

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Diplomová práce

Genetická diverzita vodních plžů *Aplexa hypnorum* a *Anisus vorticulus* v rámci střední Evropy

Genetic diversity of freshwater snails *Aplexa hypnorum* and *Anisus vorticulus* in central Europe

Bc. Jana Buďová

Školitel: RNDr. Martin Černý, PhD.

Konzultant: RNDr. Luboš Beran, PhD.

Praha 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 08.2013

Jana Budřová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Vám všem, kdo jste mi s touto prací pomáhali či mě jakkoliv jinak podporovali! Díky.

Abstrakt

Předmětem mé práce bylo shrnutí genetické variability sladkovodních plžů periodických tůní. Modelovými druhy byla ubývající levotočka bažinná (*Aplexa hypnorum*) a kriticky ohrožený svinutec tenký (*Anisus vorticulus*). Genetická variabilita byla zkoumána pomocí dvou mitochondriálních a dvo jaderných markerů. Rozložení genetické variability na genu COI u levotočky bažinné odpovídá různým povodím. Ostatní genetické markery (16S, ITS) však tento trend nepotvrdily. Příčiny tohoto nesouladu mezi různými markery jsou diskutovány několika různými způsoby zahrnujícími možné historické scénáře vývoje populací levotočky, ale i možné chyby laboratorních metod. V této studii byla zaznamenána obecně malá úspěšnost amplifikace, jejím žnejpravděpodobnějším důvodem je inhibiční vliv mukusu plžů na amplifikaci DNA. Dalším problémem, který při této práci nastal, bylo získání sekvence parazita (motolice) místo genu svinutce, i za použití primerů specifických pro plže. Kromě genetické a související metodické části má tato práce i třetí část zabývající se vyhodnocením environmentálních faktorů periodických tůní v přítomnosti a nepřítomnosti studovaných druhů a čtvrtou část zabývající se fylogenetickou analýzou evropských a amerických linií levotoček.

Klíčová slova: Periodické tůně, Genetická variabilita, COI, 16S, ITS-1, ITS-2, *Aplexa hypnorum*, *Aplexa elongata*, *Anisus vorticulus*, environmentální faktory, fylogenetická analýza.

Abstract

The aim of my study was to sum up the data about genetic variability of freshwater gastropods living in temporary ponds. My model species were moss bladder snail (*Aplexa hypnorum*) and the critically endangered ramshorn snail (*Anisus vorticulus*). Genetic variability was investigated by two mtDNA and two nuclear markers. The differences in genetic variation at the COI gene follow the pattern of different catchments. However, these findings do not agree with the patterns derived from genetic markers ITS1 and 16S. The reasons for the differences between the different markers are discussed in several ways involving few possible historical scenarios, but also possible errors of laboratory methods. In this study, there was only little success in amplification and the most likely reason is the inhibitory effect of snail mucus on DNA amplification. Another problem that occurred when this work was to obtain the sequence of the parasite (fluke) instead Anisus gene using gastropod specific primers. In addition to genetic and related methodological part of this work is the third part concerning the evaluation of environmental factors periodic pools in the presence and absence of the species studied. The fourth part is focused on the phylogenetical analyses of the european and american *Aplexa* lineages

Key words: Temporary ponds, genetic variability, COI, 16S, ITS-1, ITS-2, *Aplexa hypnorum*, *Aplexa elongata*, *Anisus vorticulus*, environmental factors, phylogenetical analyses.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle.....	7
3	Literární přehled.....	8
3.1	Charakteristika modelových druhů: <i>Aplexa hypnorum</i> (Linnaeus, 1758).....	8
3.1.1	Ekologie levotočky bažinné.....	10
3.1.2	Životní cyklus.....	11
3.2	Charakteristika modelových druhů: <i>Anisus vorticulus</i> (Troschel, 1834).....	12
3.2.1	Ekologie svinutce tenkého.....	13
3.2.2	Životní cyklus.....	16
3.3	Shrnutí základních vlastností modelových druhů <i>Aplexa hypnorum</i> a <i>Anisus vorticulus</i>	18
3.4	Disperse.....	19
3.4.1	Mechanismy disperse u sladkovodních plžů.....	19
3.4.1.1	Aktivní disperse.....	20
3.4.1.2	Vektory pasivní disperse.....	21
3.4.2	Schopnost disperse u vybraných modelových druhů levotočky bažinné a svinutce tenkého.....	24
3.4.3	Molekulární markery používané pro studium populační genetiky a disperse.....	24
4	Materiál a metodika.....	27
4.1	Odběr a zpracování vzorků.....	27
4.2	Laboratorní zpracování vzorků a sekvenace.....	27
4.2.1	Izolace DNA.....	27
4.2.2	PCR (polymerázová řetězová reakce).....	27
4.2.3	Gelová elektroforéza.....	30
4.2.4	Purifikace PCR produktů a příprava na sekvenaci.....	31
4.2.5	Analýza DNA sekvencí.....	31
4.3	Analýza chemických a fyzikálních parametrů vodních těles s výskytem <i>Anisus vorticulus</i>	32
4.4	Fylogenetické analýzy levotoček evropské linie <i>Aplexa hypnorum</i> a americké linie <i>Aplexa elongata</i>	32

5	Výsledky	33
5.1	Výsledky pro druh levotočka bažinná (<i>Aplexa hypnorum</i>).....	33
5.1.1	Sběr materiálu	33
5.1.2	Výsledky amplifikace DNA u genů COI, 16S, 12S a oblastí ITS-1 a ITS-2	34
5.1.3	Výsledky molekulárních analýz	35
5.2	Výsledky pro druh svinutec tenký (<i>Anisus vorticulus</i>).....	43
5.2.1	Odběr vzorků	43
5.2.2	Molekulární analýzy druhu <i>Anisus vorticulus</i>	43
5.2.3	Nezáměrná amplifikace DNA parazitů svinutce tenkého.....	45
5.3	Chemické a fyzikální parametry nádrží s výskytem <i>Anisus vorticulus</i>	45
5.4	Fylogenetická analýza levotoček linie <i>Aplexa hypnorum</i> a <i>Aplexa elongata</i>	47
6	Diskuse.....	50
6.1	Sběr materiálu druhu <i>Aplexa hypnorum</i>	50
6.2	Izolace a amplifikace DNA sladkovodních plžů	50
6.2.1	Problémy s amplifikací regionů ITS-1 a ITS-2 u druhu <i>Anisus vorticulus</i>	51
6.3	Genetická struktura levotočky bahenní (<i>Aplexa hypnorum</i>) a svinutce tenkého (<i>Anisus vorticulus</i>)	52
6.3.1	Vnitropopulační variabilita levotočky bahenní (<i>Aplexa hypnorum</i>)	53
6.3.2	Mezipopulační variabilita levotočky bahenní (<i>Aplexa hypnorum</i>).....	53
6.3.3	Genetická struktura svinutce tenkého (<i>Anisus vorticulus</i>).....	54
6.4	Fylogenetická analýza levotoček linie <i>Aplexa hypnorum</i> a <i>Aplexa elongata</i>	55
7	Závěr	57
8	Seznam literatury:	58
9	Seznam příloh	62

1 Úvod

Disperse je jednou ze základních životních strategií (Clobert et al. 2001). Pro studium disperse a jejich mechanismů jsou sladkovodní bezobratlí vhodným modelem (Bohonak a Roderick 2001). Obzvláště vhodnou skupinou pro studium disperse jsou pak sladkovodní bezobratlí z periodických tůní. Jejich habitaty mají dobře vymezené hranice, což usnadňuje stanovení jejich populací, a jejich populace bývají poměrně početné, což usnadňuje odběr a vzorkování (Bohonak a Jenkins 2001).

Jako modelové druhy této práce byli vybráni plži levotočka bažinná (*Aplexa hypnorum*) a svinutec tenký (*Anisus vorticulus*). Oba dva tyto sladkovodní bezobratlí patří mezi plže plicnaté, kteří jsou jak známo hermafrodité, což může být představaoat významnou výhodou při kolonizaci nových lokalit. Jsou obyvateli tůní v nivách velkých řek, tedy habitatu, který byl v minulosti značně fragmentován v důsledku činnosti člověka. Populace obou těchto druhů v současnosti ubývají (Beran 2002). Zjištění genetické struktury jejich populací by tak mohlo přinést data, která by mohla napomoci jejich ochraně.

2 Cíle

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo popsat, zanalyzovat a zhodnotit genetickou variabilitu vybraných druhů sladkovodních plžů: levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*) a svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*) a tyto výsledky pak interpretovat s ohledem na dispersní schopnosti těchto druhů.

Dílčím cílem bylo:

- Najít vhodný protokol pro amplifikaci použitých genetických markerů
- Zhodnotit vnitropopulační a mezipopulační genetickou variabilitu druhů *Aplexa hypnorum* a *Anisus vorticulus*
- Interpretovat výsledky v souvislosti s dispersním potenciálem daných druhů
- Fylogenetická analýza evropské linie levotoček *Aplexa hypnorum* a americké linie levotoček *Aplexa elongata*

3 Literární přehled

3.1 Charakteristika modelových druhů: *Aplexa hypnorum* (Linnaeus, 1758)

Synonymní názvy: *Physa hypnorum* (Linnaeus, 1758)

Taxonomické zařazení (dle Taylora 2003)

Čeleď: Physidae (levatkovití)

Podčeleď: Aplexinae

Tribus: Aplexini

Aplexa hypnorum



Levotočka bažinná (*Aplexa hypnorum*). Foto: Dr. Roy Anderson

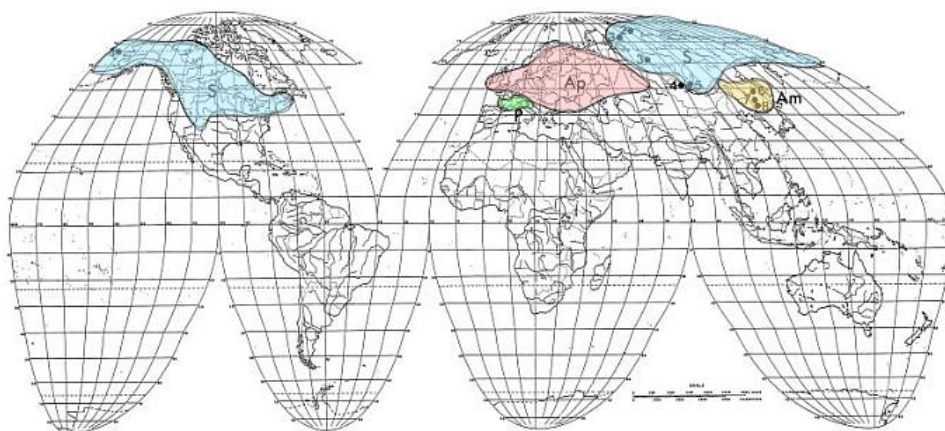
Levotočka bažinná (*Aplexa hypnorum*) - Základní charakteristika

Zástupci čeledi Physidae jsou charakterističtí levotočivou ulitou. Od ostatních našich zástupců této čeledi rozeznáme levotočku bažinnou poměrně snadno. Ulita je typicky tenkostěnná a rohovitě zbarvená, s hedvábným leskem, a pěti a půl až šesti rovnoměrně narůstajícími závití. Poměr výšky a šířky ulity dosahuje necelé jedné poloviny. Dospělí jedinci mívají ulitu výšky 8 - 15 mm a šířky 3 – 5 mm. Autorka této práce však našla dokonce jedince velikosti 18 mm. Noha plže je silně pigmentována a velmi tmavě zbarvena.

V ČR se vyskytuje *Aplexa hypnorum* roztroušeně. V Červeném seznamu ohrožených druhů České republiky je řazen do kategorie VU – vulnerable – zranitelný na Moravě a NT – near threatened v Čechách (Beran, Juříčková a Horský 2005). V posledních letech je totiž patrný celkový úbytek početnosti tohoto druhu (Beran 2002).

Taxonomické postavení druhu

Kvůli morfologické podobnosti s dalšími možnými druhy levotoček není jasné, zda má tento druh palearktické (eurosibiřské) či holoarktické rozšíření. Někteří badatelé se přiklánějí k názoru, že v Severní Americe se vyskytuje samostatný druh, nejčastěji uváděný pod názvem *Aplexa elongata* (Say, 1820) (Te 1978) či *Siberenauta elongates* (Taylor 2003). Jiní se domnívají, že levotočka bažinná je jediný druh s holoarktickým rozšířením (Dillon 2000, Piechocki 1979). Druh *Aplexa hypnorum* se zcela jistě vyskytuje téměř na celém evropském kontinentu, s výjimkou některých oblastí mediteránu na jihu a oblastí nad 73. rovnoběžkou, a západní Sibíře, ve 24 z 25 limnofaunistických oblastí Evropy (Willmann a Pieper 1978). Existuje ale dále i domněnka, že levotočky žijící v oblasti jihozápadní Evropy, Švýcarska a Itálie patří do nového druhu *Paraplexa cornea* (Massot, 1845) (Taylor 2003). Tato domněnka však není všeobecně přijímaná. Ve většině literatury jsou pro Evropu uváděny jen tři druhy čeledi Physidae, a to *Physa fontinalis* (Linnaeus, 1758), *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) /*Physella gyrina* (Say, 1821), *Aplexa hypnorum* (např. Piechocki 1979, Willmann a Pieper 1978, Cuttelod et al. 2011). Druh *Paraplexa cornea* dokonce nenajdeme ani na seznamech druhů (Gargonmiy et al. 2011, Rüetschi et al 2012) měkkýšů států, na jejichž území by se měla vyskytovat, a to dokonce ani ve Francii, na jejímž území by se měla nacházet typová lokalita tohoto druhu (Taylor 2003).



Obr. 1 Areál rozšíření vybraných zástupců tribu Aplexini: *Aplexa hypnorum* – červeně, *Paraplexa cornea* – zeleně, r. *Siberenauta modfje*, r. *Amuraplexa* – žlutě (převzato z Taylor 2003, upraveno).

3.1.1 Ekologie levotočky bažinné

Habitat

Levotočka bažinná je habitatový specialista. Jejím charakteristickým prostředím jsou periodické tůně. Často se s ní však také setkáme při okrajích rybníků s bohatou vegetací makrofyt a slepých ramenech v pozdějších stádiích sukcese (Beran 2002). Může ale také obývat odvodňovací kanály či vrchoviště (Gloer a Meier-Brook 2003). Tento druh je velmi dobře adaptován na extrémní podmínky periodických vod, jakými jsou úplné vyschnutí v létě či kompletní promrznutí v zimě. *Aplexa hypnorum* je zároveň potravní specialista, její potravu tvoří zejména detrit (Brown 1982). Brown sice svou studii prováděl na severoamerické linii levotoček, ale je velmi pravděpodobné, že oba druhy levotoček mají velmi podobnou ekologii a biologii. *Aplexa hypnorum* se tedy vyskytuje s oblibou v habitatech s dostatkem opadu na dně (Piechocki 1979).

Její výskyt je soustředěn zejména v nížinách v nivách velkých řek (Polabí, Poodří, Pomoraví). V polohách s nadmořskou výškou nad 500 m. n. m. se vyskytuje spíše ojediněle (Willmann a Pieper 1978).

Preferece substrátu, asociace s vodními makrofyty

Aplexa hypnorum preferuje vodní tělesa s hlinitým či písčito-hlinitým sedimentem, typicky s vrstvou detritu na dně (Piechocki 1979), vyskytuje i na lokalitách s kamenitým substrátem (Okland 1990) a písčitojílovitým substrátem (Den Hartog 1963). Tento druh žije ve vodních tělesech nejen s bohatou, ale i s poměrně chudou vegetací makrofyt (Okland 1990). Byla u něj zjištěna asociace se zblochanem vzplývavým (*Glyceria fluitans* (L.) R. Br.), psárkou kolénkatou (*Alopecurus geniculatus* L.), psinečkem výběžkatým (*Agrostis stolonifera* L.) a lakušníkem vodním (*Ranunculus aquatilis* L.), což jsou všechno rostliny běžně rostoucí v periodických tůních (Zealand a Jeffries 2009).

Chemické parametry

Levotočka je co se chemických parametrů vody týče, poměrně nenáročná. Byl zjištěn její výskyt na lokalitách s velkým rozpětím hodnot konduktivity, pH i množství vápníku (Spyra 2010). *Aplexa hypnorum* pravděpodobně také ani není kalcifilní druh (Boycott 1936).

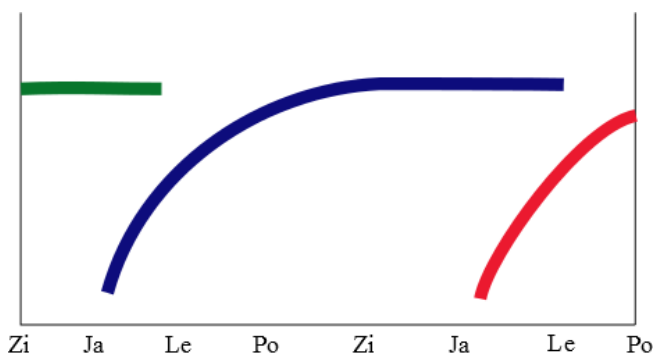
Levotočka může přežívat i poměrně nízké hodnoty pH. Nižší pH (v rozmezí od 5 – 5,75) však u ní snižuje plodnost, zcela letální je pro vývoj embryí až pH 4,3 (Holcombe et al. 1984).“

3.1.2 Životní cyklus

Životní cyklus druhu levotočky bažinné je velmi výrazně ovlivněn a svázán s podmínkami jejího typického habitatu – periodických vod. Drobné tůň se typicky plní vodou v únoru či březnu. Už ale v červnu či červenci tůň vysychají a přes léto jsou úplně suché. Vodou se mohou naplnit ještě během podzimu.

Životní cyklus tohoto druhu prozkoumali v 60. a 70. letech minulého století nizozemští vědci Den Hartog a de Wolf (1962) a Vlasblom (1971) a zde uvádím krátké shrnutí jejich výsledků. *Aplexa hypnorum* mívá obvykle jednu generaci ročně. Jednotlivé generace se také většinou příliš nepřekrývají. Vaječné kokony kladou dospělci v období od května do července. Z nich se mohou líhnout vajíčka před i po letním vyschnutí. Na přežití nepříznivých podmínek jsou totiž nejlépe adaptována právě vajíčka a juvenilní stádia. Přesto letní sucho přežívají i někteří dospělci. Sucho překonávají levotočky ve dně v bahně, kde vyhledávají nejvlhčí místa, kde se přitisknou ústím k substrátu. Takto mohou překonat i několik měsíců trvající sucho. Na podzim se tůň typicky opět na krátký čas znovu naplní. V tomto období se z vajíček líhnou další juvenilní jedinci. Při vhodných podmínkách mohou někteří jedinci nové generace narůst až do velikosti zhruba 10 mm, přesto se však nerozmnožují. Promrznutí přežívají podobně jako vyschnutí. Opět platí, že výrazně odolnější nepříznivým podmínkám jsou juvenilní jedinci. Jedinci rodičovské generace přežívají zimu spíše výjimečně. Na jaře začínají opět růst, až když průměrná teplota přesáhne 7°C.

Aplexa hypnorum má tedy jednu generaci ročně, k rozmnožování dochází během jara či začátku léta. Protože se rozmnožuje jen jednou za život, můžeme tento druh označit za stenoparní. Tento životní cyklus tedy odpovídá životnímu cyklu typu 1 podle Russela-Huntera (Russell-Hunter 1961 a 1964) nebo životnímu cyklu a podle Calowa (Calow 1978).



Obr. 2 Schematické znázornění životního cyklu levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*). Překresleno podle Den Hartog a de Wolf 1962, Vlasblom 1971 a Dillon 2011. Na ose x je čas, na ose y relativní velikost plžů. Různé generace jsou zobrazeny odlišnými barvami. „Zi“ = zima, „Ja“ = jaro, „Le“ = léto, „Po“ = podzim.

3.2 Charakteristika modelových druhů: *Anisus vorticulus* (Troschel, 1834)

Synonymní názvy: *Disculifer vorticulus* (Troschel, 1834)

Spiralina vorticulus (Troschel, 1834)

Taxonomické zařazení (podle Albrecht et al. 2006)

Čeleď: Planorbidae (okružákovití)

Podčeleď: Planorbinae

Tribus: Planorbini

Anisus vorticulus (Troschel 1834)



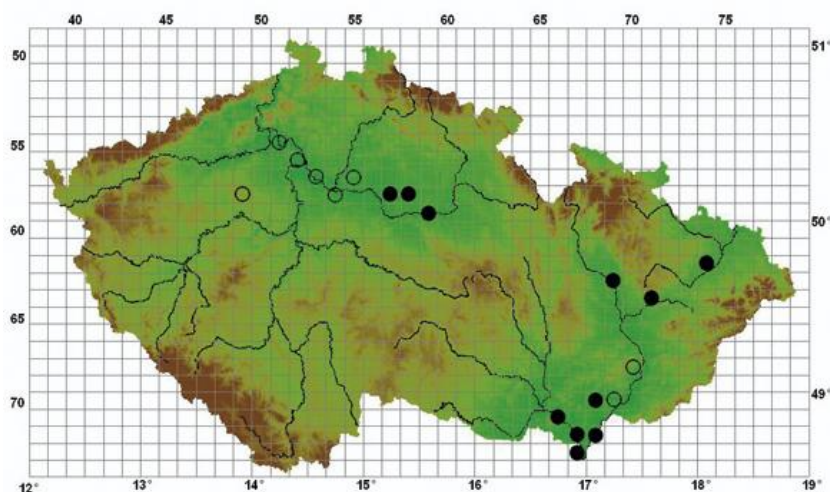
Obr. 3 Svinutec tenký (*Anisus vorticulus*), převzato z Beran (2010).

Svinutec tenký (*Anisus vorticulus*) - základní charakteristika

Svinutec tenký je drobnějším zástupcem čeledi Planorbidae. Jako u ostatních zástupců této čeledi je jeho ulita plochá a terčovitá. Od příbuzných druhů, zejména pak od druhu svinutec zploštělý (*Anisus vortex*), ho můžeme s jistotou odlišit podle znaků na ulitě. Schránky tohoto druhu jednak většinou nepřesahují šířku 1 mm a výšku 7 mm, jsou velmi tenkostěnné, většinou s pěti závitů a po obvodu s tupým kýlem přibližně ve středu ulity. Jedinci formy *A. vorticulus for. charteus* mají navíc kýl opatřený blanitým lemem. Tělo plže je zbarveno tmavě, ulita světle žlutohnědě.

Anisus vorticulus se vyskytuje v 11 z 25 limnofaunistických regionů Evropy. Vyskytuje od Evropy až po řeku Ob na Sibiři (Willmann a Pieper 1978). Přes svoje značné geografické rozšíření je ve všech částech svého areálu spíše vzácný (Terrier et al. 2006).

V ČR se tento druh vyskytuje velmi řídko na několika monitorovaných lokalitách. Těžištěm jeho výskytu u nás jsou nivy velkých řek, tedy zejména Polabí a oblast dolního toku Moravy a Dyje (Beran 1998, Beran 2002). V Červeném seznamu ohrožených druhů České republiky je proto zařazen do kategorie CR – critically endangered – kriticky ohrožený (Beran, Juříčková a Horsák 2005).



Obr. 4 Mapa rozšíření svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*) v ČR. Plné kolečko – výskyt po roce 2005, prázdné kolečko – výskyt před rokem 2005 (převzato z Beran 2010)

Od 1. května 2004 je tento druh na seznamu druhů zařazených do přílohy II (Druhy živočichů a rostlin v zájmu společenství, jejichž ochrana vyžaduje vyznačení zvláštních území ochrany) a IV (Druhy živočichů a rostlin v zájmu společenství, které vyžadují přísnou ochranu) Směrnice o stanovištích (celým názvem Směrnice Rady č. 92/43/EHS z 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin).

3.2.1 Ekologie svinutce tenkého

O biologii a ekologii tohoto druhu bylo známo poměrně málo, což se, i díky jeho celoevropské ochraně, pomalu mění a o tomto druhu se objevuje řada nových studií (např. Watson a Ormerod 2004a, Watson a Ormerod 2004b, Gloer a Groh 2005, Myzyk 2008, Zettler 2013).

Habitat

Svinutec tenký je habitatový specialista. Typický habitat druhu *Anisus vorticulus* představují většinou menší a mělčí prosluněné vodní plochy s porosty vodních makrofyt (Gloer a Groh 2005). Preference takového prostředí souvisí s jeho potravou (viz dále). Naopak ve větších,

hlubších nádrží s otevřenou hladinou byla jeho abundance nízká (Watson a Ormerod 2004 a). V literatuře můžeme nalézt velké množství údajů o výskytu tohoto druhu v nejrůznějších biotopech (shrnuto v Terrier et al. 2006). Může obývat jak stálé, tak i periodické vody, a vyskytuje se jak v přírodních vodních tělesech, tak i ve vodních tělesech antropogenního původu. *Anisus vorticulus* obývá z vodních ploch přírodního původu nejrůznější vodní tělesa v říčních nivách a litorálu jezer, z vodních ploch antropogenního původu odvodňovací kanály na pastvinách a loukách, pískovny (Beran 2002) a vodní plochy vzniklé po odtěžení rašeliny (Piechocki 1979). Nálezy tohoto druhu jsou zaznamenány dokonce i ze slatinišť a pomalu plynoucích řek (Piechocki 1979). Pro jeho výskyt v ČR jsou typický habitatem mrtvá říční ramena v pozdějších stádiích sukcese, pískovny a rybníky s bohatými porosty makrofyt (Beran 2002).

Asociace s vodními makrofyty

Anisus vorticulus obývá lokality s bohatou makrovegetací. Watson a Ormerod (2004b) však zjistili, že se jeho početnost zvyšuje s vyšší abundancí vegetace natantní, naopak jeho abundanci snižuje vyšší početnost ponořených makrofyt. Tento druh nalezneme spíše při hladině (cca od 5 do 30cm), typicky na porostech vodních rostlin, např. okřehku (*Lemna* sp.), vodního moru kanadského (*Eloдея canadensis* Michx.), růžkatce (*Ceratophyllum* sp.) či zelených vláknitých řas (*Chara* sp., *Cladophora* sp., *Ulotrichale* sp.) (Piechocki 1979, Terrier et al. 2006, Uvaeva a Hural 2008). V ČR se vyskytuje často na lokalitách společně s okřehkem trojbrázdým (*Lemna trisulca* L., Luboš Beran, osobní sdělení), Uvaeva a Gural 2008 však uvádí, že *A. vorticulus* na Ukrajině neobývá porosty okřehku trojbrázdého, ale okřehku menšího (*Lemna minor* L.). V porostech makrofyt totiž nachází svou potravu – perifyton, zřejmě zejména rozsivky (Gloer a Groh 2005) a tkáně vyšších rostlin (Piechocki 1979).

Preference substrátu

U druhu svinutec tenký nebyla pozorována žádná výraznější preference určitého typu substrátu. Může se vyskytovat jak na lokalitách s písčítým, tak hlinitým a jílovitým sedimentem (Gloer a Groh 2007, Uvaeva a Hural 2008).

Chemické parametry

Kyslík

Anisus vorticulus se vyskytuje v mělkých habitatech, kde je výrazný gradient koncentrace kyslíku. Watson a Ormerod (2004b) zjistili, že nízké koncentrace kyslíku jsou pro tento druh

pravděpodobně limitujícím faktorem. Fuchs 2007 (podle Gloer a Groh 2005) zjistil, že po aerace anaerobních sedimentů v tůních v povodí Rýna, tyto lokality osídlil *Anisus vorticulus*, navíc ve vysoké populační hustotě. Co je příčinou této limitace? *Anisus vorticulus* je plicnatý plž, jako zdroj kyslíku využívá vzdušný kyslík. Přestože je pravděpodobně adaptován i ke kožnímu dýchání (jeho hemolymfa je jako u dalších zástupců čeledi Planorbidae bohatá na hemoglobin), dýchá plicemi vzdušný kyslík (Terrier et al. 2006). V anaerobním sedimentu dochází vlivem redukčního prostředí ke vzniku jedovatých látek, jako je sirovodík (Gloer a Groh 2007), jejichž přítomnost by mohla být pro tento druh letální.

Konduktivita

Svinutec tenký není příliš limitován chemickou konduktivitou vody (Gloer a Groh 2005). Terrier et al. (2006) shrnují data z dosavadních studií. Naměřená konduktivita na lokalitách se svinutcem tenkým byla v rozmezí od 289 do 1174 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Svinutec je vázán na přirozeně mesotrofní vody, které mají ale zároveň vyšší průhlednost (Gloer a Groh 2005).

pH

Naměřené hodnoty pH pro lokality s výskytem svinutce tenkého se pohybovaly v rozmezí 6,5 – 8,1 (Terrier et al. 2006, tab. 1). Uvaeva a Hural 2008 uvádí pro tento druh rozmezí pH 6 – 7,5 a dodávají i možnost výskytu ve slabě kyselých vodách. Druh *Anisus vorticulus* se tedy vyskytuje ve vodách se zhruba neutrálním pH, a to zhruba v rozmezí od 6 do 8.

Vápník

Boycott (1936) řadí druh *Anisus vorticulus* mezi plže kalcifilní (preferuje vody s obsahem vápníku vyšším než $20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Terrier (2006) také uvádí data o množství vápníku v měřených lokalitách svinutce tenkého. Vápník zde dosahuje koncentrace od 30 do 378 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Watson a Ormerod 2004b se však domnívají, že tato závislost nemusí být zapříčiněna jen fyziologicky, ale konkrétními podmínkami lokality (např. jimi zkoumané lokality ve východním Sussexu ve Velké Británii leží na křídových vápencových usazeninách).

Asociace s jinými druhy sladkovodních měkkýšů

Gloer a Groh (2007) ve své studii v severním Německu (Karlsruhe, Hamburg) nezaznamenali ve své práci žádné výraznější asociace s jinými měkkýši, vyjma točenky ploché (*Valvata cristata*, Muller 1774) a čočkovce kýlnatého (*Hippeutis complanatus*, Linnaeus 1758). To bylo zapříčiněno zejména tím, že obě dvě lokality, kde byl výzkum prováděn se ve značně míře odlišovaly co do habitatu (Karlsruhe – mrtvá ramena; Hamburg – pomalu tekoucí úseky řek) a na většině lokalit nebyly pro sledovaný druh optimální podmínky. Zettler (2013) ve své recentní studii v severovýchodním Německu prozkoumal celkem 26 lokalit s vysokou frekvencí výskytu svinutce tenkého s téměř optimálními podmínkami. Společně se svinutcem

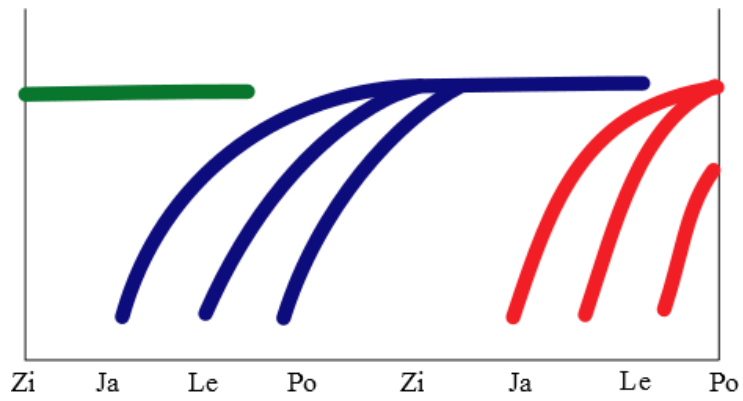
tenkým se na stejných lokalitách vyskytovalo 13 dalších měkkýšů (tzv. *Anisus vorticulus-community*). Do této kategorie byly zařazeny i výše zmíněné druhy točenky a čočkovce, ale i příbuzný svinutec zploštělý (*Anisus vortex*, Linnaeus 1758) a mlž hrachovka okružankovitá (*Pisidium pseudosphaerium*, Favre, 1927).

3.2.2 Životní cyklus

Jedinci druhu *Anisus vorticulus* se dožívají 17 – 18 měsíců (Gloer a Groh 2005), v laboratorních podmínkách byl zaznamenána délka života až 776 dní (Myzyk 2008). Začíná se rozmnožovat zhruba ve velikosti 2,5- 3 mm a stáří 6 týdnů (Terrier et al 2006). Životní cyklus druhu *Anisus vorticulus* popsali podrobněji v přírodních podmínkách Gloer a Groh (2005) a v laboratorních podmínkách Myzyk (2007).

První vaječné kokony jsou kladeny již brzy na jaře, v březnu a dubnu. Vylíhli juvenilní jedinci pak velmi rychle rostou, jejich růstová rychlost může v tomto období činit až 33 μ m/den (v laboratoři až 65 μ m/den). Zatímco rodičovská generace v průběhu léta umírá, svinutci narození na jaře se ještě téhož roku rozmnožují. Kopulace byla pozorována již ve stáří 75 dní. Na konci jara a začátku léta (květen, červen – červenec) začíná intenzivní období rozmnožování, kdy se zhruba každých 12 - 18 dní líhnou noví jedinci. Jedním z důležitých faktorů ovlivňujících rozmnožování je teplota. Při vyšších teplotách může kladení vaječných snůšek pokračovat i na podzim, výjimečně až do listopadu. Na podzim se vlivem klesající teploty kromě reprodukční aktivity však snižuje i rychlost růstu svinutců. Rychlost růstu se snižuje i v případě, že jsou teploty srovnatelné s jarním obdobím. Myzyk (2013) sice pozoroval rapidní růst u všech juvenilů bez rozdílu, v laboratorních podmínkách se ovšem pohybovala teplota vody v nádržích pro plže od jara do podzimu na relativně stálé úrovni (17 - 25°C).

Anisus vorticulus má tedy dvě generace ročně, rozmnožuje se průběžně od jara do podzimu, a obě jeho generace jsou iteroparní. Životní cyklus svinutce tenkého bychom tedy mohli charakterizovat jako typ B podle Calowa (Calow 1978), konkrétně dr. Dillonem navržený typ B (ii) (Dillon 2011).



Obr. 5 Schematické znázornění životního cyklu svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*). Překresleno podle Gloer a Groh 2007 a Dillon 2011. Na ose x je čas, na ose y relativní velikost plžů. Různé generace jsou zobrazeny odlišnými barvami. „Zi“ = zima, „Ja“ = jaro, „Le“ = léto, „Po“ = podzim.

3.3 Shrnutí základních vlastností modelových druhů *Aplexa hypnorum* a *Anisus vorticulus*

Druh	<i>Aplexa hypnorum</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Anisus vorticulus</i> (Troschel, 1834)	Zdroje
Hlavní ekoskupina	D - vodní a mokřadní měkkýši ¹	D - vodní a mokřadní měkkýši ¹	¹ Ložek 1964, ¹ Lisický 1991
Ekoskupina	10 - vodní měkkýši ¹	10 - vodní měkkýši ¹	¹ Ložek 1964, ¹ Lisický 1991
Ekoelement	PDt - paludicolae temporariofilae (druh periodických mokřadů) ¹	SG - stagnicolae (druh stojatých a větších trvalých vod) ¹	¹ Ložek 1964, ¹ Lisický 1991
Mikrochronoelement	Q1 – konstantní druh, který přežil v podmínkách wormského periglaciálu ¹	Q2 – druh převážně teplejších období ¹	¹ Ložek 1964, ¹ Lisický 1991
Rozšíření	holoarktické/palearktické/eurosibiřské	Eurosibiřské	Beran 2002, Taylor 2003, Terrier et al. 2006
Míra ohrožení	VU – zranitelný (Mo), NT – téměř ohrožený (Bo)	CR - kriticky ohrožený	Beran et al. 2005
Životní cyklus	1 generace ročně, zřejmě semelparní	2 generace ročně, iteroparní	Den Hartog a de Wolf (1962), Vlasblom (1971), Gloer a Groh (2007)
Habitat	Periodická vodní tělesa s dostatkem detritu	Prosluněné, měkké vodní nádrže s makrofyty	Piechocki 1979
Potrava	detrit	periphyton	Brown 1982, Piechocki 1979, Gloer a Groh 2007

3.4 Disperse

Schopnost disperse je jednou ze základních životních strategií (Clobert et al 2001). Díky svému nepopíratelnému významu, ať už pro výzkum biologických invazí, populační ekologie či biogeografie, se dostává do popředí zájmu biologů (Clobert et al. 2012, Nathan 2001). Přesto dosud zůstává terminologie samotného pojmu „disperse“ a úzce související „migrace“ nejednotná a problematická. Pod pojmem „migrace“ většinou chápeme jako pravidelný přesun organismů mezi lokalitami (např. každoroční tah ptáků na zimoviště či diurnální vertikální pohyby planktonu). Pod pojem disperse bývá někdy zahrnována i tzv. disperse v čase. Příkladem disperse v čase mohou být banky semen u rostlin či banky trvalých vajíček vodních bezobratlých (Bilton et al. 2001). V této práci se přidržím definice disperse jako prostého pohyb jedince z jednoho habitatu do druhého (Bowler & Benton 2005).

Můžeme rozlišovat několik různých typů disperse podle různých hledisek. Pokud se jedinec pohybuje z místa svého narození na místo rozmnožování, jedná se o tzv. natální či prereprodukční dispersi, pokud mezi místy rozmnožování, jde o tzv. postreprodukční či jen reprodukční dispersi (Clobert et al. 2012).

Dispersi lze považovat za třístupňový proces. Skládá se z fází emigrace („emmigration“, „departure“) čili opuštění původní lokality, přesunu („transfer“, „transience“, „vagrant“) a imigrace („immigration“, „settlement“) čili dosažení nové lokality (Clobert et al. 2012). Právě faktory ovlivňující emigraci, zásadně ovlivňují míru disperse (Benthon a Bowler 2005). Mezi tyto faktory patří hustota populace (většinou disperse stoupá s populační hustotou), dostupnost potravy (čím méně potravy, tím vyšší míra disperse) a velikost (čím je plocha menší, tím je disperse častější). K těmto faktorům patří i izolovanost plochy. Tímto faktorem je i míra izolovanosti plochy. Izolovanost totiž výrazně ovlivňuje náklady spojené s dispersí (Benthon a Bowler 2005).

Pro jedince, který se přesouvá z jedné lokality na druhou má disperse řadu důsledků, které pro tohoto jedince nemusí znamenat jen výhody, ale též nevýhody (Stensen a Lidicker 1992) – zisky a ztráty individuální fitness (Clobert et al. 2012). Podle Biltona et al (2001) a Clobert et al. (2012) mezi hlavní výhody opuštění dosavadní lokality patří možnost úniku z prostředí s nepříznivými podmínkami (např. nedostatkem zdrojů, parazity, predátory) a nalézt novou lokalitu s vhodnějšími podmínkami, vyhnout se inbreedingu a příbuzenské kompetici. Nevýhodami pak jsou například energetické a fyziologické náklady spojené se samotným pohybem, náchylnost k predaci během vlastní disperse, nenalezení nové vhodné lokality či potravy, sexuálního partnera, případně outbreedgová deprese.

3.4.1 Mechanismy disperse u sladkovodních plžů

Podle toho, kdo pohyb vyvíjí, dělíme dispersi na aktivní a pasivní. Při pasivním šíření se organismus, na rozdíl od šíření aktivního, pohybuje pomocí různých činitelů, tzv. vektorů.

Mezi tyto vektory patří např. vítr, voda či jiní živočichové. U sladkovodních měkkýšů se uplatňuje jak aktivní, tak pasivní disperse.

„Pomalou, ale jistě“¹ nese v překladu název nedávno publikované review o dispersi sladkovodních měkkýšů (Kappes a Haase 2012). Tento trefný nadpis dobře zobecňuje pohybové schopnosti sladkovodních měkkýšů, tedy i plžů. Přestože se u sladkovodních plžů setkáváme i s aktivní dispersí, tato se kvůli omezeným pohybovým schopnostem plžů uplatňuje zejména na kratší vzdálenosti (Kappes a Haase 2012).

Oproti tomu pasivní disperse je schopná zajistit přesuny na delší či dokonce velmi dlouhé vzdálenosti. Zřejmě právě pasivní disperse pomocí ptáků, podobně jako tomu bylo např. u suchozemských plžů r. *Balea* (Gittenberger 2006), umožnila sladkovodním plžům osídlit dokonce i izolované ostrovy.

Schopnost pasivní disperse, a to i mimo vodní prostředí, usnadňuje sladkovodním plžům vysoká odolnost proti vyschnutí. Poznatky o schopnosti čelit vyschnutí u vodních měkkýšů shrnula ve své práci Alyakrinskaya (2004). Na vyschnutí jsou obzvláště dobře adaptováni sladkovodní plži obývající periodicky vysychající vodní prostředí. Např. *Aplexa hypnorum* je schopna přežít úplné vyschnutí až po dobu čtyř měsíců (Fisher 1966 podle Alyakrinskaya 2004). Po několika měsících odolávání vyschnutí sice plži ztratí značnou část své původní hmotnosti, vykazují však stále životnost a po návratu do příznivých podmínek velmi rychle aktivizují a ztracenou hmotnost znovu naberou (Alyakrinskaya 2004). Schopnost odolávat krátkodobému vyschnutí vykazují dokonce i vaječné snůšky (Alyakrinskaya 2004).

3.4.1.1 Aktivní disperse

Aktivní disperse sladkovodních plžů je v drtivé většině omezena na vodní prostředí. Možnost pohybovat se na krátké vzdálenosti po souši je pravděpodobně omezena jen na plicnaté (Pulmonata) dýchající vzdušný kyslík. Pobyt mimo vodní prostředí jsou však sladkovodní plži schopni překonávat v aktivním stavu pouze v řádu hodin (Alyakrinskaya 2004). Kupříkladu Kew (1893) pozoroval živou bahnatku malou (*Galba truncatula*, O. F. Müller, 1774; Lymnaeidae) lezoucí po poli, stovky metrů daleko od nejbližší vodní plochy. Toto pozorování je ale spíše výjimkou potvrzující pravidlo.

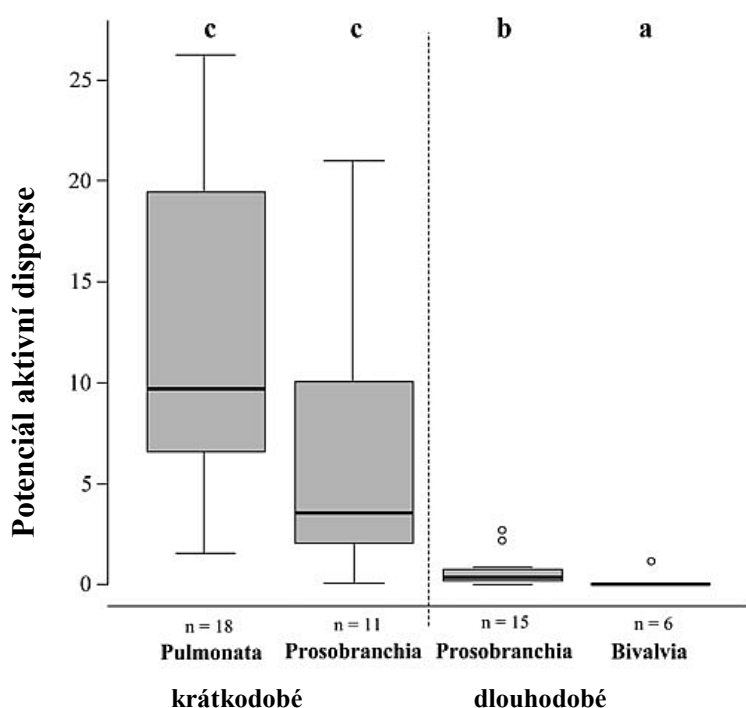
Přestože sladkovodní plži obývají vodní prostředí, neumí plavat, jen jsou schopni se plazit, a to i po povrchu hladinové blanky (Dillon 2000). Dále jsou také sladkovodní plicnatí plži schopni řídit svoji hustotu pomocí bublinek vzduchu v plášťové dutině (Miller et al. 2006). Díky tomu mohou vykonávat dýchací pohyby na hladinu (Dillon 2000).

Významným aktivním pohybem pro plže žijící v lotickém prostředí je migrace proti vodnímu proudu. Toto chování bylo pozorováno u různých skupin sladkovodních plžů, jejichž přehled

¹ „Slow, but steady“

můžeme nalézt v práci Huryna a Denyho (1997). Migrace proti proudu slouží hlavně ke kompenzaci driftu a vyhnutí se predátorům (Miller et al. 2006). U některých tropických sladkovodních plžů z čeledi Neritidae (např. *Neritina latissima* W. J. Broderip, 1833) slouží aktivní migrace proti proudu jako kompenzace pasivního driftu jejich planktonních larev (Schneider a Lyons 1993).

Potenciál aktivní disperse u plžů se většinou zjišťuje pomocí krátkodobých laboratorních experimentů (např. Deigana a Orlovsky 1990), přestože jsou vhodnější dlouhodobější pozorování v přirozeném prostředí (např. Ribi 1986). Krátkodobá laboratorní pozorování totiž vedou ke značně zkresleným odhadům potenciální aktivní disperse (Kappes a Haase 2012, viz obr. 6). Aktivní disperse je též ovlivněna velkým množstvím různých faktorů, např. pohlavím (u gonochoristů), velikostí, rychlostí vodního proudění či teplotou (Kappes a Haase 2012).



Obr. 6 Rozdíl v odhadech potenciálu aktivní disperse (v km/rok) u sladkovodních měkkýšů založené na krátkodobých a dlouhodobých experimentech (Kappes, Haase 2012)

3.4.1.2 Vektory pasivní disperse

Voda

Jedním z nejdůležitějších vektorů pasivního šíření sladkovodních plžů jsou voda, povodně a vodní proud. Pokud plže unáší vodní proud, jedná se o tzv. drift. Drift může plžům umožnit šířit se během krátké doby na značné vzdálenosti (Dazo et al. 1966). Šíření pomocí driftu je omezené však pouze na lotické habitaty. Specifickým příkladem pasivní disperse a driftu je disperse planktonních larev. U plžů však planktonní larvy mají jen někteří zástupci čeledi Neritidae. Např. larvy druhu *Neritina latissima* se driftem nechávají unášet do oceánu, protože

ke svému vývoji potřebují slanou vodu. Juvenilní jedinci pak aktivně migrují dále proti proudu řek (Schneider a Lyons 1993).

Významným způsobem šíření jak v lotických, tak lentických habitatech je šíření povodněmi (Zhao et al. 2010, Miller et al. 2006). Během povodní se neuplatňuje jen vlastní pasivní disperse, ale plži se během povodní šíří přichycení i na různých předmětech, např. makrofytech (Städler a Jarne 1997).

Vítr

Stále je zatím spekulací možnost přenosu plžů pomocí větru. Vagvolgyi (1975) si povšiml, že velikost úlomků hornin, které byly přeneseny vzdušnými proudy, odpovídá či dokonce značně přesahuje velikost některých plžů. Přenos vzduchem studoval i Kirchner et al. (1997). Při svých experimentech studovali sedimentační rychlost schránek drobných plžů rodu *Truncatellina* (cca 1 mm). Zjistili, že při velké bouři s rychlostí větru $27,8 \text{ ms}^{-1}$ (zhruba 100 kmh^{-1}) při výchozí výšce 100 m. n. m. může urazit vzdálenost větší než 3 300 m.

Disperse plžů pomocí hurikánů a tornád byl navrhnutá již Darwinem (Darwin 1859). Přestože o tomto jevu existuje řada záznamů (např. Kew 1893), a zmínek v literatuře (Rees 1965, Vagvolgyi 1975, Bohonak a Roderick 2001), pravděpodobně se nejedná o rozšířený ani ekologicky významnější vektor pasivní disperse.

Živočichové - Externí přenos

Jeden z nejdůležitějších vektorů disperse sladkovodních bezobratlých mezi různými povodími a izolovanými vodními tělesy představují ptáci (Santamaría a Klaassen 2002). Plži se na nich mohou šířit na různých částech těla, zejména na peří, nohách či zobácích (Figuerola a Green 2002). Ptáci jsou pravděpodobně jedním z nejdůležitějších vektorů umožňujícím dispersi na vzdálené lokality a dálkové výsadky. Již výše bylo zmíněno, že ptáci jsou pravděpodobně vektorem, díky kterému mohli plži osídlit i izolované mořské ostrovy (Gittenberg et al. 2009). Podobné výsadky zaznamenal také Okland (1990). Nalezl izolované populace druhů *Lymnaea (Stagnicola) palustris* a *Valvata piscinalis* v oblasti Jaeren a Lista, což jsou oblíbená odpočinková místa vodního ptactva jarního tahu.

Externí přenos sladkovodních plžů ovšem nemusí zajišťovat jen ptáci. Vektory disperse mohou být dokonce i jiní obratlovci a bezobratlí, konkrétně kupříkladu velké druhy hmyzu. Poměrně často zaznamenány případy disperse vodními plošticemi či brouky (množství těchto záznamů shrnul ve své práci Rees 1965). Spíše zajímavostí je pak záznam plovatky bahenní, přichycené na šídle zeleném (Roland et al. 20012, viz obr.).



Obr. 7 Juvenilní jedinec plovatky bahenní (*Lymnaea stagnalis*) přichycený na dorzální část zadečku samičky šídla zeleného (*Aeshna viridis*), která právě vzlétá po naklazení vajíček (převzato z Roland et al. 2012).

Živočichové - Interní přenos

Přenos pomocí živočichů je možný nejen na jejich tělech, ale též uvnitř jejich těl. Schopnost přežít průchod trávicím traktem ryb a ptáků byla prokázána u několika druhů plžů, a to jak předožábřích, tak plicnatých. Haynes et al. (1985) prokázali, že písečník novozélandský (*Potamopyrgus antipodarum*) přežije průchod trávicím traktem pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a dokonce je posléze schopen rozmnožování. Brown (2007) ve výkalech moluskovorních síhů *Coregonus pidschian* a *Coregonus nasus* našel stovky živých točenek *Valvata sincera* a jednu živou plovatku *Lymnaea atkaensis*. z výsledků těchto studií vyplývá, že průchod trávicím traktem přežívají ve větším množství plži předožábří. Mají totiž trvalé víčko, kterým mohou svou ulitu pevně uzavřít.

Bezobratlé a jejich vaječné snůšky často ptáci přijmou společně s jinou potravou. Malone (1965) experimentálně zjišťoval, kolik sladkovodních plžů druhů *Physa anatina* a *Helisoma trivolvis* a jejich vajíček přežije průchod zažívacím traktem kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) a kulíka zrzoocasého (*Charadrius vociferus*). Jen několika vaječným snůškám se podařilo projít neporušené, embrya v nich však nebyla schopna dalšího vývoje.

Člověk

V současné době se člověk nejrůznějšími formami podílí stále větší měrou na dispersi organismů, včetně organismů invazivních. Člověk je také činitelem, který umožňuje invazivním druhům překročit dokonce i bariéry kontinentů (Kappes a Haase 2012). Člověk může působit jako vektor mnoha různými způsoby, pro sladkovodní plže je ale obzvláště

významný přenos pomocí balastní vody, lodí (Kappes a Haase 2012). Významným pro plže pocházející z mokřadů může být přenos díky obchodu s vodními makrofyty (Beran 2006)

3.4.2 Schopnost disperse u vybraných modelových druhů levotočky bažinné a svinutce tenkého

Potenciální dispersní schopnosti a strategie u různých druhů sladkovodních měkkýšů shrnuli ve své práci Kappes a Haase (2012). Pro rody *Aplexa* a *Anisus* uvádí, že se šíří jednak aktivně ve vodním prostředí i pasivně pomocí vody, v nižší míře se u nich uplatňuje i pasivní disperse pomocí ptáků či bezobratlých. Stále pravděpodobnou, avšak neprozkoumanou možností je u těchto taxonů přenos pomocí savců či dalších suchozemských živočichů. Pro svinutce tenkého předpokládají Terrier et al. (2006) šíření makrofyty unášenými povodní.

Jak svinutec, tak levotočka obývají drobnější stojaté vody, které se v krajině vyskytují obvykle fragmentovaně a izolovaně. Na základě toho, že oba tyto druhy obývají lentické sladkovodní habitaty, můžeme usuzovat na to, že míra genetické diferenciacce jejich populací bude spíše nižší v porovnání s druhy žijícími v lotických habitatech, a tedy jejich dispersní potenciál bude vyšší (Marten et al. 2006).

Žádná studie, která by se zabývala levotočkou bažinnou a genetickou strukturou jejich populací či dispersí zatím, pokud je autorce práce známo, neproběhla. Potenciálem disperse u svinutce tenkého a jeho populační genetikou ve Velké Británii se zabývala Mensch (2009) a Niggebrugge et al (2007). Niggebrugge et al. (2007) porovnávali výskyt svinutce tenkého na pro něj vhodných lokalitách. Zjistili, že obsazenost vhodných habitů je poměrně nízká a tento druh dokonce ani neobsazuje všechny pro něj příhodné habitaty nejen mezi jednotlivými mokřady, ale i v rámci těchto mokřadů. Tuto skutečnost přisuzují limitované schopnosti disperse u tohoto druhu.

3.4.3 Molekulární markery používané pro studium populační genetiky a disperse

Základním rozhodnutím na počátku každé populačně-genetické studie je volba vhodného molekulárního markeru. Zásadním předpokladem pro takovýto molekulární marker je jeho selekční neutrálnost a mendelovská dědičnost (Selkoe a Toonen 2006). Takovýmito markery mohou být alozymy, mikrosatelity, AFLP, RAPD, SNP a mtDNA. Každý marker má své výhody

a nevýhody. Při zvažování, který z těchto markerů zvolit, je důležité se zaměřit na parametry, jakými jsou jeho variabilita, typ dědičnosti markeru či náklady na jeho použití.

Tab. 1 Přehled vybraných molekulárních markerů a jejich vlastností používaných v populační genetice (převzato z Freeland 2005 a Avise 2004, upraveno).

Marker	Dědičnost	Informační molekula	Variabilita	Náklady, včetně vývoje	Porovnatelnost dat z různých studií
AFLP	dominantní	DNA	střední	vysoké	omezená
alozymy	kodominantní	proteiny	střední	nízké	omezená
mikrosatelity	kodominantní	DNA	vysoká	vysoké	bez omezení
mtDNA	po mateřské linii	DNA	nízká	nízké	bez omezení
RAPD	dominantní	DNA	střední	nízké	omezená

Již téměř 20 let existuje metoda **ALFP** (Amplified fragment length polymorphism – polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů) (Vos et al. 1995). Základním principem této metody je rozštěpení DNA restrikčními enzymy. Na rozštěpené fragmenty se naváží ligandy, které zabrání jejich dalšímu štěpení. Tyto fragmenty se během tzv. preselektivní a selektivní amplifikace (tedy dvou po sobě následujících PCR) amplifikují a na elektroforéze se zobrazí jako specifické proužky (Meudt a Clarke 2007). Přesto, že se tato metoda původně používala téměř výhradně u rostlin, hub a bakterií, v současnosti se začíná stále více prosazovat i u živočichů (Bensch a Akesson 2005).

Poměrně dlouhou dobu jsou jako markery využívány **alozymy** (polymorfní enzymy). Tato metoda vznikla již v 60. letech (Avise 2004). Je založena na multilokusové proteinové elektroforéze, při které se rozdělí nedenateurované proteiny na gelu podle svého náboje. Poté jsou zviditelněny specifickými barvivy. Přestože jsou tyto markery levné, rychlé a jejich použití je jednoduché, mají celou řadu nevýhod (Bohonak 1999). Tyto nevýhody souvisí s tím, že se jedná o proteiny. Jednak se jedná o funkční proteiny – enzymy, nemusí být tedy selektivně neutrální a také se v jejich variabilitě projeví pouze nesynonymní mutace v daných kódujících genech (Freeland 2005).

Zřejmě nejpoužívanějšími primery v současné molekulární ekologii jsou **mikrosatelity**. Někdy se můžeme setkat i s jiným názvem, a to se zkratkou SRT, tedy „short tandem repeats“. Mikrosatelity, jak z anglického názvu vyplývá, jsou krátká tandemová opakování

jednoho až šesti nukleotidů, vyskytující se v rámci celého genomu (včetně chloroplastového a mitochondriálního) většiny organismů (Freeland et al. 2005). Délky těchto lokusů vzájemně liší, ale bývají v rozmezí od 5 do 40 opakování (Selkoe a Toonen 2006). Výhodou mikrosatelitů je jejich značná variabilita, umožňující např. i použití k určení příbuzenských vztahů mezi jedinci (Bensch a Akesson 2005). Jejich druhová specificita sice snižuje riziko kontaminace, ale zároveň zvyšuje náročnost např. v tom, že pro každý druh bývají designovány nové primery (Selkoe a Toonen 2006). Přesto se tento proces zrychluje a zlevňuje a tvorbu nových primerů pro mikrosatelitové lokusy dokonce nabízí i komerční firmy (Freeland 2005).

Dalším dlouho využívaným markerem jsou geny na mitochondriální DNA (**mtDNA**). Tyto markery byly a stále zůstávají velmi rozšířené (Ballard a Whitlock 2004). MtDNA vykazuje řadu unikátních vlastností, kterými se liší od DNA jaderné. MtDNA je kupříkladu selekčně neutrální, má vyšší mutační rychlost než je obvykle v jaderné DNA, neprobíhá v ní rekombinace a její dědičnost je uniparentální (Ballard a Whitlock 2004). Tyto vlastnosti ovšem neplatí zcela. Např. bylo zjištěno, že v mtDNA probíhá selekce (Ballard a Whitlock 2004). Proto by bylo vhodné kombinovat mtDNA s nějakým dalším typem markerů, např. geny z jaderné DNA.

Metoda Random amplified polymorphic DNA (**RAPD**) vznikla na začátku 90. let. Při ní se pomocí krátkých většinou 10 bp primerů libovolných sekvencí amplifikují náhodné úseky DNA (Awise 2004). Tyto úseky se poté zviditelní pomocí elektroforézy. Na gelu vytvoří specifické proužky, které se posléze analyzují. Dnes je tato metoda na ústupu. Její hlavní nevýhodou je nízká reprodukovatelnost, protože její výsledky bývají ovlivněny i malými změnami v laboratorních podmínkách (např. změnou dodavatele reagentů), a dále limitovaná možnost odhalení kontaminace (Freeland 2005)

4 Materiál a metodika

4.1 Odběr a zpracování vzorků

Sběr vzorků druhů *Aplexa hypnorum* a *Anisus vorticulus* probíhal mezi lety 2010 – 2013. Vzorky levotočky bažinné byly nasbírány na 31 lokalitách na území ČR. Svinutec tenký byl nasbíráán na devíti lokalitách v ČR, jedna lokalita pochází z Polska. Těchto devět lokalit z ČR jsou téměř všechny známé a stále existující lokality pro tento druh v ČR. Na sběru se kromě autorky práce Jany Bud'ové (JB) podílel Luboš Beran (LB; Správa CHKO Kokořínsko) a Dr. Ewa Jurkiewicz-Karnkowska (EK; Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach , Polsko). Seznam lokalit je uveden v příloze 3. Druh *Anisus vorticulus* je v ČR chráněn zákonem 114/92 Sb., bylo pro jeho sběr nutné vyřídít si výjimku ze zákona.

Pro vlastní sběr byl použit plastový nebo kovový kuchyňský cedník s průměrem ok cca 1 mm nebo byli plži sbíráni ručně z vegetace. Všichni nasbíraní jedinci byli ihned usmrceni a fixováni v lahvičkách 96% etanolem. Vzorky byly pro prodloužení životnosti několikrát opětovně prefixovány 96% etanolem a byly uskladněny při pokojové teplotě.

Na lokalitách s výskytem svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*) byly navíc měřeny vybrané fyzikální a chemické faktory: teplota vody (°C), konduktivita ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a pH pomocí přenosné sondy (Hanna Combo HI98129). Sonda byla při měření umístěna zhruba 0,1 m pod vodní hladinou. Pro měření bylo vybíráno konkrétní stanoviště, na kterém byli svinutci nalezeni. Hodnoty naměřené konduktivity sonda automaticky kompenzovala při dané teplotě.

4.2 Laboratorní zpracování vzorků a sekvenace

4.2.1 Izolace DNA

Pokud to bylo možné, byli z každé populace vybráni alespoň dva plži, z kterých byla izolována DNA pro molekulární analýzy. Pro izolaci byla použita tkáň svalnaté nohy o velikosti zhruba 1 až 2 mm³. K extrakci byl použit komerčně dodávaný kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Německo). Při extrakci bylo postupováno podle protokolu výrobce. Koncentrace DNA v izolátech byla poté kontrolně změřena na spektrofotometru ND – 1000 (NanoDrop®, Thermo Scientific). Izoláty byly uchovány v mikrozkuvkách v mrazničce při teplotě zhruba -20°C.

4.2.2 PCR (polymerázová řetězová reakce)

Pro molekulární analýzy byly vybrány následující geny: mitochondriální geny pro cytochrom c oxidázu podjednotku i COI, 16S a 12S (součásti mitochondriálního ribozomu) a dva jaderné

regiony: internal transcribed spacer 1 a 2 (ITS-1, ITS-2; součásti oblasti jaderné rDNA).

Amplifikace genů COI, 16S a 12S probíhala pomocí univerzálních primerů, pro amplifikaci ITS-1 a ITS-2 byly použity specifické primery pro plicnaté plže (viz tabulka 2).

Tab. 2: Sekvence použitých primerů

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Zdroj
COI	LCO1490	5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al. 1994
	HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	
ITS-1	18S	5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3'	Armbruster et al. 2000
	5.8S	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	
ITS-2	18SB	5'-TTCCGTAGTGAACCTGCGG-3'	Armbruster et al. 2000
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
12-S	J14197	5'-GTACAYCTACTACTATGTTAYAYTT-3'	Simon et al., 2006
	N14745	5'-GTGCCAGCAGYYGCGGTTANAC-3'	
16S	16Sar-L	5'-CGGCCGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Palumbi et al. 1991
	16Sbr-H	5'-GGAGCTCCGTTTGAACCTCAGATC-3'	

COI

Pro amplifikaci genu COI byl nejprve použit protokol podle Steinke et al. 2004 o celkovém objemu reakční směsi 35 µl (viz tabulka 3). Po úspěšné amplifikaci sekvencí několika PCR produktů, se však místo ohraničených proužků o velikosti dané sekvence genu (cca 650 bp) na gelu začaly objevovat pouze tzv. smeary, tedy jakési „šmouhy“, a to i v místě negativní kontroly. PCR byla několikrát zopakována se stejnými výsledky. Kvůli podezření na kontaminaci byly objednány nové primery a kompletně vyměněny používané chemikálie. Po dalších neúspěšných amplifikacích byla nahrazena i v laboratoři katedry ekologie vyráběná autoklávovaná a deionizovaná voda komerčně dodávanou vodou PCR Ultra H₂O (Top-Bio). Ani s touto úpravou a ani při použití jiného typu cycleru (GeneTouch™ TC1100 výrobce Bioer Technology) se již znovu nepodařilo sekvenci pro gen COI amplifikovat. Pokud se na gelu výjimečně objevil v rámci smearu i výraznější proužek v délce amplifikovaného fragmentu COI, byl osekvenován. Tyto sekvence ale obsahovaly více signálů a nebylo možné je manuálně opravit a tudíž ani použít v dalších analýzách. Ani použití jiného protokolu pro tvorbu reakční směsi (Zavoral 2010, Wethington a Dillon 2009) nevedlo v amplifikaci COI genu k úspěchu.

Pro amplifikaci obou regionů ITS-1 a ITS-2 byl použit stejný protokol pro tvorbu reakční směsi o celkovém objemu 25 µl podle Correa et al. (2010), pro gen 16S o celkovém objemu 20 µl podle Steinke et al (2004) a pro 12S o celkovém objemu 25 µl podle Mensch (2009), viz tabulka 4 a 5.

Tab. 3: Reakční směsi pro PCR pro gen COI

	COI (Steinke et al. 2004)		COI (Zavoral 2010)		COI (Wethington a Dillon 2009)	
	Množství	koncentrace	Množství	koncentrace	Množství	koncentrace
Reakční pufr	4 µl	1x	4 µl	1x	3 µl	1x
Taq polymerase	1,05 µl	1U	1,05 µl	1U	1,5 µl	1,5 U
25 mM MgCl ₂	4,4 µl	3 mM	4,4 µl	3mM	2,5 µl	2,5 mM
2 mM dNTP	3 µl	0.17 mM	3 µl	0.17mM	5 µl	0,4 mM
10 mM primer F	0,5 µl	0.13 µM	0,5 µl	0.13 µM	0,3 µl	0,1 µM
10mM primer R	0,5 µl	0.13 µM	0,5 µl	0.13 µM	0,3 µl	0,1 µM
DNA templát	50 ng	---	150 ng	---	50 – 500	---
H ₂ O deionizovaná, autoklávovaná	Zbytek do objemu 35 µl	---	Zbytek do objemu 35 µl	---	Zbytek do objemu 25 µl	---

Tab. 4: Reakční směsi pro PCR pro geny 16S, ITS-1 a ITS-2

	16 S (Steinke et al. 2004)		ITS-1 a ITS-2 (Correa et al. 2010)	
	Objem	koncentrace	Objem	koncentrace
Reakční pufr (Thermo Scientific), 10x	4 µl	1x	2 µl	1x
Taq polymerase (Thermo Scientific), 1U/µl	1,05 µl	1U	0,5 µl	0,5 mM
25 mM MgCl ₂ (Thermo Scientific)	4,4 µl	2,5 mM	2 µl	2,5 mM
2 mM dNTP (Thermo Scientific)	3 µl	0.2 mM	1 µl	0,1 mM
10 mM primer F	0,5 µl	0.4 µM	0,4 µl	0,2 µM
10mM primer R	0,5 µl	0.4 µM	0,4 µl	0,2 µM
DNA templát	50 ng	---	50 ng	---
H ₂ O deionizovaná, autoklávovaná	Zbytek do objemu 25 µl	---	Zbytek do objemu 25 µl	---

Tab. 5: Reakční směs pro PCR pro gen 12S (podle Mensch 2009)

	Objem	Koncentrace
Combi PPPMaster Mix	12,5 µl	1x
10 mM primer F	1,3 µl	0,5 µM
10mM primer R	1,3 µl	0,5 µM
DNA templát	50 ng	---
H ₂ O deionizovaná, autoklávovaná	9,5 µl	---

PCR reakce probíhala na přístroji iCycler Thermal Cycler od firmy BIO-RAD, od roku 2013 také na nově dodaném přístroji GeneTouch™ TC1100 (Bioer Technology). PCR reakce probíhaly podle následujících protokolů.

Protokol pro **COI (podle Steinke et al. 2004)**: počáteční denaturace při 94° C po dobu 2,5 min; 40 cyklů: denaturace při 90° C, 30 s, nasedání primerů (tzv. annealing) při 48° C 1 min a elongace při 72° C, 1 min; konečná elongace při 72° C, 10 min. Po skončení reakce byly produkty ochlazeny a uchovány při 10° C.

Protokol pro **16S**: počáteční denaturace při 90° C po dobu 2,5 min; 10 cyklů: denaturace při 92° C, 30 s, nasedání primerů (tzv. annealing) při 44° C 30 s a elongace při 72° C, 40 s; konečná elongace při 72° C, a dalších 36 cyklů: denaturace při 92° C, 30 s, nasedání primerů (tzv. annealing) při 48° C 40 s a elongace při 72° C, 40 s; konečná elongace při 72° C, 3 minuty. Po skončení reakce byly produkty ochlazeny a uchovány při 10° C.

Protokol pro **ITS-1 a ITS-2**: počáteční denaturace při 94° C po dobu 2 min; 30 cyklů: denaturace při 94° C, 30 s, nasedání primerů (tzv. annealing) při 50° C 30 s a elongace při 72° C, 30 s; konečná elongace při 72° C, 7 min. Po skončení reakce byly produkty ochlazeny a uchovány při 10° C.

Protokol pro **12S**: počáteční denaturace při 94° C po dobu 2 min; 30 cyklů: denaturace při 90° C, 30 s, nasedání primerů (tzv. annealing) při 48° C 1 min a elongace při 72° C, 1 min; konečná elongace při 72° C, 10 min. Po skončení reakce byly produkty ochlazeny a uchovány při 10° C.

4.2.3 Gelová elektroforéza

Pro ověření kvality PCR produktu byla provedena gelová elektroforéza. Do jamek 1,5% agarového gelu, ke kterému bylo přidán 1 µl fluorescenčního barviva GelRed™ (Biotium), byla pro každý vzorek napipetována směs 2 µl PCR produktu a 2 µl nanášecího pufru (DNA loading dye; Thermo Scientific). Jako standard pro srovnání sloužil standard 1 kb DNA Marker (0.2 µg/µl) od firmy Segenetic. Elektroforéza byla prováděna na horizontální elektroforéze při napětí 150 V, proudu 500 mA po dobu 30 minut. Výsledky byly zkontrolovány pod UV lampou a vyfotografovány.

4.2.4 Purifikace PCR produktů a příprava na sekvenaci

Sekvenace byla prováděna buď firmou Macrogen (Jižní Korea) nebo sekční Laboratoří sekvenace DNA PřF UK v Praze. PCR produkty, které byly poslány do Koreje, byly nejdříve doplněny vodou na požadovaný objem 30 μ l, a přepipetovány do mikrozkuvek.

Mikrozkuvky byly zabezpečeny proti otevření mikrofilmem a PCR produkty byly spolu s daným množstvím primeru expresně odeslány do Koreje přepravní společností.

PCR produkty poslané na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA byly před odesláním přečištěny pomocí octanové a etanolové purifikace. Při tomto postupu se PCR produkty naředily autoklávovanou a neionizovanou vodou na celkový objem 100 μ l. K této směsi byla poté přidána 1/10 objemu octanu sodného (10 μ l) a celá směs byla zvortexována. Poté se přidal dvojnásobek objemu vymraženého 99,9% etanolu (200 μ l) a vše se opět zvortexovalo. Vzorky byly následně centrifugovány 10 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (RPM). Protože se produkt (DNA) vysrážel u dna, byla většina kapaliny odsáta pipetou. Do mikrozkuvek se poté přidalo 100 μ l vymraženého 75% lihu. Obsah byl opět zvortexován a stočen na centrifuze při stejném nastavení. Poté byla přebytečná kapalina znovu odsáta a mikrozkuvky byly umístěny do digitální blokované lázně nastavené na 40°C. Vzorky byly sušeny minimálně dvě hodiny. Produkty purifikace byly posléze zředěny autoklávovanou a neionizovanou vodou na objem 20 μ l.

Před odesláním na sekvenaci bylo celkem 7,5 μ l jednotlivých produktů purifikace přepipetováno do stripů a k nim přidáno 0,5 μ l daného primeru o koncentraci 10 μ M.

4.2.5 Analýza DNA sekvencí

Získané sekvence byly nejprve ručně zkontrolovány a popřípadě editovány v programu BioEdit Sequence Alignment Editor, verze 7.0.9.0 (Hall 1999). V tomto programu byl také proveden alignment sekvencí pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al. 1994). Sekvence byly zkráceny na stejnou délku v online programu FaBox (Villesen (2007)). V tomto programu byl alignment převeden ze souboru ve formátu fasta (.fas) na formát (.phy), který je vhodný pro práci v programu Network ver. 4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd, UK). Tento program byl použit pro výpočet a zobrazení haplotypových sítí. Haplotypové sítě byly vypočítány metodou Median-joining MJ (Bandelt et al. 1999). Získané haplotypové sítě byly posléze zpracovány a upraveny v grafickém programu Inkscape (verze 0.48.4, www.inkscape.org).

Další výpočty byly provedeny v programu MEGA 5.05. (Tamura et al. 2011). Byl zde vypočítán odhad divergence (p-distance) pro oba modelové druhy, a to v rámci jednotlivých povodí i mezi povodími. Program MEGA byl také použit k výběru nejvhodnějšího modelu evoluce DNA. Za pomoci Bayesovského informačního kritéria byl jako nevhodnější model pro gen COI a oblast ITS-2 u levotočky bažinné zvolen model Hasegawa Kishino Yano (Hasegawa a kol. 1985) s diskretní Gamma distribucí, pro gen 16S u levotočky bažinné a svinutce tenkého a oblast ITS-1 u svinutce tenkého model Tamura-3-parametr (Tamura 1992) a pro oblast ITS-1 levotočky bažinné model Jukes- Cantor (Jukes a Cantor 1969).

Fylogenetické analýzy byly prováděny v programu MEGA 5.0.5 (Tamura et a. 2011) a PAUP 4.0b10 (Swofford 1998). V programu MEGA byl vytvořen fylogenetický strom metodou Maximum-likelihood, za použití modelu Hasegawa Kishino Yano (Hasegawa a kol. 1985) s diskretní Gamma distribucí, který program vybral jako nejvhodnější model evoluce DNA pro daná data. Pro konstrukci dendrogramu byla nastavena hodnota Bootstrap na 1000 opakování.

Pro statistické zhodnocení genetických rozdílů mezi povodími a skupinami v rámci povodí byl použit program ARLEQUIN 3.5.1. (Excoffier & Lischer 2010). Analýza molekulární variance (AMOVA) byla spočtena s defaultním nastavením programu (1000 permutací) a zvoleno bylo stanovení distance pomocí Kimura dvouparametrového modelu.

4.3 Analýza chemických a fyzikálních parametrů vodních těles s výskytem *Anisus vorticulus*

Statistická analýza chemických a fyzikálních parametrů byla prováděna v prostředí R. Vliv fyzikálních a chemických parametrů na přítomnost *A. vorticulus* byl testován pomocí Welch two sample t-testu (Welch 1947).

4.4 Fylogenetické analýzy levotoček evropské linie *Aplexa hypnorum* a americké linie *Aplexa elongata*

Fylogenetické analýzy byly prováděny v programu MEGA 5.0.5 (Tamura et a. 2011) a PAUP 4.0b10 (Swofford 1998). V programu MEGA byl vytvořen fylogenetický strom metodou Maximum-likelihood, za použití modelu Hasegawa Kishino Yano (Hasegawa a kol. 1985) s diskretní Gamma distribucí, který program vybral jako nejvhodnější model evoluce DNA pro daná data. Pro konstrukci dendrogramu byla nastavena hodnota Bootstrap na 1000 opakování.

5 Výsledky

5.1 Výsledky pro druh levotočka bažinná (*Aplexa hypnorum*)

5.1.1 Sběr materiálu

Celkem byly získány a zpracovány vzorky druhu *Aplexa hypnorum* z 31 lokalit na území ČR, a to během čtyř sezón mezi lety 2010 - 2013. Z těchto 31 lokalit byla pouze jedna v povodí Odry, pět v povodí Dunaje a 25 v povodí Labe.

Levotočka bažinná byla nalezena na několika různých habitatech, konkrétně v tůních, litorálech rybníků, mrtvých ramenech řek a odvodňovacích kanálech. Nejvíce nálezů pochází z tůní (22; 71 %), méně pak z rybníků, mrtvých ramen a odvodňovacích kanálů (vše po 3; 9,7 %).

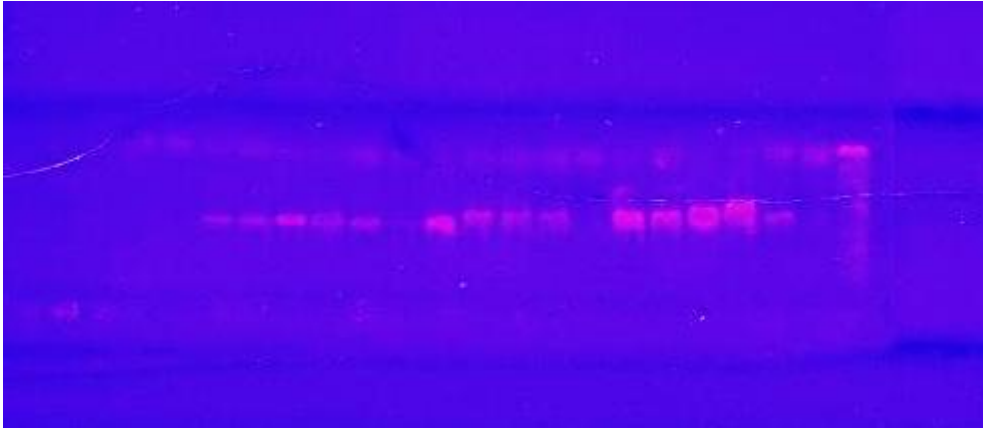
Tab. 6 Seznam lokalit sběru levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*). Sběr: LB – Luboš Beran, JB – Jana Bud'ová

Lokalita	GPS souřadnice		Datum	Sběr	Popis lokality	Povodí
	SŠ (N)	VD (E)				
Choryňský mokřad	49°31'08"	17°54'23"	13.6.2010	LB	Luční tůň	Bečva (Dunaj)
Tůň u Kotvice	49°41'44"	18°04'43"	8.5.2010	LB	luční tůň	Odra (Odra)
Kly	50°18'40"	14°29'30"	30.4.2010	LB	Luční tůň	Labe (Labe)
Zahrádky	50°38'15"	14°31'30"	11.5.2010	LB	Mokřad u Robečského potoka	Ploučnice (Labe)
Bažina u Azantu	48°49'28"	16°46'41"	2.5.2010	LB	Velká mělká tůň	Dyje (Dunaj)
Choťovice	50°08'33"	15°21'57"	5.5.2010	LB	Litorál Žehuňského rybníka	Labe (Labe)
Petrov	48°53'19"	17°16'46"	19.4.2010	JB	polní rozlita zarostlá ostřicemi	Morava (Dunaj)
Přerov01 + 02	49°28'22"	17°27'11"	21.4.2010	JB	systém tůní v lese(01) a luční rozlity(02)	Bečva (Dunaj)
Týniště	50°09'34"	16°03'18"	26.4.2010	JB	veliká rozlita na louce	Orlice (Labe)
Běleč	50°11'60"	15°56'05"	26.4.2010	JB	tůň na okraji lesa	Orlice (Labe)
Šnepov	50°10'34"	14°55'56"	30.4.2010	JB	větší zarostlá tůň v louce na kraji lesa, schovaná za keři	Labe (Labe)
Potěšil	49°04'25"	14°45'47"	17.5.2010	JB	močál za litorálem rybníka, zarostlé stromy	Lužnice (Labe)
Černičný rybník	49°04'45"	14°44'60"	23.5.2010	JB	břeh rybníka	Lužnice (Labe)
Choťanky	50°08'19"	15°8'57"	14.6.2011	JB	tůň u golfového hřiště	Labe (Labe)
Řečický rybník	49°25'55"	13°50'58"	8.5.2012	JB	litorál rybníka	Otava (Labe)
Kaprov (Tchořovice)	49°25'44"	13°49'21"	8.5.2012	JB	mokřad u cesty	Otava (Labe)
Radvanský rybník (Sloup v Čechách)	50°44'56"	14°35'26"	19.5.2012	JB	mokřad v lese za rybníkem	Ploučnice (Labe)

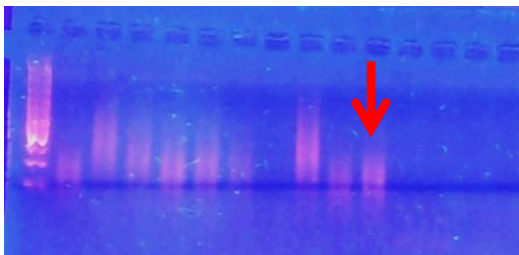
Velim	50°04'60"	15°6'40"	10.4.2011	LB	Tůň v NPP V Jezírkách	Labe (Labe)
Křtěný	49°04'58"	14°46'37"	20.5.2011	JB	mokřad v lese za rybníkem	Lužnice (Labe)
Nové Hodějovice	48°56'53"	14°29'18"	12.11.2011	LB	tůň v PP Tůně u Špačků	Malše (Labe)
Mimoň, Boreček	50°37'51"	14°13'01"	17.7.2012	LB	odstavné rameno a mokřad	Ploučnice (Labe)
Libice 01	50°07'04"	15°09'60"	18.5.2013	JB	rozlitina na louce	Labe (Labe)
Libice 02	50°07'11"	15°9'47"	18.5.2013	JB	litorál rozlehlejší tůně	Labe (Labe)
Libice 03	50°06'49"	15°09'29"	18.5.2013	JB	tůň v lese	Labe (Labe)
Libice 04	50°06'29"	15°10'26"	18.5.2013	JB	staré mrtvé rameno Labe	Labe (Labe)
Plzeň 01	49°45'17"	13°22'10"	4.5.2013	JB	odvodňovací kanál	Mže (Labe)
Plzeň 02	49°45'29"	13°22'05"	4.5.2013	JB	odvodňovací kanál	Mže (Labe)
Plzeň 04	49°45'28"	13°21'55"	4.5.2013	JB	odvodňovací kanál	Mže (Labe)
Řečany nad Labem	50°02'34"	15°28'01"	21.10.2012	LB	tůň SZ od Roudnice nad Labem	Labe (Labe)
Pastvisko	48°48'40"	16°47'52"	18.5.2013	LB	Luční tůň	Dyje (Dunaj)
Labětín	50°02'28"	15°29'26"	12.5.2013	LB	Staré rameno Labe	Labe (Labe)

5.1.2 Výsledky amplifikace DNA u genů COI, 16S, 12S a oblastí ITS-1 a ITS-2

Pro amplifikaci genu COI byl nejprve použit protokol podle Steinke et al. 2004 o celkovém objemu reakční směsi 35 µl. Po úspěšné amplifikaci sekvencí několika PCR produktů (obr. 8), se však místo ohraničených proužků o velikosti dané sekvence genu (cca 650 bp) na gelu začaly objevovat pouze tzv. smeary, tedy jakési „šmouhy“, a to i v místě negativní kontroly (obr. 9). PCR byla několikrát zopakována se stejnými výsledky. Kvůli podezření na kontaminaci byly objednány nové primery a kompletně vyměněny používané chemikálie. Po dalších neúspěšných amplifikacích byla nahrazena i v laboratoři katedry ekologie vyráběná autoklávaná a deionizovaná voda komerčně dodávanou vodou PCR Ultra H₂O (Top-Bio). Ani s touto úpravou a ani při použití jiného typu cycleru (GeneTouch™ TC1100 výrobce Bioer Technology) se již znovu nepodařilo sekvenci pro gen COI amplifikovat. Pokud se na gelu výjimečně objevil v rámci smearu i výraznější proužek v délce amplifikovaného fragmentu COI, byl osekvenován. Tyto sekvence ale obsahovaly více signálů a nebylo možné je manuálně opravit a tudíž ani použít v dalších analýzách. Ani použití jiného protokolu pro tvorbu reakční směsi (Zavoral 2010, Wethington a Dillon 2009) nevedlo v amplifikaci COI genu k úspěchu.



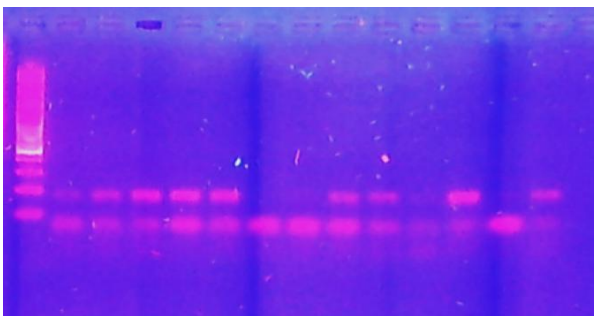
Obr. 8 Fotografie gelu při úspěšné amplifikace genu COI (8. 3. 2011) s původním protokolem podle Steinke et al. (2004)



Obr. 9 Obr. 9: Fotografie gelu po neúspěšné amplifikaci genu COI podle protokolu Steinke et al. (2004) 14.11:2012, na fotografii jsou vidět tzv. smeary, a to i v negativní kontrole (vyznačena šipkou).

5.1.3 Výsledky molekulárních analýz

Podle protokolu Mensch (2009) se bohužel podařilo amplifikovat jen velmi krátký fragment genu 12Scca 120 bp, viz obr.). Přestože tento gen vykazoval u druhu *Anisus vorticulus* vyšší variabilitu než gen COI (Mensch 2009), i obecně u měkkýšů je poměrně variabilní na tomto velmi krátkém fragmentu byl jen jeden polymorfní lokus. Takto krátký fragment však bylo obtížné kvůli jeho délce bez problémů osekvenovat. Získané sekvence tohoto genu nebyly do analýz zahrnuty.



Obr. 10 Fotografie gelu po amplifikaci genu pro 12S (delší fragment), kratším fragmentem jsou pravděpodobně zbytky primerů (12. 7. 2013).

COI

Z celkem 13 získaných sekvencí pro gen COI bylo do molekulárních analýz zahrnuto 10 sekvencí, plus dvě další sekvence získané z Genebank pocházející z Německa. Sekvence byly vzhledem k délce sekvencí z Genbank zkráceny na stejnou délku 571 nukleotidů (původní sekvence byly o délce 602 bází). Jako outgroup byla použita sekvence americké levotočky linie *Aplexa elongata* získaná z Genebank (EU038377.1).

Těchto 12 sekvencí bylo tvořeno deseti různými haplotypy. Rozdíly v sekvencích mezi těmito haplotypy byly v rozmezí od 0,18 do 4,86 %. Nejvíce se lišily haplotypy COIAH4 a COIAH1, nejméně pak haplotypy COIAH7 a COIAH9. Průměrná divergence činila 2,13 %.

Tab. 7. Odhad divergencí v sekvencích genu pro COI mezi jednotlivými haplotypy levotočky bažinné (*p*-distance, K2P)

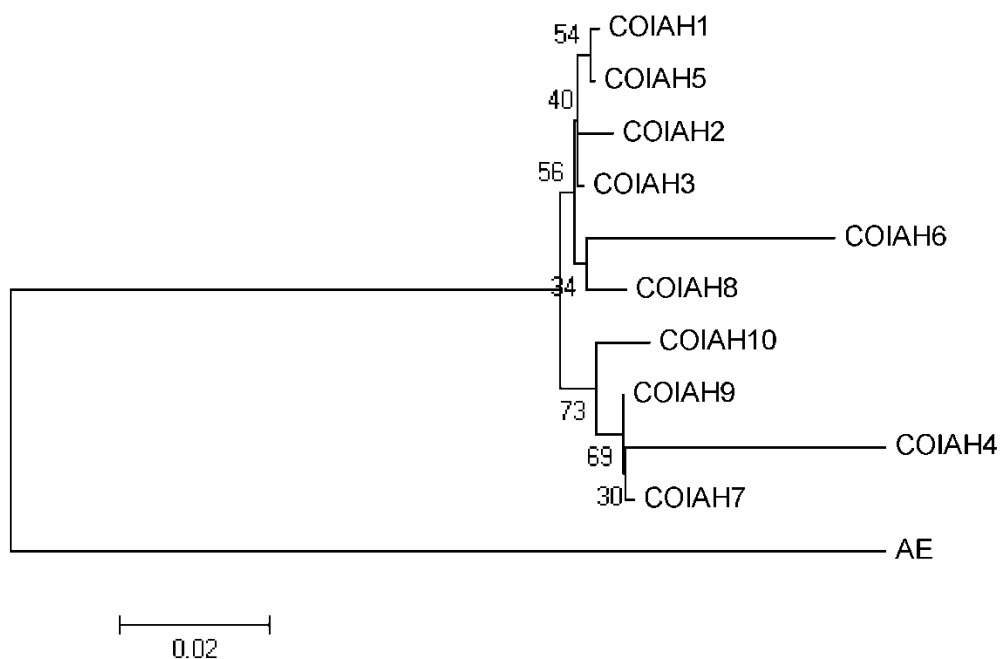
	COIAH1	COIAH2	COIAH3	COIAH4	COIAH5	COIAH6	COIAH7	COIAH8	COIAH9	COIAH10
COIAH1		0,0053	0,0035	0,0486	0,0018	0,0388	0,0144	0,0107	0,0126	0,0163
COIAH2	0,0053		0,0053	0,0465	0,0071	0,0407	0,0162	0,0125	0,0144	0,0181
COIAH3	0,0035	0,0053		0,0486	0,0018	0,0349	0,0144	0,0071	0,0126	0,0163
COIAH4	0,0486	0,0465	0,0486		0,0506	0,0839	0,0367	0,0507	0,0348	0,0466
COIAH5	0,0018	0,0071	0,0018	0,0506		0,0368	0,0163	0,0089	0,0144	0,0181
COIAH6	0,0388	0,0407	0,0349	0,0839	0,0368		0,0467	0,0387	0,0447	0,0488
COIAH7	0,0144	0,0162	0,0144	0,0367	0,0163	0,0467		0,0181	0,0018	0,0126
COIAH8	0,0107	0,0125	0,0071	0,0507	0,0089	0,0387	0,0181		0,0162	0,0200
COIAH9	0,0126	0,0144	0,0126	0,0348	0,0144	0,0447	0,0018	0,0162		0,0107
COIAH10	0,0163	0,0181	0,0163	0,0466	0,0181	0,0488	0,0126	0,0200	0,0107	

Tab. 8. Odhad divergencí v sekvencích genu pro COI mezi levotočkami z různých povodí (*p*-distance, K2P)

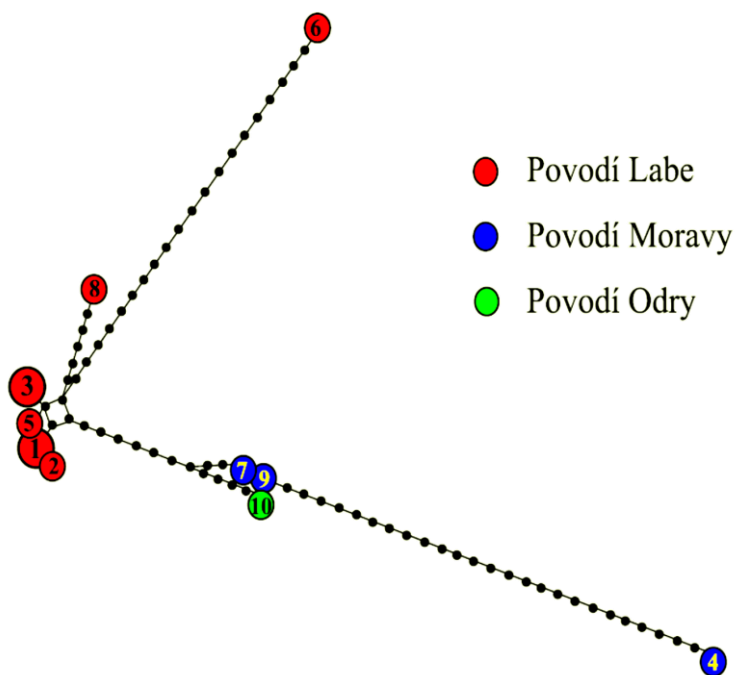
Labe	Morava	Odra	<i>Aplexa elongata</i>
Morava		0,0176	0,0110
Odra	0,0226		0,1652
<i>Aplexa elongata</i>	0,1439	0,1599	

Tab. 9: Odhad divergencí v sekvencích genu pro COI uvnitř skupin levotoček z jednotlivých povodí (*p*-distance, K2P). V povodí Odra tato hodnota nemohla být určena.

Labe	Morava	Odra
0,0126	0,0347	n/c



Obr. 10: Fylogenetický strom pro gen COI vytvořený metodou maximum likelihood.



Obr. 11: Haplotypová síť pro gen COI. Haplotypy jsou vyznačeny barvou povodí, z kterého pochází (viz legenda).

Analýza molekulární variance (AMOVA) rozdělila variabilitu daných sekvencí mezi hlavními povodími a uvnitř těchto povodí. Poměrně velká část variability v datech je vysvětlitelná rozdíly mezi povodími (44,24 % variability).

Komponenty variability	Stupně volnosti	% vysvětlené variability
------------------------	-----------------	--------------------------

Mezi hlavními povodími	2	44,24
V rámci povodí	9	55,76
Celkem	11	100
FST	p-hodnota	
0,4424	0.02053+-0.00453	

16S

Z celkem 21 získaných sekvencí pro gen 16S bylo do molekulárních analýz zahrnuto 18 sekvencí, a také jedna další sekvence získané z Genebank (AY577464.1), pocházející z Německa. Sekvence byly zkráceny na stejnou délku 279 nukleotidů, protože některé sekvence se nepodařilo osekvenovat po celé délce fragmentu (cca 500 bp). Jako outgroup byla použita sekvence americké levotočky linie *Aplexa elongata* získaná z Genebank (EU038377.1).

Devatenáct použitých sekvencí se rozdělilo na 9 haplotypů. Dva z těchto haplotypů byly velmi časté (16SAH2 a 16SAH3), dalších 7 haplotypů se vyskytovaly pouze u jednotlivých jedinců. Průměrná divergence mezi haplotypy byla 0,59 %.

Tab. 10: Odhad divergencí v sekvencích genu 16S mezi jednotlivými haplotypy levotoček (*p-distance*, K2P).

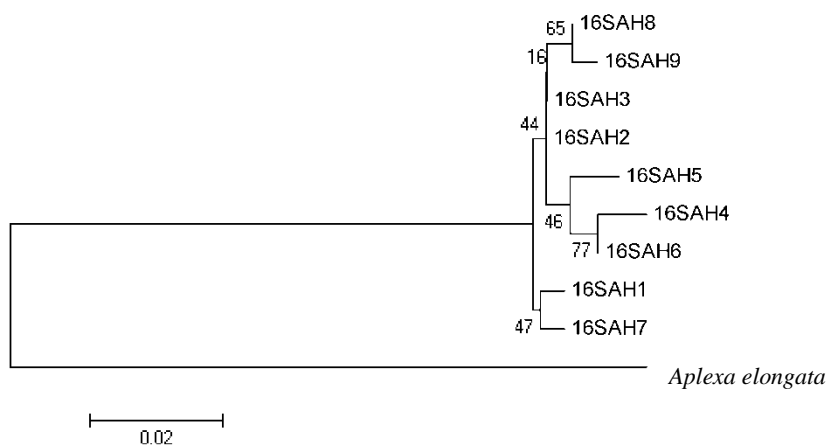
	16SAH1	16SAH2	16SAH3	16SAH4	16SAH5	16SAH6	16SAH7	16SAH8	16SAH9
16SAH1		0,0073	0,0073	0,0225	0,0185	0,0149	0,0073	0,0110	0,0148
16SAH2	0,0073		0,0000	0,0148	0,0110	0,0073	0,0073	0,0036	0,0073
16SAH3	0,0073	0,0000		0,0148	0,0110	0,0073	0,0073	0,0036	0,0073
16SAH4	0,0225	0,0148	0,0148		0,0185	0,0073	0,0224	0,0185	0,0224
16SAH5	0,0185	0,0110	0,0110	0,0185		0,0110	0,0110	0,0147	0,0185
16SAH6	0,0149	0,0073	0,0073	0,0073	0,0110		0,0148	0,0110	0,0148
16SAH7	0,0073	0,0073	0,0073	0,0224	0,0110	0,0148		0,0110	0,0147
16SAH8	0,0110	0,0036	0,0036	0,0185	0,0147	0,0110	0,0110		0,0036
16SAH9	0,0148	0,0073	0,0073	0,0224	0,0185	0,0148	0,0147	0,0036	

Tab. 11: Odhad divergencí v sekvencích genu 16S mezi skupinami levotoček z různých povodí (*p-distance*, K2P).

	Labe	Morava
Labe		0,0013
Morava	0,0013	
<i>Aplexa elongata</i>	0,1985	0,1969

Tab. 12: Odhad divergencí v sekvencích genu 16S uvnitř skupin levotoček v jednotlivých povodích (*p-distance*, K2P).

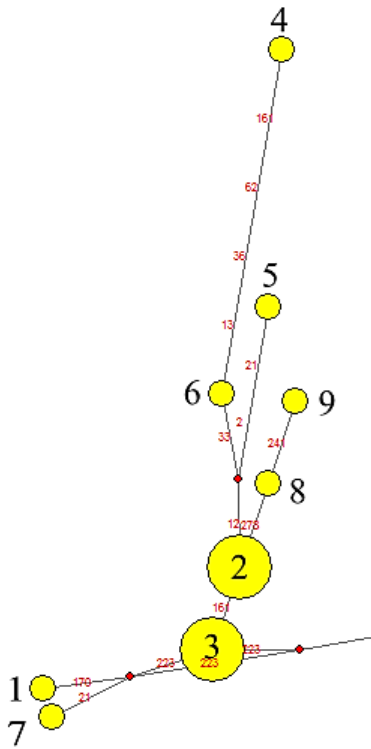
Labe	Morava
0,0052	0,0073



Obr. 12: Fylogenetický strom pro gen 16S vytvořený metodou Maximum Likelihood.

Analýza molekulární variance rozdělila variabilitu daných sekvencí mezi hlavními povodími a uvnitř těchto povodí. Jak je z tabulky patrné, největší variabilita představuje variabilita v rámci povodí. Variabilitou mezi povodími je vysvětlitelných pouze 13,88 % variability.

Komponenty variability	Stupně volnosti	% vysvětlené variability
Mezi hlavními povodími	1	13,88
V rámci povodí	17	86,12
Celkem	18	100
FST	p-hodnota	
0.13877	0.12805+-0.01049	



Obr 13. Haplotypová síť pro gen 16S

ITS-1

Z celkového počtu 28 osekvenovaných levotoček pro gen ITS-1 bylo získáno celkem 21 sekvencí, které byly použity pro další analýzy. Ze získaných sekvencí byl utvořen alignment o celkové délce 446 bp. Tyto sekvence náležely k pěti různým typům sekvencí.

Průměrná divergence mezi typy sekvencí činila 0,21 %.

Tab. 13. Odhad divergencí mezi jednotlivými typy sekvencí regionu ITS-1 levotočky bažinné (*p*-distance, K2P).

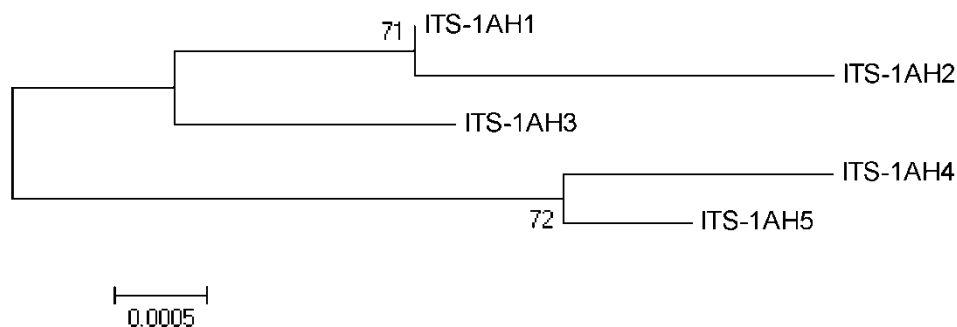
	ITS-1AH1	ITS-1AH2	ITS-1AH3	ITS-1AH4	ITS-1AH5
ITS-1AH1		0,0022	0,0022	0,0068	0,0045
ITS-1AH2	0,0022		0,0045	0,0091	0,0068
ITS-1AH3	0,0022	0,0045		0,0045	0,0068
ITS-1AH4	0,0068	0,0091	0,0045		0,0022
ITS-1AH5	0,0045	0,0068	0,0068	0,0022	

Tab. 14. Odhad divergencí mezi jednotlivými typy sekvencí regionu ITS-1 levotočky bažinné (*p*-distance, K2P).

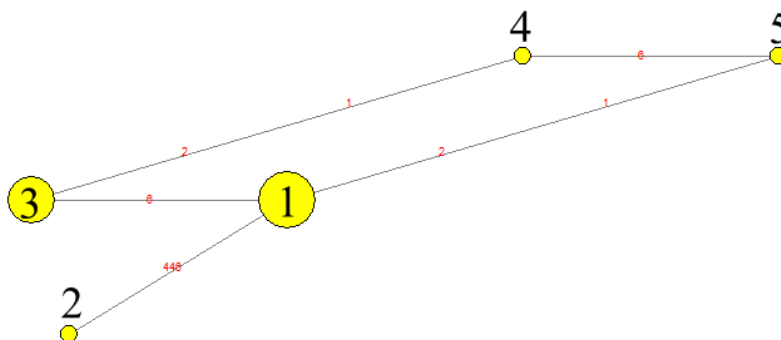
Labe	Morava	Odra
0,001	0,0041	0,0015

Tab. 15. Odhad divergencí v sekvencích regionu ITS-1 mezi levotočky bažinnými z jednotlivých povodí (*p*-distance, K2P).

	Labe	Morava	Odra
Labe		0,0001	0,0001
Morava	0,0001		0,0000
Odra	0,0001	0,0000	



Obr. 14. Fylogenetický strom pěti typů sekvencí oblasti ITS-1 levotočky bažinné vytvořený metodou Maximum Likelihood.



Obr. 15 Síť jednotlivých typů sekvencí oblasti ITS-1.

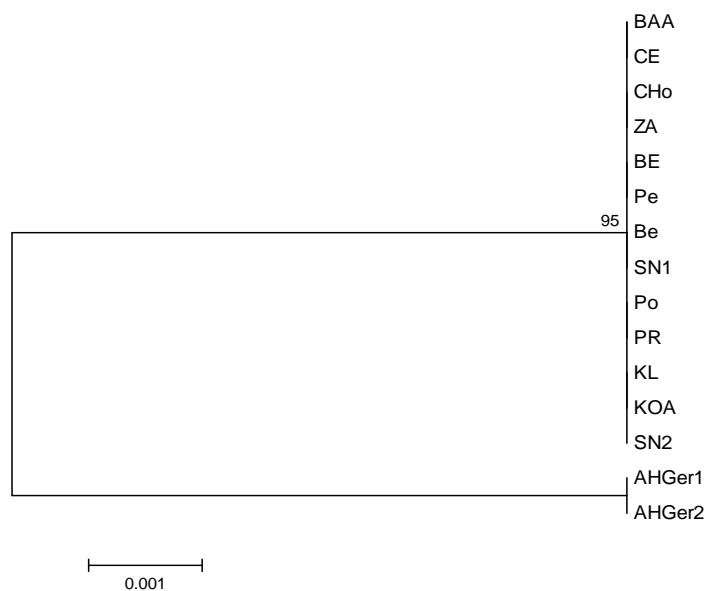
ITS-2

Z celkem 19 získaných sekvencí pro oblast ITS-2 bylo do molekulárních analýz zahrnuto 12 sekvencí, další dvě sekvence z Německa pocházejí z Genebank (viz příloha). Sekvence, které se při sekvenaci nepodařilo přečíst a nebylo možné je podle chromatogramu rekonstruovat, nebyly do analýz zahrnuty. Alignment byl vytvořen pro úsek délky 453 bp.

Region ITS-2 se ukázal jako velmi málo variabilní. Všechny sekvence z ČR patřily k jednomu typu sekvence (ITS-2AH1), obě německé sekvence k jinému typu (ITS-2AH2). i těmito dvěma typy sekvencí byla jen malá divergence (1,09 %). Pro skupinu pouze dvou různých sekvencí bohužel není možné v programu Network vytvořit haplotypovou síť.

Tab. 16. Odhad divergencí sekvencí levotoček mezi typy sekvencí oblasti ITS-2 (*p*-distance, *K2P*).

	ITS2AH2
ITS2AH1	0,0109



Obr. 16: Fylogenetický strom pro alignment regionu ITS-2 vytvořený metodou Maximum-likelihood.

5.2 Výsledky pro druh svinutec tenký (*Anisus vorticulus*)

5.2.1 Odběr vzorků

Celkem bylo v rámci monitoringu druhu *Anisus vorticulus* navštíveno devět lokalit s potvrzeným výskytem tohoto druhu. Bohužel na jedné lokalitě – Bažina u Azantu – se tento druh nepodařilo opětovně najít a svinutec na této lokalitě pravděpodobně vyhynul. Jedna další lokalita pochází z Polska z nivy řeky Liwiec.

Tab. 17 Seznam lokalit sběru svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*)

Lokalita	GPS souřadnice		Datum	Povodí	Sběr
	SŠ (N)	VD (E)			
Písečný rybník u Milotic	48°57'37"	17°09'02"	25.8.2012	Morava (Dunaj)	JB, LB
Bohdanečský rybník	50°05'45"	15°40'51"	9.9.2012	Labe (Labe)	JB, LB
PR Plané Loučky	49°37'22"	17°13'56"	16.6.2012	Morava (Dunaj)	JB, LB
Stibůrkovská jezírka	48°44'52"	17°00'02"	4.5.2013	Morava (Dunaj)	LB
Pastvisko	48°48'36"	16°47'56"	18.5.2013	Dyje (Dunaj)	LB
Kopičácký rybník	50°02'28"	15°29'26"	12.5.2013	Labe (Labe)	LB
Tůn u Kotvice	49°42'18"	18°4'42"	15.4.2013	Odra (Odra)	JB, LB
Týn nad Bečvou	49°31'36"	17°38'34"	13.7.2013	Bečva (Dunaj)	JB, LB
Liwiec	52°35'56''	21°33'23''	23.4.2013	Liwiec (Wisla)	EK

5.2.2 Molekulární analýzy druhu *Anisus vorticulus*

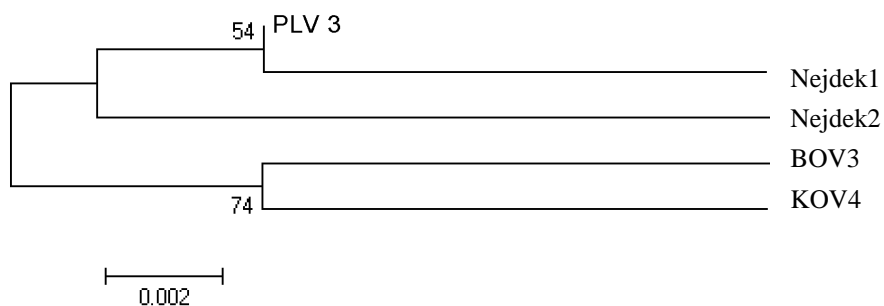
Problematiku samotné amplifikace sekvencí shrnuje kapitola 5.1.2.

16S

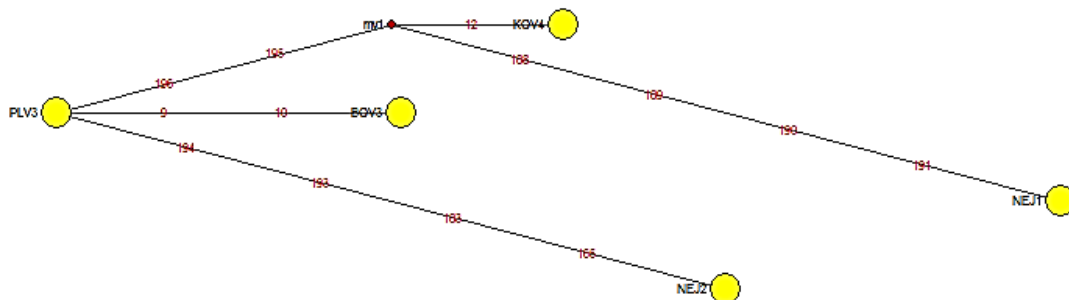
Z jedenácti sekvencí genu 16S bylo možné do analýz zaradit pouze tři, protože ostatní sekvence nebyly kvalitní. K sekvencím byl přidány navíc sekvence pro tento druh získané během diplomové práce Tomáše Zavorala (Zavoral 2009 – Nejdek 1 a Nejdek 2. Každá sekvence tvořila jiný haplotyp. Průměrná divergence mezi haplotypy byla 0,98 %.

Tab. 18. Odhad divergencí haplotypů genu 16S u svinutce tenkého (*p*-distance, *K2P*).

	BOV3	PLV3	KOV4	Nejdek1	Nejdek2
BOV3		0,0173	0,0173	0,0263	0,0262
PLV3	0,0173		0,0173	0,0144	0,0085
KOV4	0,0173	0,0173		0,0263	0,0203
Nejdek1	0,0263	0,0144	0,0263		0,0232
Nejdek2	0,0262	0,0085	0,0203	0,0232	



Obr. 17 Fylogenetický strom pro gen 16S u druhu *Anisus vorticulus* vytvořený metodou Maximum Likelihood.



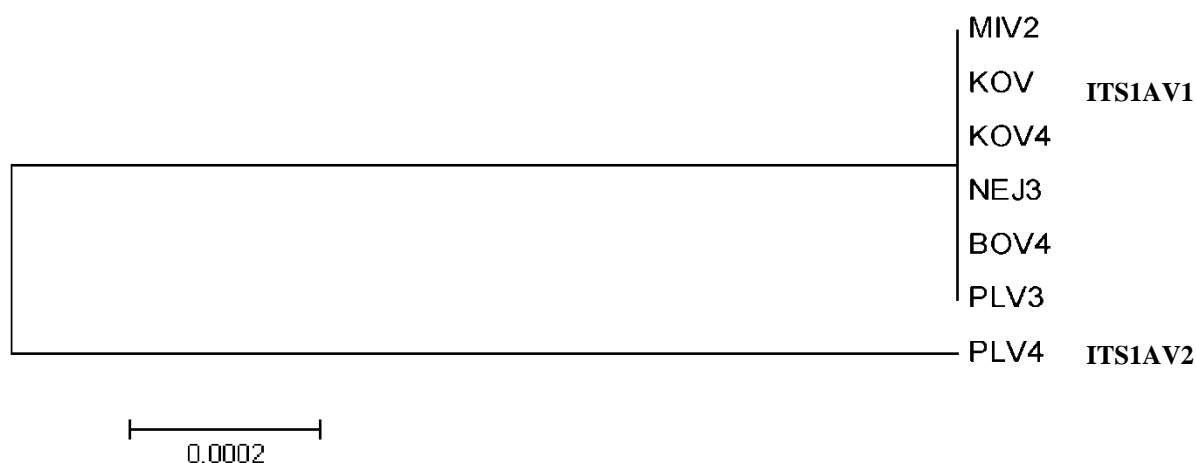
Obr. 18 Haplotypová síť pro gen 16S u svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*).

ITS-1

Vzhledem k potížím s amplifikací regionu ITS-1 u svinutce tenkého kvůli nezáměrné amplifikaci sekvencí jeho parazitů (viz dále), bylo získáno 7 sekvencí pro oblast ITS-1. Tyto sekvence se rozdělily na dva typy. Šest sekvencí mělo typ ITS1AV1 a jedna sekvence pocházející z Planých Louček měla jiný typ – ITS1AV2. Mezi těmito dvěma typy byla divergence jen v jednom lokusu (372), míra divergence činila 0,6 %. Pro skupinu pouze dvou různých sekvencí bohužel není možné v programu Network vytvořit haplotypovou síť.

Tab. 19: Odhad divergencí sekvencí svinutců mezi typy sekvencí oblasti ITS-1 (*p*-distance, *K2P*).

	ITS1AV2
ITS1AV1	0,002



Obr. 19: Fylogenetický strom pro alignment regionu ITS-1 vytvořený metodou Maximum-likelihood.

5.2.3 Nezáměrná amplifikace DNA parazitů svinutce tenkého

Kromě samotného druhu *Anisus vorticulus* bylo při stejném postupu získány 3 sekvence genu ITS-1, které byly identifikovány jako sekvence motolic. Sekvence pocházející z Písečného rybníka u Milotic byla pomocí programu BLAST (Altschul et al. 1990) určena jako *Echinoderma friedi*, a dále sekvence podobné ze zhruba 80 % sekvencím druhů motolic *Plagiorchis koreanus* a *Plagiorchis muelleri*.

Tab. 20: Určení nezáměrně amplifikovaných sekvencí motolic

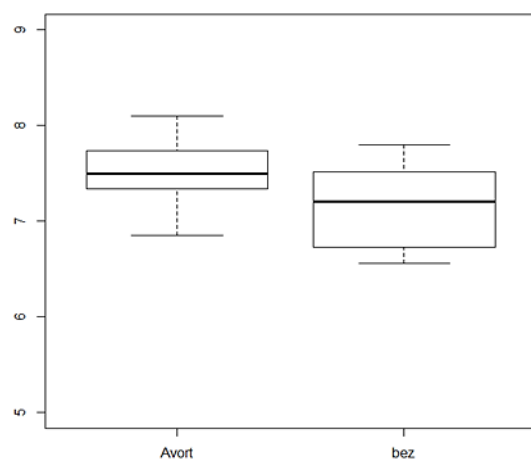
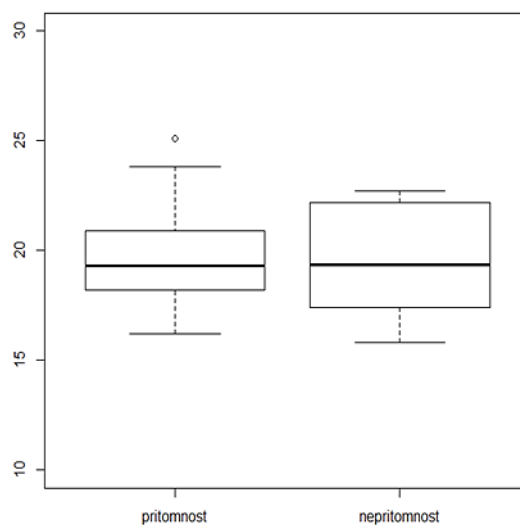
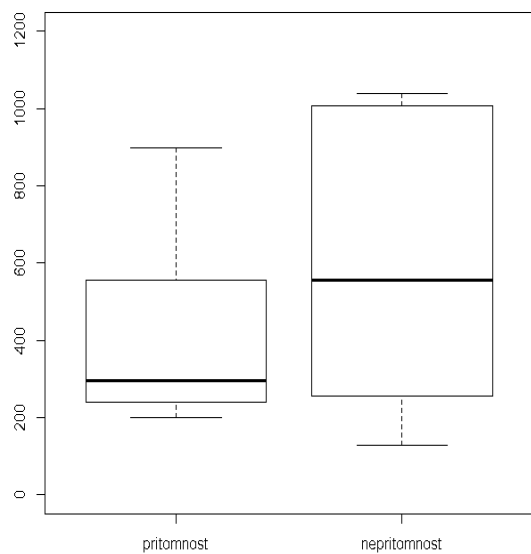
Lokalita (izolát)	Pokryvnost	Shoda	Druh	Označení Genbank
Písečný rybník u	47%	100%	<i>Echinostoma friedi</i>	AJ564383.1
Plané Loučky	54%	82%	<i>Plagiorchis koreanus</i>	JF784194.1
Bohdanečský rybník	56%	85%	<i>Plagiorchis muelleri</i>	AF151948.1

5.3 Chemické a fyzikální parametry nádrží s výskytem *Anisus vorticulus*

Během let 2012 a 2013 probíhalo měření několika fyzikálních a chemických parametrů vody na lokalitách s výskytem svinutce tenkého. Měřené parametry byly: teplota vody (°C), pH a konduktivita ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Měření proběhlo na pěti z devíti navštívených lokalit daného druhu. Měření proběhla celkem na 23 tůních či jiných vodních tělesech. Z toho se na 15 místech (65,2%) svinutec vyskytoval a na 8 (38,2%) nikoliv. Kompletní výsledky jsou zaznamenány v příloze 3. Hodnoty pH a konduktivity naměřené na lokalitách s výskytem druhu *Anisus vorticulus* odpovídaly rozmezím těchto hodnot uváděným v odborné literatuře (Terrier et al. 2006, Gloer a Groh 2005, Ubaeva a Hural 2008).

Tab. 21: Porovnání naměřených hodnot fyzikálních a chemických parametrů

	Přítomnost			Nepřítomnost		
	Teplota (°C)	konduktivita	pH	Teplota (°C)	konduktivita	pH
Min	16,2	201	6,85	15,8	130	6,56
1. kvartil	18,2	241	7,34	17,45	262,25	6,75
Median	19,3	295	7,5	19,35	556	7,21
3. kvartil	20,9	556	7,74	22,15	1004,5	7,48
Max	25,1	897	8,1	22,7	1040	7,8



Obr. 20: Grafické znázornění naměřených fyzikálních a chemických parametrů.

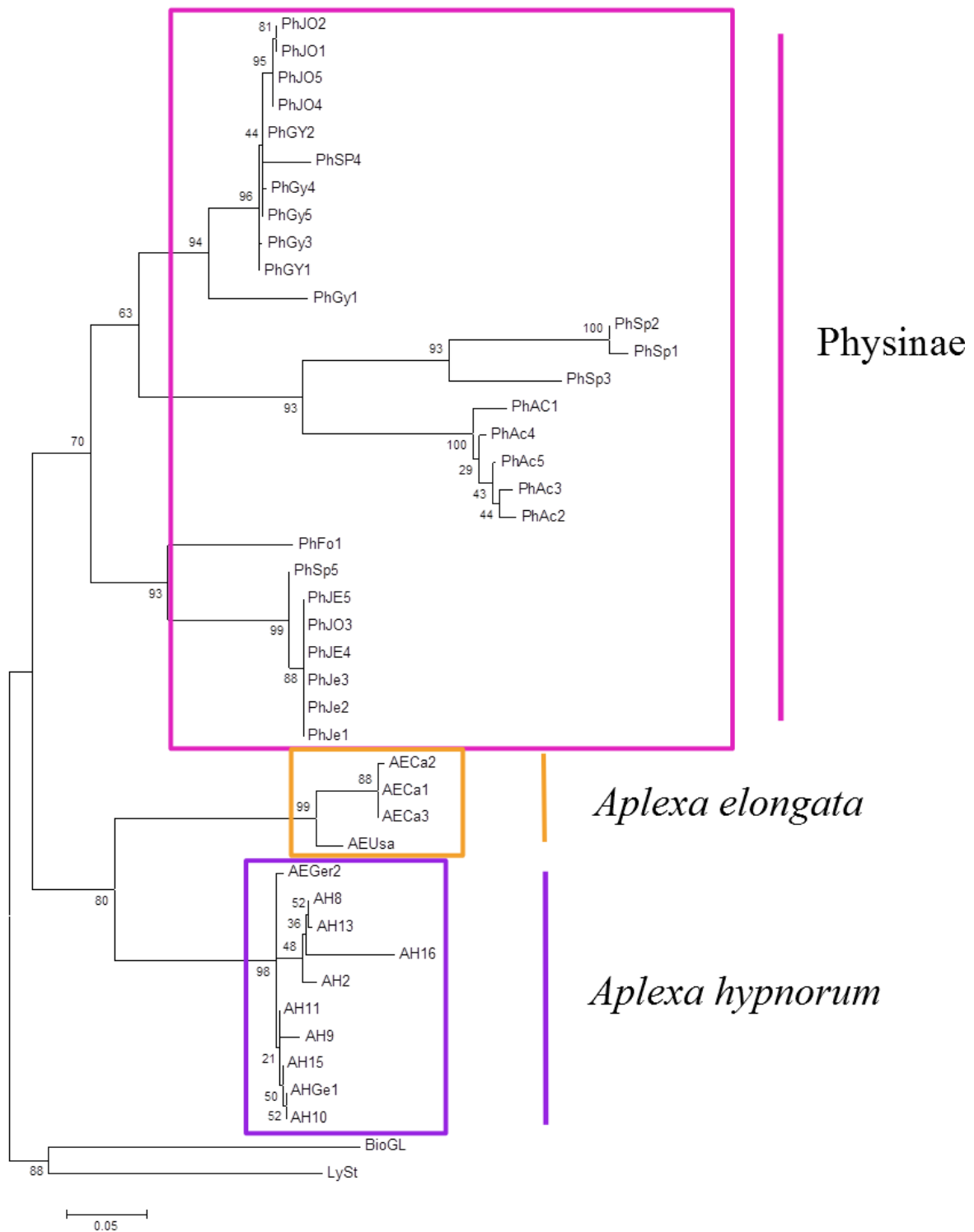
Vliv fyzikálních a chemických parametrů na přítomnost *A. vorticulus* byl testován pomocí Welch two sample t-testu (Welch 1947) v prostředí R. Žádný z parametrů neovlivňoval přítomnost daného druhu signifikantně (viz tab. 20).

Tab. 22: *P-hodnoty vlivu daných fyzikálních a chemických faktorů na přítomnost druhu Anisus vorticulus*

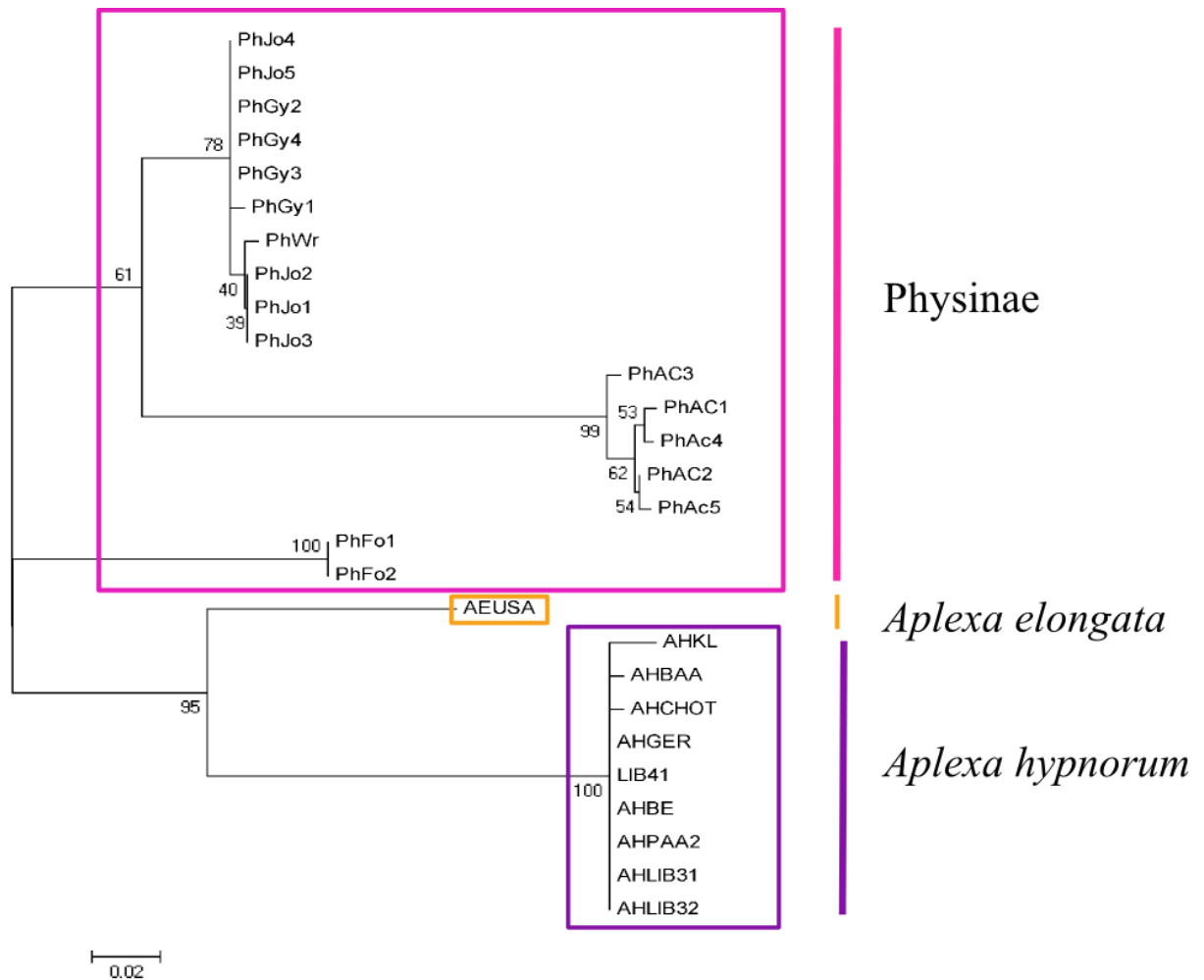
Parametr	p- hodnota
Teplota	0,7845
Konduktivita	0,3048
pH	0,0911

5.4 **Fylogenetická analýza levotoček linie *Aplexa hypnorum* a *Aplexa elongata***

Při fylogenetické analýze bylo použito genu COI. Celkem do ní bylo zařazeno 8 haplotypů levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*) získaných v rámci této diplomové práce, dále 2 sekvence levotočky bažinné z Německa získané z Genbank a čtyři sekvence levotočky určené jako *Aplexa elongata* z USA a Kanady, též z Genbank. Pro porovnání fylogenetických vztahů těchto dvou linií byly do analýzy též zahrnuty další druhy čeledi Physidae. Jako outgroup byly použity sekvence plžů z čeledi Planorbidae (*Biomphalaria glabrata*, Say, 1818) a Lymnaeidae (*Lymnaea stagnalis*, Linnaeus, 1758).



Obr. 21: Fylogenetický strom pro gen COI, znázorňuje fylogenetické vztahy mezi evropskými a americkými levotočkami a dalšími příslušníky čeledi Physidae (ve stromu uvedeny pod zkratkami z prvních dvou písmen latinského názvu rodu a druhu). Strom byl vytvořen metodou Maximum-likelihood.



Obr. 22: Fylogenetický strom pro gen 16S, znázorňuje fylogenetické vztahy mezi evropskými a americkými levotočkami a dalšími příslušníky čeledi Physidae (ve stromu uvedeny pod zkratkami z prvních dvou písmen latinského názvu rodu a druhu). Strom byl vytvořen metodou Maximum-likelihood.

Tab. 23: Odhad divergencí (*p*-distance) v sekvencích genu pro COI mezi levotočkami linie *Aplexa hypnorum* a *Aplexa elongata* (*K2P*, Kimura-2-parametr distance)

Druh 1	Druh 2	p- distance
<i>Aplexa elongata</i>	<i>Aplexa hypnorum</i>	0,1441

Tab. 24: Odhad divergencí (*p*-distance) v sekvencích genu pro COI uvnitř linií levotoček *Aplexa hypnorum* a *Aplexa elongata* (*K2P*, Kimura-2-parametr distance)

<i>Aplexa elongata</i>	<i>Aplexa hypnorum</i>
0,0277	0,0267

6 Diskuse

6.1 Sběr materiálu druhu *Aplexa hypnorum*

Přestože byly vzorky sbírány po čtyři odběrové sezóny (mezi lety 2010 až 2013) bylo odebráno jen 31 vzorků. Zejména z oblasti povodí Moravy byly odebrány vzorky pouze z pěti lokalit a z povodí Odry pouze z jedné lokality. To však není důsledkem nízkého počtu navštívených lokalit, neboť zde bylo navštíveno během odběrových sezon více než 50 lokalit. V oblasti Moravy je výskyt levotočky bažinné totiž více na ústupu, a proto je také v této oblasti řazena v Červeném seznamu ohrožených druhů ČR dokonce do kategorie VU – vulnerable, na rozdíl od Čech (NT – near threatened) (Beran, Juříčková a Horsák 2005).

Další příčinou nízkého počtu odebraných vzorků je, že roky 2012 a zejména 2011 byly v jarním období srážkově podprůměrné (ČHMÚ, online). Nízké množství srážek v jarním období způsobuje, že periodické tůň velmi rychle vyschnou (Brown a Jung 2005).

6.2 Izolace a amplifikace DNA sladkovodních plžů

Z 88 izolátů levotočky bažinné a 27 izolátů svinutce tenkého bylo získáno pouhých 61 použitelných sekvencí pro levotočku, respektive 10 svinutce (viz tabulka). Úspěšnost při sekvenaci byla tedy nejnižší pro gen COI (11,36 %, respektive 0 %) a nejvyšší u oblasti ITS-1 (23,86 %, respektive 24,13 %), a to i přes problémy s amplifikací tohoto regionu u svinutce tenkého. Toto nízké číslo je pravděpodobně důsledkem toho, že extrakce DNA plžů je poměrně problematická (Terret et al. 1994). Příčinou tohoto problému je inhibice DNA polymerázy mukopolysacharidy nacházejícími se v plžím slizu (Wade a Mordan 2000, Palumbi et al 1991). Přesto je izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit pravděpodobně nejefektivnějším způsobem DNA extrakce tkáně plžů (Skujienė a Soroka 2003). Přesto je dosažená úspěšnost sekvenace zhruba poloviční ve srovnání s daty Skujienė a Soroka (2003).

Tab. 25: Úspěšnost amplifikace jednotlivých genetických markerů

Sekvenovaný úsek	<i>Aplexa hypnorum</i>	Úspěšnost	<i>Anisus vorticulus</i>	Úspěšnost
COI	10	11,36 %	0	0 %
16S	18	20,45 %	3	10,34 %
ITS-1	21	23,86 %	7	24,13 %
ITS-2	19	21,59 %	0	0 %

Příčinou nízké úspěšnosti při sekvenaci může být použití univerzálních, tedy nespecifických primerů. Dalším vhodným postupem pro zvýšení úspěšnosti by tedy mohl být návrh nových,

Výskyt motolic u druhu *Anisus vorticulus*

Motolice (Trematoda), jsou parazité, jejichž prvním, případně i druhým mezihostitelem, bývá zpravidla vodní plž. Životní cyklus těchto parazitů je poměrně složitý (zde ilustrován na příkladu motolice *Echinostoma revolutum*, podle Olsen 1986). Motolice ve stádiu zvaném miracidia se přichycují na epidermis plže a migrují do svalnaté nohy a pláště, kde se mění na mateřské sporocysty. Mateřské sporocysty poté dávají vznik dalším stádiím (mateřské rédie, dceřiné rédie). Z dceřiných rédií se uvolňují cercárie, které se volně pohybují ve vodě. Cercárie mohou infikovat buď druhého mezihostitele (např. pulce či dalšího sladkovodního plže). Zde se zacystuje ve formě metacerkarie, která se uvolní působením žaludečních šťáv definitivního hostitele motolice, která během několika dnů dospívá. Nakladená vajíčka se dostávají s výkaly z těla definitivního hostitele, kde se z nich ve vodě uvolňují miracidia, a životní cyklus se opakuje.

Druh *Echinostoma friedi* n. sp. je druh ze skupiny *Echinostoma revolutum*, který byl relativně nedávno popsán ze Španělska (Toledo et al. 2000). U druhu *Echinostoma friedi* byl jako jediný mezihostitel v přírodních podmínkách popsán plž *Lymnaea (Radix) peregra* (Müller, 1774). Motolice skupiny *Echinostoma revolutum* mají velmi široké spektrum možných prvních a druhých mezihostitelů a definitivních hostitelů. Motolice *Echinostoma revolutum* byla nalezena i svinutce tenkého (Zajíček 1963), není tedy vyloučena, že se mohlo jednat konkrétně o *Echinostoma friedi* n. sp., jež byla popsána až skoro o 40 let později po tomto nálezu.

Dalšími nalezenými motolicemi jsou podle BLAST (Altschul et al. 1990) pravděpodobně nějaké druhy motolic z čeledi Plagiorchidae. Definitivními hostiteli těchto motolic jsou všechny skupiny obratlovců, mezihostiteli jsou opět vodní plži, případně i další vodní bezobratlí, např. pakomáří larvy (Olsen 1986). Autorka této práce však v literatuře žádnou zmínku o výskytu motolic této čeledi nenašla. Ovšem u příbuzného druhu *Anisus vortex* byl potvrzen nález motolice *Haematoloechus* sp. z této čeledi (Ždárská 1963).

6.3 Genetická struktura levotočky bahenní (*Aplexa hypnorum*) a svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*)

Levotočka bažinná (*Aplexa hypnorum*) a svinutec tenký (*Anisus vorticulus*) jsou druhy, jejichž typickým habitatem jsou malá, často izolovaná, vodní tělesa. Měkkýši lentických habitatů mívají v porovnání s měkkýši lotických habitatů méně variabilní populační strukturu (Marten et al. 2006). Tento jev se může projevat i u jednoho druhu obývající jak lentické, tak lotické prostředí (Bousset et al. 2004). Zdůvodněním tohoto jevu by mohlo být, že populace v řekách (tedy stálém prostředí) neprochází tak často fázemi s nízkou populační hustotou jako populace z dočasných vod (tůní). Populace zde takto fluktuují v důsledku střídání záplav a vysychání.

Většina studovaných populací sladkovodních plžů vykazuje na větších prostorových škálách trend „isolation by distance“, tedy izolace vzdáleností (např. Miller et al. 2006, Wilkinson et al. 2007, Mavárez et al. 2002). To znamená, že čím jsou populace od sebe vzdálenější, tím je mezi nimi nižší tok genů. Naopak na malých prostorových škálách (např. v rámci jednotlivých populací) vykazují velmi malou či dokonce nulovou genetickou variabilitu (Worthington Wilmer et al. 2008, Miller et al. 2006) a zároveň deficienci heterozygotnosti (Hurtrez - Bousses et al. 2010), což ukazuje na nepohlavní rozmnožování, inbreeding či naopak vysokou míru disperse v lokálním měřítku.

U některých plžů byly ale nalezeny populace značně diferencované, konkrétně např. u druhu *Biomphalaria glabrata* (Sire et al. 2001, Dejong et al. 2001) či druhu *Potamopyrgus antipodarum* (Lively a Dybdahl 2000). Tato výrazná populační struktura vznikla pravděpodobně důsledkem koevoluce hostitele a parazita (tzv. hypotéza Červené královny, předpovězená Van Valen 1973). Tato hypotéza tvrdí, že se parazité adaptují k napadání nejčastějších genotypů hostitele, pro hostitele je tedy výhodnější být nositelem méně častého genotypu (Lively a Dybdahl 2000). Přesto toto však pro některé hostitelské druhy motolic (např. *Bulinus truncatus*, hostitel motolice *Schistosoma haematobium*) neplatí a jejich populace proto vykazují nízkou genetickou variabilitu (Nalugwa et al. 2011).

Bulinus truncatus je navíc jeden z mála plicnatých sladkovodních plžů, kteří preferují převážně samooplození. Většina ostatních plicnatých plžů, ač též simultánní hermafrodité, upřednostňují tzv. outcrossing, tedy výměnu pohlavních buněk mezi dvěma různými jedinci.

6.3.1 Vnitropopulační variabilita levotočky bahenní (*Aplexa hypnorum*)

Sladkovodní plži mívají často nízkou či žádnou vnitropopulační strukturu. Omezenou vnitropopulační strukturu kvůli výběru markerů a nedostatku vzorků nemůžeme zcela vyloučit. Na několika lokalitách však bylo nalezeno více haplotypů (např. pro gen 16S) i více různých úseků oblasti ITS-1, takže můžeme vyloučit, že by populace levotočky bažinné neměly zcela žádnou populační strukturu.

6.3.2 Mezipopulační variabilita levotočky bahenní (*Aplexa hypnorum*)

Výsledky analýz ukázaly, že populace levotoček bažinných na území ČR mají poměrně variabilní sekvence mtDNA. Průměrná divergence sekvencí byla pro COI 2,13 %, pro 16S 0,59 % a pro oblast ITS-1 0,21 %. Na území ČR bylo nalezeno 10 haplotypů pro gen COI, 9 haplotypů pro gen 16S, pět typů sekvencí pro gen ITS-1 a jeden typ sekvence oblasti ITS-2. Z těchto výsledků je patrné, že nejvariabilnější marker byl gen pro COI. Bohužel pro tento gen nemohlo být získáno více sekvencí kvůli problémům s amplifikací tohoto úseku.

Rozložení haplotypů pro gen COI poměrně dobře kopírovalo rozdělení lokalit podle hlavních českých povodí (Labe, Morava, Odra), což podpořily i výsledky testu AMOVA. Pokud by

byly do analýz zahrnuty jen výsledky pro gen COI, mohl být vcelku dobře podpořen původní předpoklad, že největší míra divergence bude mezi skupinami populací z různých povodí. Další použité markery (16S, ITS-1) žádný takovýto trend v geografickém rozložení haplotypů ovšem neukázaly. Marker ITS-2 nevykazoval na území ČR žádnou variabilitu.

Co by tedy mohlo být příčinou takovýchto výsledků? Ideální by bylo vzájemné porovnání několika sekvencí různých genů od různých jedinců ze stejných lokalit mezi sebou. Kvůli nízké úspěšnosti amplifikace sekvencí však taková data nejsou k dispozici.

Vzhledem k nízké úspěšnosti amplifikace DNA izolátů je možné, že dané analýzy jsou ovlivněny malým počtem získaných sekvencí. Při takovémto počtu sekvencí mohly výsledky velmi výrazně zkreslit některé vzácné haplotypy. Vzhledem k malému počtu sekvencí mohly analýzy negativně ovlivnit také chyby sekvenátoru při čtení sekvencí, které by uměle zvýšily variabilitu.

Populační strukturu odpovídající různým povodím vykazují odlišné druhy sladkovodních bezobratlých obývajících periodické tůně. Mezi tyto bezobratlé patří např. zábronožka sněžní (*Eubbranchipus grubii*) (Rychtrmoncová 2008). Tato struktura vznikla v důsledku osídlení různých povodí z různých glaciálních refugií (Rychtrmoncová 2008). Levotočka bažinná však patří mezi druhy sladkovodních bezobratlých, které žily na našem území i v dobách zalednění (Ložek 1955). Protože populace levotoček nemusely ustupovat do refugií, z kterých se opětovně šířily, přetrvala tak u nich vyšší genetická diverzita i v oblastech ovlivněných kontinentálním zaledněním, podobně jako tomu např. u chrostíka *Chaetopterygopsis maclachlani* (Lehrian et al. 2010). Zatímco u druhů, které ustoupily do refugií, přetrvala vyšší genetická diverzita právě jen v refugiích (Bohonak 1998). Nižší než předpokládaná dispersní schopnost levotoček jakožto plžů obývajících lentické prostředí (Marten et al. 2006), by mohla vysvětlit přetrvání této genetické variability do dnešní doby.

U sladkovodních plžů obývajících izolované habitaty by však měla být disperse poměrně vysoká, jak už bylo několikrát zmíněno (podle Marten et al. 2006). Přetrvávání vyšší genetické diference i při vysoké míře disperse u některých sladkovodních (planktonních) bezobratlých vysvětluje tzv. monopolizační hypotéza (De Meester et al. 2002). Organismus kolonizující danou lokalitu se na ní rychle namnoží a spolu se svými potomky ji tak „monopolizují“ a zabrání jejímu osídlení dalšími jedinci stejného druhu.

6.3.3 Genetická struktura svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*)

Vzhledem k malému počtu dat u svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*), je nemožné z nich učinit nějaké rozsáhlejší závěry týkající se jeho populační struktury. Lze pouze uvést, že populace tohoto druhu na našem území zřejmě nejsou zcela geneticky uniformní. Pro gen 16S se zde vyskytují minimálně tři haplotypy a pro oblast ITS-1 dva typy sekvencí.

U svinutce tenkého byla provedena zatím jen jedna další genetická studie, která zahrnovala materiál z Velké Británie a Německa (Mensch 2009). Tato studie, využívající mitochondriální gen 12S a AFLP, zjistila velmi nízkou variabilitu populací tohoto plže ve všech zkoumaných oblastech. Tento výsledek si autorka práce vysvětluje tak, že anglická a německá populace mají stejný původ (Mensch 2009). Nízká variabilita by mohla být vysvětlena i častou dispersí a zvýšeným genotvým tokem. Takovýto závěr je ovšem v rozporu se zjištěním, že dispersní schopnost druhu *Anisus vorticulus* je poměrně nízká (Niggebruggge et al. 2007).

6.4 **Fylogenetická analýza levotoček linie *Aplexa hypnorum* a *Aplexa elongata***

Získané sekvence levotočky *Aplexa hypnorum* byly zároveň použity k fylogenetické analýze levotoček linií *Aplexa hypnorum* a *Aplexa elongata*. Taxonomické postavení těchto linií totiž stále není zcela ujasněné. Cílem této práce ani této analýzy nebylo a ani nemůže být přesné stanovení taxonomického postavení těchto dvou linií, jako spíše jeho nástin za prvního použití molekulárních dat. K plnému zhodnocení taxonomických rozdílů mezi těmito liniemi by byla zapotřebí detailnější genetická studie s větším množstvím materiálu a také morfologické srovnání obou linií levotoček.

Toto srovnání bylo umožněno i díky tomu, že v rámci projektu International Barcode of Life (Savolainen et al. 2005) bylo získáno hned několik sekvencí druhu *Aplexa elongata* pro gen COI. Již z fylogenetických stromů (obr.21 a 22) je zřejmé, že se jedná o dvě odlišné linie. Oddělení těchto linií podporují i vysoké hodnoty Bootstrap pro jednotlivé nody. Genetická vzdálenost těchto druhů je 14,41 % pro gen COI, respektive 16,5 % pro gen 16S. V tabulce 26. jsou pro srovnání genetické vzdálenosti u různých druhů rodu *Physa/Physella* pro gen COI a v následující tabulce pro gen 16S. Data pro žádné další příslušníky tribu Aplexini totiž nejsou bohužel k dispozici. Jak je vidno, vzdálenosti jednotlivých druhů mezi sebou se pohybují od 12,37 % do 22,36 % u genu COI, respektive od 15,17 % do 20,22 % pro gen 16S. Pro srovnání jsou zde uvedeny také genetické vzdálenosti mezi liniemi *Physa (Physella) wrighti*, *Physa (Physella) gyrina* a *Physa (Physella) johnsoni*, dříve považované za několik druhů, dnes řazené do druhu *Physa (Physella) gyrina* (Wethington a Lydeard 2007). Jejich genetické vzdálenosti jsou velmi nízké, od 0,45 do 1,3 %, respektive od 0,12 do 0,8 %. Pro přehlednost jsou jejich genetické vzdálenosti zvýrazněny růžovou barvou.

Tab. 26: Genetické vzdálenosti u různých druhů rodu *Physa*/*Physella* pro gen COI

COI	<i>Physa jennessi</i>	<i>Physa (Physella) acuta</i>	<i>Physa (Physella) wrighti</i>	<i>Physa (Physella) gyrina</i>	<i>Physa (Physella) johnsoni</i>	<i>Physa fontinalis</i>
<i>Physa jennessi</i>		0,2236	0,1652	0,1492	0,1636	0,1237
<i>Physa (Physella) acuta</i>	0,2236		0,1957	0,1795	0,2028	0,1824
<i>Physa (Physella) wrighti</i>	0,1652	0,1957		0,0120	0,0130	0,1677
<i>Physa (Physella) gyrina</i>	0,1492	0,1795	0,0120		0,0045	0,1483
<i>Physa (Physella) johnsoni</i>	0,1636	0,2028	0,0130	0,0045		0,1702
<i>Physa fontinalis</i>	0,1237	0,1824	0,1677	0,1483	0,1702	

Tab. 27: Genetické vzdálenosti u různých druhů rodu *Physa*/*Physella* pro gen 16S

16S	<i>Physa (Physella) acuta</i>	<i>Physa (Physella) johnsoni</i>	<i>Physa (Physella) wrighti</i>	<i>Physa (Physella) gyrina</i>	<i>Physa fontinalis</i>
<i>Physa (Physella) acuta</i>		0,1539	0,1517	0,1521	0,2022
<i>Physa (Physella) johnsoni</i>	0,1539		0,0044	0,0012	0,1703
<i>Physa (Physella) wrighti</i>	0,1517	0,0044		0,0080	0,1656
<i>Physa (Physella) gyrina</i>	0,1521	0,0012	0,0080		0,1709
<i>Physa fontinalis</i>	0,2022	0,1703	0,1656	0,1709	

Ve srovnání s těmito daty tedy můžeme tvrdit, že evropská levotočka *Aplexa hypnorum* a americká levotočka *Aplexa elongata* velmi pravděpodobně tvoří samostatné druhy. Jejich míra divergence je významně vyšší, než je např. u kryptických druhů předožábřých plžů (7,4 %) (Delicado a Ramos 2012). Hodnoty mezidruhové divergence bývají pro většinu taxonů větší než 8%, pro měkkýše činí 11,1 % (Hebert et al. 2003).

7 Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo popsat a zanalyzovat genetickou variabilitu populací sladkovodních plžů levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*) a svinutce tenkého (*Anisus vorticulus*). Tento cíl však nemohl být zcela splněn, neboť se izolace a amplifikace genů z těchto dvou druhů ukázala velmi problematická. To s největší pravděpodobností souvisí s inhibičním efektem mukopolysacharidů obsaženým v mukusu plžů. Úspěšnost sekvenace izolátů byla velmi nízká i s použitím nejefektivnější dosud známé metody izolace pro plže (Skujienė a Soroka 2003).

Zjištěná genetická variabilita a její rozdělení se pro jednotlivé primery velmi lišily. Zatímco gen COI ukázal, že populace levotoček bažinných se odlišují zejména mezi jednotlivými povodími, ostatní markery toto zjištění nepotvrdily. Různé výsledky pro jednotlivé markery potvrzují důležitost použití většího množství markerů a dostatečného počtu vzorků.

Nezáměrná amplifikace DNA motolic při sekvenaci oblasti ITS-1 plže *Anisus vorticulus* prokázala, že specifický primer pro plicnaté plže 18S a 5.8S (Armbruster et al. 2000), není alespon pro některé druhy plžů vhodný. Stejnou sekvenci primeru totiž mají i některé druhy motolic.

Fylogenetická analýza genů COI a 16S ukázala, že evropská linie levotoček *Aplexa hypnorum* a americká linie levotoček *Aplexa elongata* téměř jistě nenáleží ke stejnému druhu. Pro hlubší analýzu jejich taxonomického postavení by však bylo zapotřebí porovnat detailně jejich morfologii a použít pro fylogenetickou analýzu větší dataset. Velmi zajímavé by bylo tato data porovnat i s materiálem levotoček z jihozápadní Evropy, kde by měly podle některých literárních zdrojů levotočky náležet k jinému druhu, a to druhu *Paraplexa cornea*.

8 Seznam literatury:

- Altschul, S. , Gish, W., Miller, W., Myers, E., W. a Lipman, D. J. (1990):** Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403 – 410.
- Avise, J. C. (2004):** Molecular Markers, Natural History, and Evolution. *Sinauer, Sunderland*. 684 s.
- Beran, L. (2002):** Vodní měkkýši České republiky - rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam. *Sborník přírodovědného klubu v Uh. Hradišti, Supplementum* 10, 258 pp.
- Beran, L. (2006):** Unintentional introduction of aquatic mollusc from Poland to Prague (Czech Republic).
- Beran, L., (2010):** Má svinutec tenký v ČR budoucnost? *Ochrana přírody*, 65: 7–9.
- Beran L., Juříčková, L. a Horsák, M. (2005):** Mollusca (měkkýši), pp. 69-74. In: Farkač, J., Král, D. a Škorpič, M. (eds.), Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí. Red list of threatened species in the Czech Republic. Invertebrates. *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha*, 760 pp.
- Bohonak, A. J. a Roderick G. K. (2001):** Dispersal of invertebrates among temporary ponds: are genetic estimates accurate? *Israel Journal Of Zoology* 47, 367-386.
- Bohonak, A. J. a Jenkins, D. G. (2003):** Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology Letters* 6: 783-796.
- Boycott, A. E. (1936).** The habitats of fresh-water Mollusca in Britain. *Journal of Animal Ecology* 5,
- Brown, L. J. a Jung, R. E. (2005):** An Introduction to Mid-Atlantic Seasonal Pools, EPA/903/B-05/001. U.S. Environmental Protection Agency, Mid-Atlantic Integrated Assessment, Ft. Meade, Maryland
- Brown, M. K. (1982):** Resource Overlap and Competition in Pond Snails: An Experimental Analysis. *Ecology* 63:412–422.
- Calow, P.(1978):** The evolution of life-cycle strategies in fresh-water gastropods. *Malacologia* 17,351–364
- Clobert, J., Danchin, E., Dhondt, A. A. a Nichols, J. D. (eds) (2001):** Dispersal. *Oxford University Press, New York*. 452 s.
- Cuttelod, A., Seddon, M. a Neubert, E. (2011):** European Red List of non-marine molluscs. Luxembourg. (Publications of the European Union). 97 pp.
- ČHMÚ:** Historická data. Počasí. Územní srážky [online]. Citováno 13.8.2013. Dostupné na: http://chmu.cz/portal/dt?portal_lang=cs&menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/P4_1_Pocasi/P4_1_5_Uzemni_srazky&last=false.
- Delicado, D a Ramos, M. A. (2012):** Morphological and molecular evidence for cryptic species of springsnails [genus *Pseudamnicola* (*Corrosella*) (Mollusca, Caenogastropoda, Hydrobiidae)]. *Zookeys* 190: 55-79.
- den Hartog, C. (1963):** The distribution of the snail *Aplexa hypnorum* in Zuid-Beveland in relation to soil and salinity. *Basteria*, 27:8-17.

- den Hartog, C. a De Wolf, L. (1962):** The life cycle of the water snail *Aplexa hypnorum*. *Basteria*, 26:61-88.
- Dillon, R. T., Jr. (2000):** The Ecology of Freshwater Molluscs. *Cambridge University Press, Cambridge*, 509 s.
- Dillon, R. T., Jr., Wehington, A. R. (2006):** The Michigan Physidae revisited: a population genetic survey. *Malacologia*: 48, 133-142
- *Fuchs, U. (2007):** Makrozoobenthos Lettenlöcher 2006. – In: ALAND: Jahresbericht 2006 zu den Begleit un tersuchungen zur Schlammreduktion mittels Belüftung inden Lettenlöchern. *Gutachten für das Regierungs presidium Karlsruhe*. 116-186.
- Gargominy, O., Prié, V., Bichain, J.-M., Cucherat, X. a Fontaine, B. (2011):** Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France. *MalaCo 7*: 307-382.
- Gittenberger, E, Groenenberg, D. S. J., Kokshoorn, B. a Preece, R.C. (2006):** Molecular trails from hitch-hiking snails. *Nature* 439, 409.
- Glöer, P. a Meier-Brook, C. (2003):** Süßwassermollusken (Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland). - 13. Auflage, Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung, Hamburg, 136 pp.
- Glöer, P., Groh, K. (2007):** a contribution to the biology and ecology of the threatened species *Anisus vorticulus*(Troschel, 1834) (Gastropoda: Pulmonata:Planorbidae). *Mollusca* 25: 33–40.
- Haynes, A, Taylor, B. J. R, Varley, M. E (1985):** The influence of the mobility of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith E.A.) (Prosobranchia: Hydrobiidae) on its spread. *Arch Hydrobiol* 103:497–508.
- Hebert, P. D., Ratnasingham S. a deWaard J. R. (2003):** Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: S96-S99.
- Holcombe, G. W., Phipps, G. L., Marier, J. W. (1984):** Methods for conducting snail (*Aplexa hypnorum*) embryo through adult exposures: Effects of cadmium and reduced pH levels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13, 627-634.
- Jukes, T. H. a Cantor, C. R. (1969):** Evolution and protein molecules. *Academia Press*, New York, 21-32.
- Mensch, S. (2009):** Population Genetics of three threatened Lowland Gastropod Species. Diploma Thesis. Cardiff Univesity, School of biosciences. Johannes Guttenberg Universität Mainz, Fachbereich Biologie. 66 pp.
- Myzyk, S (2008):** Life cycle of *Anisus vorticulus* (Troschel, 1834) (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) in the laboratory. *Folia Malacologica* 16: 207–215.
- Okland, J. (1990):** Lakes and snails: environment and gastropoda in 1,500 Norwegian lakes, ponds and rivers. *Universal Book Services/W. Backhuys, Oegstgeest, Netherlands*. 516 pp.
- Olsen, O. W. (1986):** Animal Parasites: Their Lie Cycles and Ecology. *Dover Publications*, New York. 564 pp.
- Piechocki, A. (1979):** Mieczaki (Mollusca), Slimaki (Gastropoda).-Fauna Slodkowodna Polski 7. *Panstwowe Wydaw. Naukowe, Warszawa-Poznań*, 187 s.
- Roland, H. J., Grabow, K. a Martens, A. (2012):** Aerial dispersal of freshwater gastropods by dragonflies (Odonata). *International Journal of Odonatology*, 15, 317-318.

- Rüetschi J., Stucki P., Müller P., Vicentini H. a Claude F. (2012):** Rote Liste Weichtiere (Schnecken und Muscheln). Gefährdete Arten der Schweiz, Stand 2010. Bundesamt für Umwelt, Bern, und Schweizer Zentrum für die Kartografie der Fauna, Neuenburg. Umwelt-Vollzug 1216. 148 pp.
- Russell-Hunter, W., (1961):** Life cycles of four freshwater snails in limited populations in Loch Lomond with a discussion of intraspecific variation. *Proceedings of the Zoological Society of London* 137: 135–171.
- Russell-Hunter, W., (1964):** Physiological aspects of ecology in nonmarine molluscs. In **Wilbur, K.&C. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005):** Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1805–1811.
- Selkoe, K. A. a Toonen, R. J. (2006):** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9, 615-629.
- Spyra, a (2010):** Environmental factors influencing the occurrence of freshwater snails in woodland water bodies. *Biologia* 65. 697 – 703.
- Sunnucks P., (2000):** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15, 199-203.
- Tamura, K. (1992):** Estimation of the number of nukleotide substitutions hen there are strong transiv-transvertion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.
- Taylor, D. W. (2003):** Introduction to Physidae e (Gastropoda: Hygrophila); biogeography, classification, morphology. *Revista de Biología Tropical*. Supplementum 1, 1-287.
- Taylor, D. W. (2003):** Introduction to Physidae (Gastropoda: Hygrophila); biogeography, classification, morphology. *Revista de Biología Tropical* 51 (Suppl. 1): 1-287.
- TE, G. A. (1978):** The systematics of the Family Physidae (Basommatophora: Pulmonata. *University of Michigan*; PhD thesis.
- Terrier, A, Castella, A., Falkner, G. a Killeen, I. J. (2006):** Species account for *Anisus Vorticulus* (Troschel, 1834) (Gastropoda: Planorbidae), a Species Listed In Annexes II And IV Of The Habitats Directive. *Journal Of Conchology* 39, 193-206.
- Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994):** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Toledo, R., Muñoz, C. a Esteban J. G. (2000):** The life-cycle of *Echinostoma friedi* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within 'revolutum' group based on carcarial chaetotaxy. *Systematic Parasitology* 45:199-217.
- Uvayeva, O a Hural, R (2008):** Peculiarities of distribution and ecology of freshwater snails of the family Planorbidae (Gastropoda, Pulmonata) of Ukraine (in Russian). *Ruthenica* 18: 25–38.
- Vlasblom, A. G. (1971):** Further investigations into the life cycle and soil dependence of the water snail *Aplexa hypnorum*. *Basteria* 35: 95-108.
- Watson, A. M. a Ormerod, S. J. (2004a):** The distribution of three uncommon freshwater gastropods in the drainage ditches of British grazing marshes. *Biological Conservation* 188: 455-466.

- Watson, A.M. a Ormerod, S.J. (2004b):** The micro-distribution of three uncommon freshwater gastropods in the drainage ditches of British grazing marshes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14: 221-236.
- Wethington, A. R. a Lydeard C. (2007):** a molecular phylogeny of Physidae (Gastropoda: Basommatophora) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Molluscan Studies*, 10: 1-17.
- Willmann, R. a Pieper, H. (1978):** Gastropoda. In: **iLLIES (ed.)**, Limnofauna Europaea. Eine Zusammenstellung aller die europäischen Binnengewässer bewohnenden mehrzelligen Tierarten mit Angaben über ihre Verbreitung und Ökologie. Zweite überarb. und ergänzte Aufl.: 118–134. *Gustav Fischer*, Stuttgart.
- Yonge (eds)**, Physiology of Mollusca, 1. *Academic Press*, New York, 83–126.
- Zajíček, D. (1963):** Cerkárie a další vývojová stadia motolic u plžů z některých rybníčních soustav Jižních Čech. *Československá Parasitologie* 10, 187-205.
- Zavoral, T (2009):** Taxonomická revize rodu *Anisus* v České republice (Mollusca: Planorbidae). Diplomová práce, PKaterda zoologie Př UK, Praha. 51 pp.
- Zealand, A. a Jeffries, M. (2009):** The distribution of pond snail communities across a landscape: separating out the influence of spatial position from local habitat quality for ponds in south-east Northumberland, UK. *Hydrobiologia*, 632. 177-187.
- Zettler, M. L. (2013):** Some ecological peculiarities of *Anisus vorticulus* (Troschel 1834) (Gastropoda: Planorbidae) in northeast Germany. *Journal o Conchology* 41, 389 – 398.
- Žďárská, Z. (1963):** Larvální stadia motolic z vodních plžů na území ČSSR. *Československá Parasitologie* 10, 207 – 262.

*sekundární citace

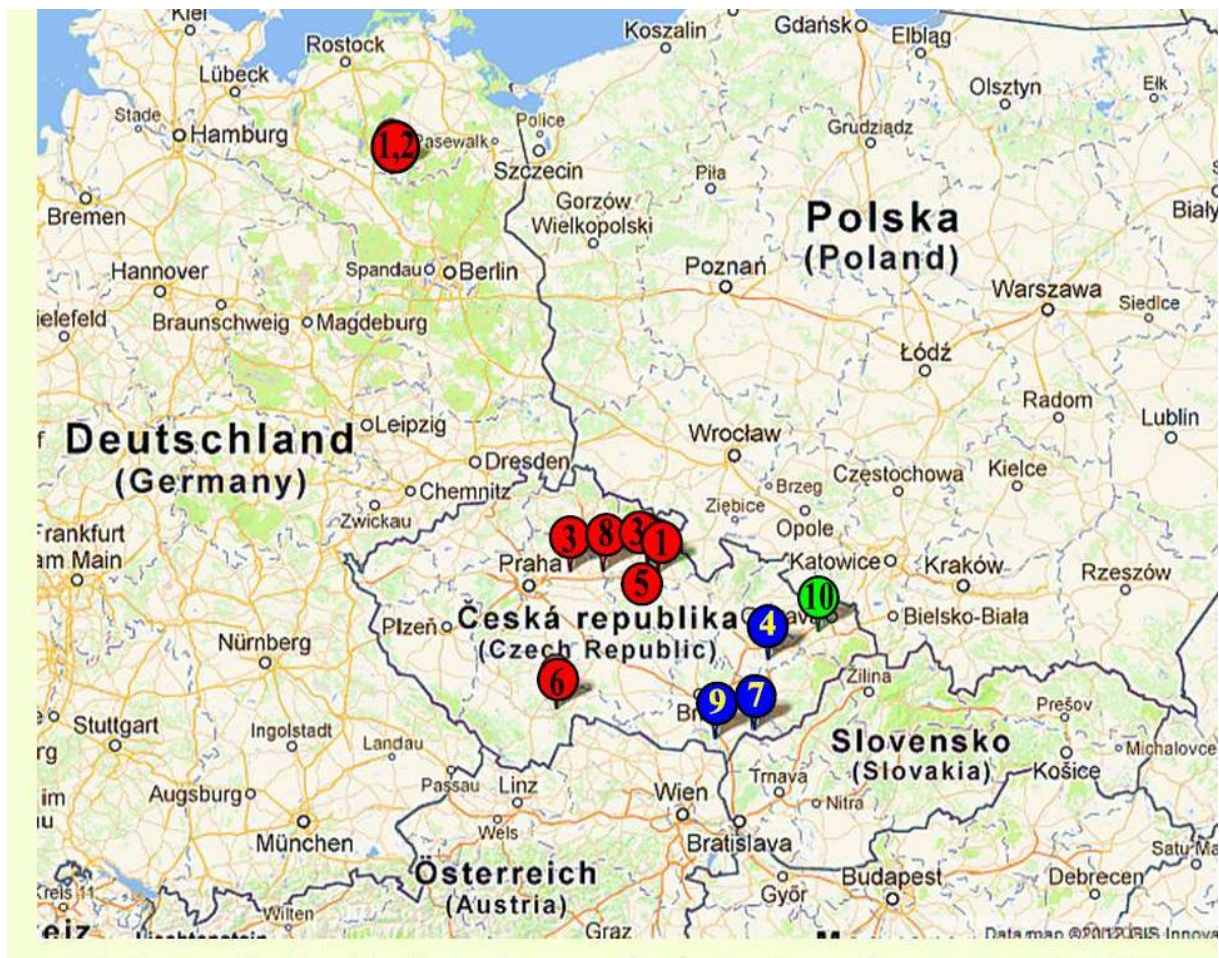
9 Seznam příloh

Příloha 1: Mapa výskytu jednotlivých haplotypů COI u levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*)

Příloha 2: Seznam lokalit levotočky bažinné s počty izolátů a haplotypů z jednotlivých lokalit

Příloha 3: Seznam lokalit svinutce tenkého s naměřenými fyzikálními a chemickými parametry

Příloha 1: Mapa výskytu jednotlivých haplotypů COI u levotočky bažinné (*Aplexa hypnorum*)



Příloha 2

Lokalita	Povodí	Izoláty	Haplotyp COI	Haplotyp 16S	Typ ITS-1	Typ ITS-2
Choryňský mokřad	Bečva (Dunaj)	3	-	-	ITS-1AH1, ITS-1AH3	ITS-2AH1
Tůň u Kotvice	Odra (Odra)	8	COIAH10	-	ITS-1AH1, ITS-1AH3	ITS-2AH1
Kly	Labe (Labe)	4	-	16SAH4	ITS-1AH1	ITS-2AH1
Zahrádky	Ploučnice (Labe)	3	-	-	ITS-1AH1, ITS-1AH3	ITS-2AH1
Bažina u Azantu	Dyje (Dunaj)	5	COIAH9	16SAH7	ITS-1AH2	ITS-2AH1
Choťovice	Labe (Labe)	3	COIAH8	16SAH5	ITS-1AH1, ITS-1AH2	ITS-2AH1
Petrov	Morava (Dunaj)	5	COIAH7	-	ITS-1AH1	ITS-2AH1
Přerov01 + 02	Bečva (Dunaj)	6	COIAH4	-	ITS-1AH3, ITS-1AH4, ITS-1AH5	ITS-2AH1
Týniště	Orlice (Labe)	3	COIAH3	-	ITS-1AH1, ITS-1AH3	-
Běleč	Orlice (Labe)	3	COIAH10	16SAH2, 16SAH9	ITS-1AH1	ITS-2AH1
Šnepov	Labe (Labe)	2	COIAH3	16SAH2	ITS-1AH1	ITS-2AH1
Potěšil	Lužnice (Labe)	3	COIAH5	16SAH2, 16SAH3	ITS-1AH1	ITS-2AH1
Černičný rybník	Lužnice (Labe)	3	-	16SAH6	-	ITS-2AH1
Choťánky	Labe (Labe)	3	-	16SAH8	-	-
Řečický rybník	Otava (Labe)	1	-	-	-	-
Kaprov (Tchořovice)	Otava (Labe)	2	-	-	-	-
Radvanský rybník (Sloup v Čechách)	Ploučnice (Labe)	2	-	16SAH3	-	-
Velim	Labe (Labe)	2	-	-	ITS-1AH3	-
Křtěný	Lužnice (Labe)	3	-	-	-	-
Nové Hodějovice	Malše (Labe)	2	-	-	-	-
Mimoň, Boreček	Ploučnice (Labe)	2	-	-	-	-
Libice 01	Labe (Labe)	2	-	16SAH3	-	-
Libice 02	Labe (Labe)	2	-	-	-	-
Libice 03	Labe (Labe)	2	-	16SAH3	-	-
Libice 04	Labe (Labe)	2	-	16SAH2	-	-
Plzeň 01	Mže (Labe)	2	-	-	-	-
Plzeň 02	Mže (Labe)	2	-	-	-	-
Plzeň 04	Mže (Labe)	2	-	-	-	-
Řečany nad Labem	Labe (Labe)	2	-	-	-	-
Pastvisko	Dyje (Dunaj)	2	-	16SAH1	-	-
Labětín	Labe (Labe)	2	-	-	-	-

Příloha 3

Lokalita	Název odběrového místa	Datum	Přítomnost	typ	Povodí	Sběr	Abiotické faktory		
							Teplota (°C)	pH	konduktivita
Písečný rybník u Milotic	Z část rybníka	25.8.2012	+	rybník	Morava (Dunaj)	JB, LB	22,3	7,5	897
	JV cíp V části u vtoku do rybníka		+	rybník			25,1	7,75	816
	SV cíp ve V části Písečného rybník		+	rybník			23,8	7,72	897
	Nová tůň		-	tůň			22,7	7,59	1001
	Vybagrovaná tůň		-	tůň			22,1	7,43	1040
	Stará tůň		-	tůň			22,3	7,44	1015
Bohdanečský rybník	Tůň v SZ zátocce 1	9.9.2012	+	tůň	Labe (Labe)	JB, LB	16,2	7,31	289
	Tůň v SZ zátocce 2		+	tůň			18,1	7,52	201
	Tůň v SZ zátocce 3		+	tůň			17,5	7,37	233
	Tůň v SZ zátocce 4		+	tůň			19,3	7,38	202
	Tůň v SZ zátocce 5		+	tůň			19,1	7,65	260
PR Plané Loučky	Izákova	16.6.2012	+	tůň	Morava (Dunaj)	JB, LB	18,3	6,93	242
	Jelito		+	tůň			19,3	6,85	240
	Kolečko		-	tůň			19,5	6,56	130
	Nová tůň		-	tůň			17,3	6,78	565
	Rákosová		-	tůň			17,5	6,67	245
Stibůrkovská jezírka	Tůň v PR Stibůrkovská jezera	4.5.2013	+	tůň	Morava (Dunaj)	LB	-	-	-
Pastvisko	Tůň u Pastviska	18.5.2013	+	tůň	Dyje (Dunaj)	LB	-	-	-
Liwiec	Tůň v nivě řeky Liwiec (Polsko)	23.4.2013	+	tůň	Wisla	EK	-	-	-
Kopičácký rybník	Mokřad nad rybníkem	12.5.2013	+	tůň	Labe (Labe)	LB	-	-	-
Nejdek	Bažina u Azantu	20.10.2012	-	tůň	Dyje (Morava)	LB, JB	-	-	-
Tůně u Studénky	Tůň u rybníka Kačák	15.4.2013	-	tůň	Odra (Odra)	JB, LB	19,2	6,98	268
	Tůň u Kotvice		+	tůň			18,1	7,31	295
Týn nad Bečvou	JV tůň	13.7.2013	+	šterkovna	Bečva (Dunaj)	JB, LB	20,1	7,44	586
	SV tůň		+	šterkovna			21,7	7,83	418
	SZ tůň		+	šterkovna			19,3	7,86	526
	Rybník		-	rybník			15,8	7,8	547
	Škrabalka		+	Slepé rameno			19,7	8,1	521

