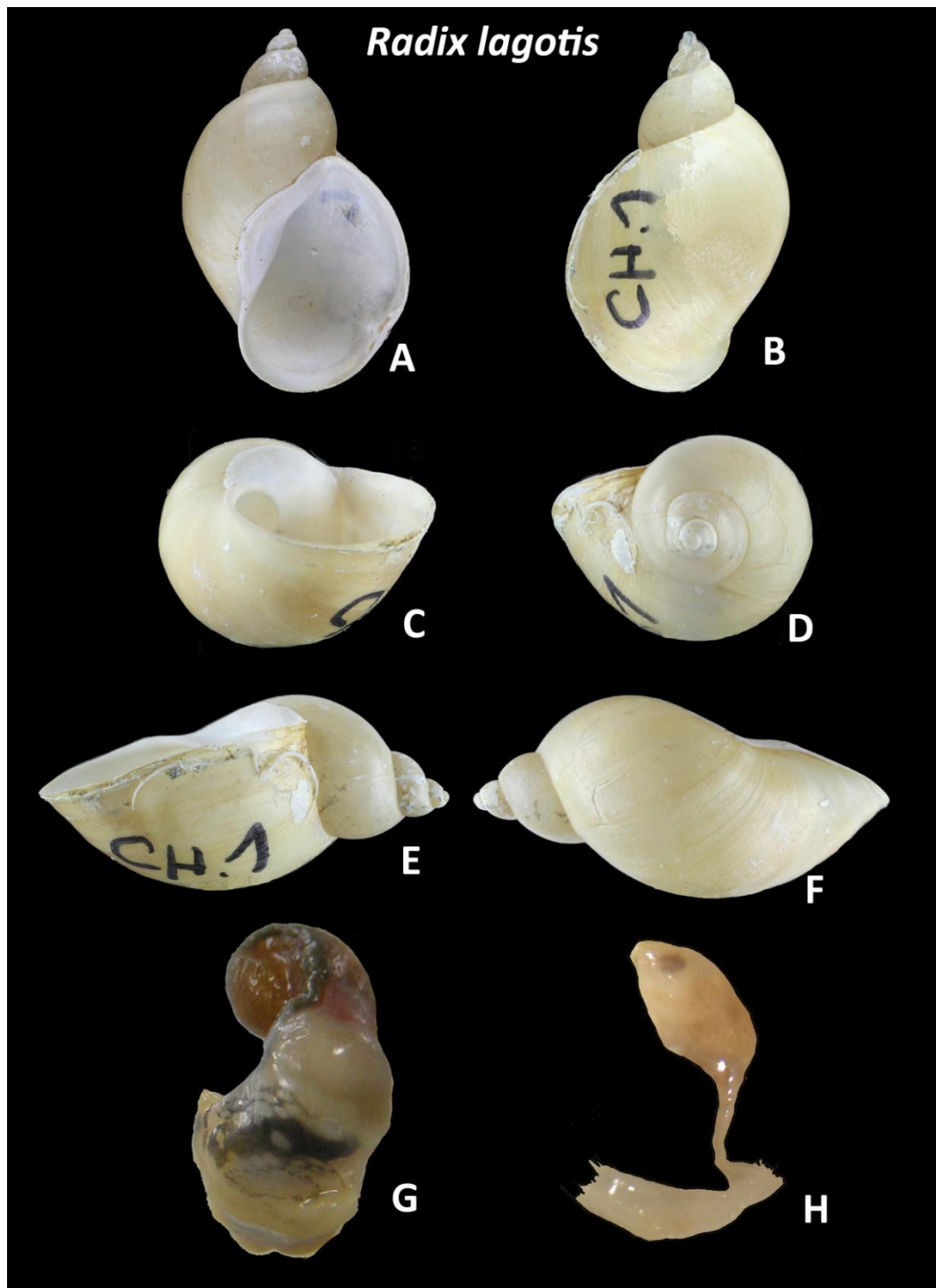
R. ampla



Vysvětlivky: A –F různé pohledy ulity, G – tělo plže, Kopulační burza a její duktus

Příloha 8. 9: Ulita, tělo, kopulační burza a její duktus plže

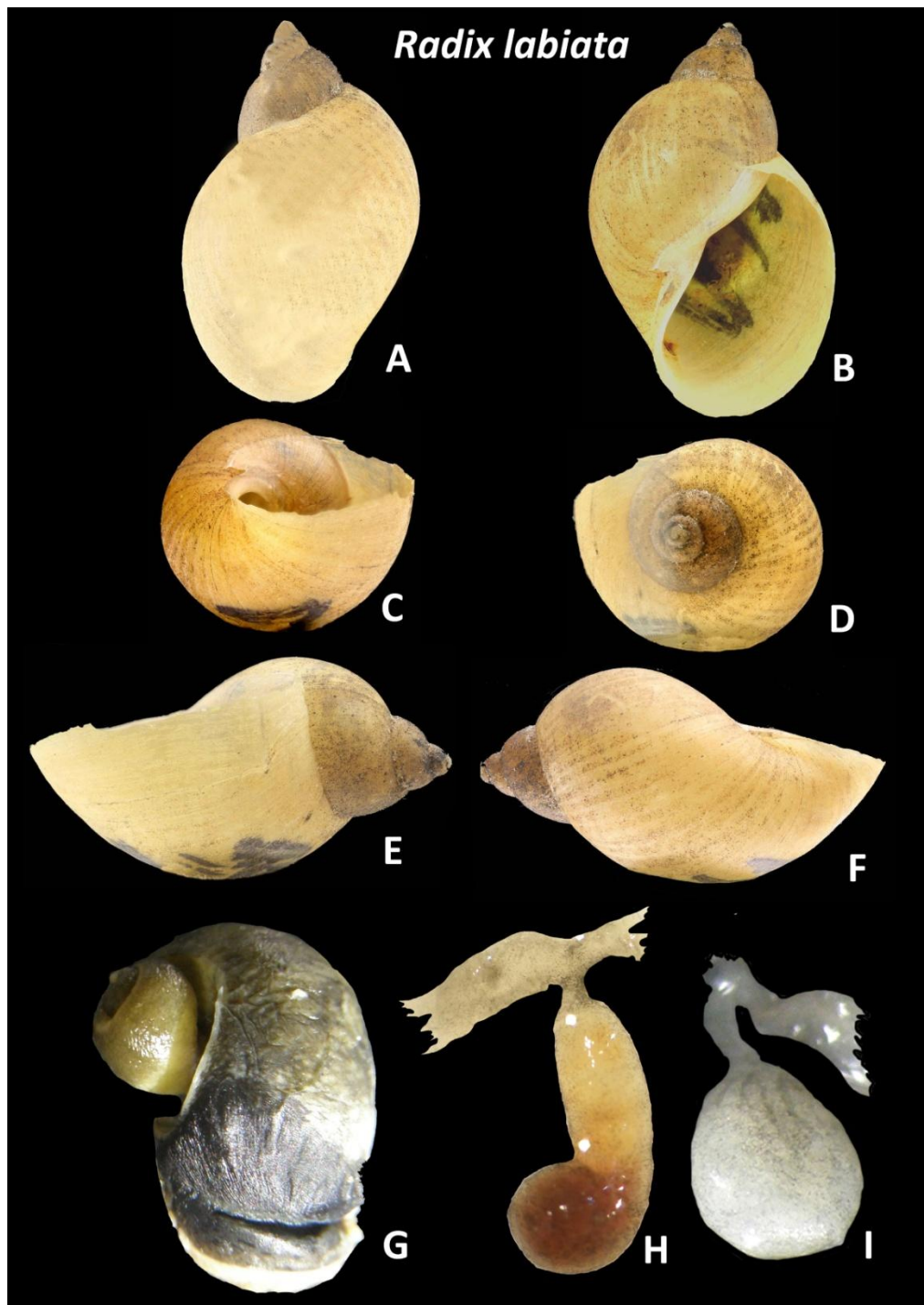
R. lagotis



Vysvětlivky: A –F různé pohledy ulity, G – tělo plže, Kopulační burza a její duktus

Příloha 8. 10: Ulita, tělo, kopulační burza a její duktus plže

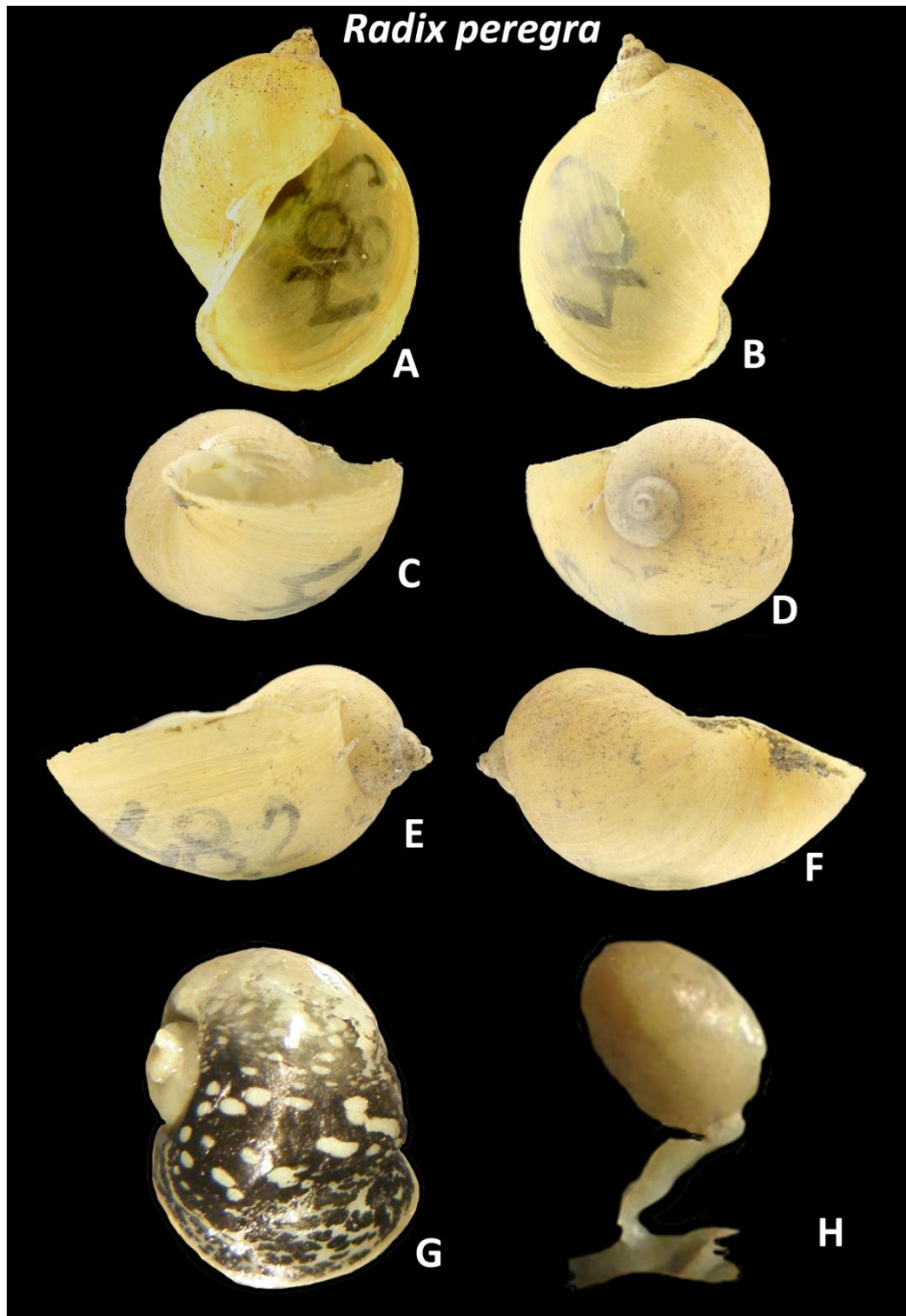
R. labiata



Vysvětlivky: A –F různé pohledy ulity, G – tělo plže, H, I – Dvě různé varianty Kopulační burzy a jejího duktu

Příloha 8. 11: Ulita, tělo, kopulační burza a její duktus plže

R. peregra



Vysvětlivky: A –F různé pohledy ulity, G – tělo plže, H, I – Dvě různé varianty Kopulační burzy a jejího duktu