

Katedra parazitologie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze



**TAXONOMICKÉ PROBLÉMY STUDIA PLŽŮ RODU
RADIX (ČELEĎ LYMNAEIDAE), MEZIHOSTITELŮ
PTAČÍCH MOTOLIC**

**Taxonomic problems within the snail genus *Radix* (family
Lymnaeidae), intermediate hosts of bird schistosomes**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Školitel – konzultant diplomové práce: Mgr. Vladimír Hampl, Ph. D.

Praha 2008

Prohlášení

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

Velice děkuji Petru Horákovi a Vládovi Hamplovi za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci. Taktéž děkuji Alešovi Kuběnovi z katedry filosofie a dějin přírodních věd PřF UK Praha za pomoc při statistickém zpracování

Děkuji všem členům helmintologického týmu za to, jak jsou skvělí.

Děkuji svým rodičům za podporu během celého studia.

Děkuji Liborovi.

OBSAH:

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	
2. 1. Charakteristika čeledi Schistosomatidae	3
2. 2. Druhová diverzita ptačích schistosom v ČR	5
2. 3. Charakteristika rodu <i>Trichobilharzia</i>	8
2. 4. Vztahy mezi <i>Trichobilharzia</i> sp. a meziphostitelem	
Nalezení meziphostitele	11
Vývoj parazita v plži	12
Vnitřní obranný systém (IDS) plžů	13
2. 5. Radixové jako meziphostitelé motolic v ČR	15
2. 6. Experimentální nákazy plžů rodu <i>Radix</i>	16
2. 7. Problematika determinace plžů rodu <i>Radix</i>	
2. 7. 1. Determinace dle morfologie ulit	21
2. 7. 2. Determinace podle morfologie a anatomie pohlavní soustavy	22
Determinace podle karyotypu a na základě molekulární analýzy	23
2. 8. Souhrnný popis druhů rodu <i>Radix</i>	25
3. METODIKA	
3. 1. Sběr, vyšetřování a fixace plžů	

3. 1. Sběr	30
3. 2. Vyšetřování	30
3. 3. Fixace a uchovávání	30
3. 2. Determinace plžů pitvou pohlavní soustavy	31
3. 3. Determinace pomocí sekvenace ITS2 oblasti	
3. 3. 1. Izolace DNA	32
3. 3. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	32
3. 3. 3. Gelová elektroforéza	33
3. 3. 4. Sekvenace	33
3. 4. Morfometrické určování ulit	34
3. 5. Experimentální nákazy plžů	35
4. VÝSLEDKY	
4. 1. Sběry plžů	37
4. 2. Vyšetření plžů na přítomnost cercárií schistosom	38
4. 3. Determinace plžů pitvou pohlavní soustavy	39
4. 4. Determinace podle sekvenace ITS2 oblasti	45
4. 5. Determinace dle morfologie ulity	
4. 5. 1. Deskriptivní statistika	55
4. 5. 2. „Multivariate general linear model“ (GLM)	57

4. 5. 3. Diskriminační analýza	59
4. 5. 4. Variabilita ulit plžů rodu <i>Radix</i>	64
4. 6. Experimentální nákazy plžů	66
5. DISKUZE	
5. 1. Sběr a vyšetření plžů	67
5. 2. Determinace plžů	67
5. 3. Experimentální nákazy plžů	73
6. ZÁVĚR	75
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	78

1. ÚVOD

Schistosomy patří, spolu s ostatními skupinami třídy Trematoda, do kmene Platyhelminthes. Na rozdíl od většiny ostatních čeledí, jejichž zástupci jsou dorzoventrálně zploštělí hermafrodité, mají schistosomy oblý průřez těla, oddělené pohlaví. Neobvyklá je i jejich lokalizace v krevním řečišti obratlovce. Jejich životní cyklus je dvouhostitelský, jako mezihostitel slouží vždy plž, definitivním hostitelem je pták nebo savec. Mezi savčí druhy patří významní parazité člověka (např. *Schistosoma mansoni*), a proto je jim věnována náležitá pozornost. Ptačí druhy jsou opomíjeny, přestože prevalence nálezů ptáků se pohybuje v desítkách procent (Kolářová a kol. 1997, Rudolfová a kol. 2002) a cercárie některých druhů mohou proniknout do kůže nespecifického savčího hostitele (včetně člověka), kde způsobují onemocnění nazývané cercáriová dermatitida (Kolářová a kol. 1997, Horák a kol. 1999, Horák a kol. 2002).

Cercárie jsou do prostředí vylučovány mezihostitelským plžem. V případě zástupců rodu *Trichobilharzia* vyskytujících se na území ČR, se jedná nejčastěji o zástupce čeledi Lymnaeidae, zejména rody *Lymnaea* a *Radix*. Zatímco určení druhu *L. stagnalis* není nijak problematické, zcela odlišná situace platí pro druhy rodu *Radix*, které jsou si morfologicky velmi podobné. Tvar jejich ulity je ovlivňován vnějším prostředím, a z tohoto důvodu je nelze určovat pouze na základě morfometrie. Dalšími možnými přístupy pro determinaci je pitva pohlavní soustavy a sekvenace ITS2 oblasti či mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu. Také nové práce založené na molekulárních metodách (Bargues a kol. 2001, Pfenninger a kol. 2006) ukázaly, že taxonomie tohoto rodu je velmi problematická a ne všechny jeho druhy jsou validní. Určování pomocí molekulárních technik je však finančně i časově náročné a proto je potřeba najít jinou spolehlivou metodu, jak plže určovat.

Vzhledem k chaosu panujícímu v názvosloví druhů rodu *Radix* a nejasnostem v otázce validity jednotlivých druhů není možné ani jednoznačně určit mezihostitelskou specifitu motolic rodu *Trichobilharzia*.

Žádná souhrnná práce srovnávající jednotlivé přístupy k určování plžů rodu *Radix* nebyla dosud publikována stejně jako práce zabývající se experimentálními infekcemi molekulárně určených plžů motolicemi rodu *Trichobilharzia*. Tento fakt byl jedním z důvodů, proč vznikla má práce.

Cíle práce:

- 1) sběr a vyšetřování plžů rodu *Radix* na přítomnost motolic rodu *Trichobilharzia*
- 2) určení plžů podle morfologie pohlavní soustavy plže
- 3) sekvenace ITS2 oblasti vypitvaných plžů
- 4) hodnocení tvaru a velikosti ulity plžů determinovaných pomocí sekvenace ITS2 oblasti
- 5) provedení experimentálních nálezů motolic *Trichobilharzia regenti* u plžů identifikovaných pomocí sekvence ITS2

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. 1. Charakteristika čeledi Schistosomatidae

Schistosomy (Schistosomatidae (Loos, 1899) Poche, 1907) patří mezi motolice (Trematoda) podtřídy Digenea. Od většiny ostatních zástupců digenetických motolic se liší oblým průřezem těla a lokalizací v těle definitivního hostitele. Jsou gonochoristé, jejich pohlaví určují pohlavní chromosomy – kombinace ZW u samic a ZZ u samců (Short 1983).

Životní cyklus schistosom je dvouhostitelský a stejně jako u ostatních motolic se vyznačuje střídáním pohlavních (definitivní hostitel) a nepohlavních (mezihostitel) generací. Definitivním hostitelem jsou ptáci nebo savci, mezihostitelem je vždy plž.

Ze zralého vajíčka (bez operkula) se ve vodním prostředí líhne obrvené miracidium (u nazálních druhů (např. *Trichobilharzia regenti*) se líhne v nazální sliznici definitivního hostitele), které volně plave ve vodě a aktivně vyhledává pomocí chemoreceptorů mezihostitele. Nepřijímá potravu, a pokud nenalezne vhodného mezihostitele, brzy hyne. K penetraci do plže slouží miracidium sekrety penetračních žláz. Po úspěšné penetraci dochází k transformaci na mateřskou sporocystu, která produkuje dceřiné sporocysty. Ty migrují do hepatopankreatu plže, kde produkují infekční larvy – cercárie, které se z plže uvolňují opět do vodního prostředí, kde aktivně vyhledávají definitivního hostitele. Přitom se obvykle orientují pomocí chemoreceptorů a gradientu různých látek produkovaných definitivním hostitelem. K penetraci do definitivního hostitele slouží cercárii produkty penetračních žláz (cirkumacetabulární, postacetabulární), které obsahují histolytické enzymy, zejména peptidázy (serinové a cysteinové, např. cercariální elastáza, katepsin B) (Dvorak a kol. 2005). Při úspěšné penetraci odvrhne cercárie ocásek a v kůži se mění na schistosomulum, které migruje (cestou se vyvíjí) až do místa své konečné lokalizace. Zde dospívá a dospělci následně produkují vejce. Migrace probíhá většinou krevním řečištěm, výjimkou je např. *Trichobilharzia regenti*, u níž schistosomulum migruje nervovou soustavu. U dospělců

schistosomních motolic je existuje sexuální dimorfismus – samci jsou větší a na ventrální straně těla se u většiny druhů nalézají rýha, tzv. *canalis gynaecophorus* sloužící k přidržování samice, která produkuje vejce.

Do čeledi Schistosomatidae patří 13 rodů (Bash 1991, Kolářová a kol. 2006) viz Tab.

1. Podle definitivního hostitele můžeme schistosomy rozdělit na dvě velké skupiny – savčí a ptačí. Mezi savčí druhy patří významní patogeni člověka – *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* a *S. japonicum*. Dle WHO (<http://www.who.int/en/>) je schistosomóza nejzávažnější helmintózou. I ptačí schistosomy však mohou penetrovat do kůže nespécifického hostitele (savce) a způsobit tak cercáriovou dermatitidu (Kolářová a kol. 1999)

Tab. 1: Seznam rodů čeledi *Schistosomatidae*, jejich mezihostitelů a definitivních hostitelů (Bash 1991, Kolářová a kol. 2006)).

Jméno	Definitivní hostitel	Mezihostitel
<i>Austrobilharzia</i>	ptáci	Prosobranchiata
<i>Ornithobilharzia</i>	ptáci	Prosobranchiata nebo neznámý
<i>Trichobilharzia</i>	ptáci	Pulmonata nebo neznámý
<i>Bilharziella</i>	ptáci	Pulmonata
<i>Gigantobilharzia</i>	ptáci	Pulmonata, Opisthobranchiata
<i>Dendrobilharzia</i>	ptáci	neznámý
<i>Macrobilharzia</i>	ptáci	neznámý
<i>Schistosomatium</i>	hlodavci	Pulmonata
<i>Bivitellobilharzia</i>	sloni	neznámý
<i>Heterobilharzia</i>	masožravci, hlodavci, zajícovci	Pulmonata
<i>Orientobilharzia</i>	přežvýkavci, masožravci	Pulmonata
<i>Schistosoma</i>	savci	Pulmonata, Prosobranchiata
<i>Jilobilharzia</i>	ptáci	Pulmonata
<i>Allobilharzia</i>	ptáci	neznámý

2. 2. Druhová diverzita ptačích schistosom v ČR

Čeď Schistosomatidae zahrnuje devět rodů, který využívají jako své definitivní hostitele ptáky (Basch 1991, Kolářová a kol. 2006)) viz Tab. 2. V České republice se vyskytuje pět rodů ptačích schistosom (viz Tab. 3), které z našeho území popsali například uvedení autoři: *Bilharziella* (Našincová 1992, Kolářová a kol. 1997), *Ornithobilharzia* (Vojtek 1981, Kolářová a kol. 1997), *Gigantobilharzia* (Vojtek 1981, Kolářová a kol. 1997), *Trichobilharzia* (Kolářová a kol. 1997, Horák a kol. 1998, Rudolfová 2003) a *Dendritobilharzia* (Kolářová a kol. 1997). Rod *Trichobilharzia* Skrjabin et Zacharov, 1920 s více jak 40 druhy je nejpočetnějším rodem čeledi. Platnost jednotlivých druhů je však sporná (Horák a kol. 2002). Přestože infekce ptáků jsou časté, prevalence nálezů se pohybují ve zlomcích až jednotkách procent. Tento jev je vysvětlován vysokou rezistencí plů nebo jejich velkou mortalitou (Van der Knaap a Loker 1990, Thomson 1997 - cit. dle Zbikowska 2004). Příčina může být také v kompetici sporocyst schistosom s jinými motolicemi např. z čeledi Echinostomatidae. V plích infikovaných echinostomami se schistosomy většinou neprosadí (Kian 1973, Sousa 1992)

Tab. 2: Přehled ptačích schistosom vyskytujících se ve světě (Farley 1971, Yamaguti 1975 cit. dle Dvořák 2000, Khalil 2002, Kolářová a kol. 2006).

Rod	Rozšíření	Mezihostitel
<i>Austrobilharzia</i>	kosmopolitní	Prosobranchiata
<i>Macrobilharzia</i>	Severní a Jižní Amerika	neznámý
<i>Ornithobilharzia</i>	kosmopolitní	Prosobranchiata
<i>Bilharziella</i>	sever. polokoule	Pulmonata
<i>Trichobilharzia</i>	kosmopolitní	Pulmonata
<i>Jilobilharzia</i>	Asie	Pulmonata
<i>Allobilharzia</i>	Island	neznámý
<i>Gigantobilharzia</i>	kosmopolitní	Pulmonata, Opisthobranchiata
<i>Dendritobilharzia</i>	kosmopolitní	neznámý

Tab. 3: Přehled ptačích schistosom nalezených v České republice (vybraní autoři).

Druh	Mezihostitel	Definitivní hostitel	Nalezené stadium	Autor
<i>Bilharziella polonica</i>	<i>Planorbarius corneus</i>		cerkárie	Žďárská 1963, Gelnar 1980, Našincová 1992
<i>Bilharziella polonica</i>		<i>Anas clypeata, Anas crecca, Anas querquedula, Anas platyrhynchos, Aythya ferina, Aythya fuligula, Anser anser, Podiceps nigricollis, Podiceps cristatus, Ciconia ciconia, Ciconia nigra, Porzana parva, Ardea cinerea</i>	dospělec	Vojtek 1981, Kolářová a kol. 1997
<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>		<i>Anas acuta, Anas querquedula, Anas platyrhynchos, Aythya ferina, Cygnus olor, Fulica atra, Rallus aquaticus</i>	dospělec	Vojtek 1981, Kolářová a kol. 1997
<i>Gigantobilharzia acotylea</i>		<i>Larus ridibundus, Larus minutus, Sterna hirundo</i>	dospělec	Vojtek 1981, Kolářová a kol. 1997
<i>Gigantobilharzia sp.</i>	<i>Anisus vortex, Gyraulus albus, Segmentina nitida, Physa fontinalis, Physella sp.</i>		cerkárie	Rudolfová 2003
<i>Ornithobilharzia canaliculata</i>		<i>Sterna hirundo, Hydroprogne tschegrava</i>	dospělec	Vojtek 1981, Kolářová a kol. 1997
<i>Trichobilharzia franki</i>	<i>Radix auricularia</i>	Anseriformes	cerkárie, dospělec	Kolářová a kol. 1997
<i>Trichobilharzia regenti</i>	<i>Radix ovata, Radix peregra</i>	Anseriformes	cerkárie, dospělec	Dvořák 2000, Rudolfová 2003
<i>Trichobilharzia filiformis</i>		Anseriformes	dospělec	Rudolfová 2003
<i>Trichobilharzia sp.</i>	<i>Stagnicola palustris, Planorbarius corneus, Anisus vortex, Anisus leucostomus, Gyraulus albus</i>		cerkárie	Našincová 1992, Kolářová a kol. 1997

<i>Trichobilharzia szidati</i> *	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Anseriformes	cerkárie, dospělec	Kolářová 1997, Rudolfová 2003
----------------------------------	--------------------------	--------------	--------------------	-------------------------------

Vysvětlivky: * Dříve uváděný druh *Trichobilharzia ocellata* byl na základě molekulární analýzy ztotožněn s *Trichobilharzia szidati* (Rudolfová a kol. 2005).

Ptačí schistosomy jsou úzce specifické ke svému mezihostiteli, jímž je vždy plž. V ČR byly nalezeny cercárie schistosom pouze v plžích čeledi *Lymnaeidae*, *Planorbidae* a *Physidae* (podtřída Pulmonata, řád Basommatophora) viz Tab. 3 a 4

Ložek 1956 popisuje uvedené čeledi plžů následovně:

- a) Planorbidae – mají terčovitou pravotočivou ulitu vinutou v jedné rovině, jejíž kotouč je vpadlý. U plochých druhů se závity často vzájemně překrývají. Hlava a noha živočicha jsou poměrně malé, tykadla dlouhá a nitkovitá. Krevním barvivem je, na rozdíl od jiných čeledí, hemoglobin.
- b) Lymnaeidae - mají pravotočivou ulitu vejčitého tvaru, kotouč je vždy více či méně vyvýšený. Noha je mohutná, na hlavě jsou umístěna široká příústní makadla a krátká plochá tykadla trojúhelníkovitého tvaru. Krevním barvivem je hemocyanin.
- c) Physidae - mají levotočivou ulitu vejčitého tvaru, která je velmi tenkostěnná a lesklá. Noha živočicha je štíhlá, tykadla nitkovitá. Krevním barvivem je hemocyanin.

Tab. 4. Přehled mezihostitelů ptačích schistosom.

Čeď	Druh	Parazit	Autor
Planorbidae	<i>Planorbarius corneus</i>	<i>Bilharziella polonica</i>	1, 2, 3
Planorbidae	<i>Anisus vortex</i> , <i>Gyraulus albus</i> , <i>Segmentina nitida</i>	<i>Gigantobilharzia</i> sp.	6

Planorbidae	<i>Planorbarius corneus</i> , <i>Anisus vortex</i> , <i>Anisus leucostomus</i> , <i>Gyraulus albus</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp.	3, 4
Lymnaeidae	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	4
Lymnaeidae	<i>Radix ovata</i> , <i>Radix peregra</i>	<i>Trichobilharzia regenti</i>	5, 6
Lymnaeidae	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	4
Lymnaeidae	<i>Stagnicola palustris</i>	<i>Trichobilharzia</i> sp.	3, 4
Physidae	<i>Physa fontinalis</i> , <i>Physella</i> sp.	<i>Gigantobilharzia</i> sp.	6

Vysvětlivky: **1** = Žďárská (1963), **2** = Gelnar (1980), **3** = Našincová (1992), **4** = Kolářová a kol. (1997), **5** = Dvořák (2000), **6** = Rudolffová (2003)

2. 3. Charakteristika rodu *Trichobilharzia* sp.

V České republice jsou dokumentovány 4 druhy patřící do rodu *Trichobilharzia* – *T. franki*, *T. regenti*, *T. szidati* a *T. filiformis* (nalezen pouze dospělec u *Cygnus olor*) (Rudolffová 2003). Dříve hojně uváděný druh *T. ocellata* (evropský izolát z *Lymnaea stagnalis*) byl synonymizován s *T. szidati* (Rudolffová a kol. 2005).

Podle lokalizace v těle definitivního hostitele se schistosomy rozdělují na nazální a viscerální. Nazální druhy jsou frekventovaní paraziti ptáků střední Evropy (Rudolffová a kol. 2002). U hostitelů způsobují hemorhagie a záněty v nosní sliznici, poruchy rovnováhy, při silné infekci i parézy dolních končetin (hlavní migrační cesta do nosní dutiny vede přes míchu a mozek) (Horák a kol. 1998, 1999). Do této skupiny patří *T. regenti*.

Mezi viscerální druhy patří *T. franki* vyskytující se v jaterních a mezenteriálních cévách (nikdy se nevyskytuje přímo v oblasti střevní sliznice) a *T. szidati*, která jako dospělec žije přímo v oblasti střevní tkáně a jen výjimečně v mezenteriálních cévách (Neuhaus 1952).

Přestože jsou trichobilharzie frekventovaní paraziti ptáků, při parazitologické pitvě často unikají pozornosti díky své malé velikosti a nenápadnému zbarvení, které znesnadňuje jejich nalezení (Rudolfová a kol. 2002).

Životní cyklus trichobilharzií je dvouhostitelský. Definitivním hostitelem, ve kterém parazit dokončuje svůj vývoj, jsou vodní ptáci, často z řádu Anseriformes. Nově byl rod *Trichobilharzia* sp. nalezen též u *Motacilla alba* z řádu Passeriformes (Rudolfová a kol. 2006). Trichobilharzie, stejně jako ostatní schistosomy, mají úzkou mezihostitelskou specifitu (McLeod a Little 1942, Wu 1953 – cit. dle Rudolfová 2003). Jako mezihostitelé slouží pulmonární plži z čeledi Lymnaeidae. Starší nálezy schistosom (Našincová 1992) z plžů čeledi *Planorbidae* (rody *Anisus*, *Gyraulus*) patří zřejmě do rodu *Gigantobilharzia* (Rudolfová 2003).

Stadia životního cyklu :

- **Vajíčko:**

Tvar variabilní – buď protáhlý, zakřivený se dvěma zašpičatělými, různě dlouhými konci (kratší s háčkem) např. *T. szidati*, nebo vejčitý, např. *T. filiformis* (Horák a kol. 2002)

- **Miracidium:**

Líhne se z vajíčka buď ve vodě (*T. franki*, *T. szidati*) nebo již ve tkáni definitivního hostitele (*T. regenti*). Tvar miracidia je pyriformní, jeho povrch je opatřen ciliárními destičkami, které umožňují aktivní pohyb a vyhledání mezihostitele. Počet ciliárních destiček je 22 ve čtyřech řadách uspořádaných dle vzorce 6:9:4:3 (Blair a Islam 1983). V zadní části těla jsou soustředěny zárodečné buňky, v přední části těla je lokalizováno terebratorium s vývody penetračních žláz, sloužící k proniknutí do mezihostitele, jimž je vždy plž. Po proniknutí do mezihostitele transformuje miracidium svůj povrch a stává se z něj mateřská sporocysta.

- **Mateřská sporocysta:**

Protáhlý vakovitý útvar vznikající z miracidia. Je lokalizována v hlavonožní části plže. Zralé mateřské sporocysty produkují dceřiné sporocysty.

- **Dceřiná sporocysta:**

Protáhlý tvar, v přední části jsou u *T. szidati* lokalizovány ostny (Neuhaus 1952). Migruje z hlavonožní části do hepatopankreatu plže, kde produkuje cercárie. Prepatentní perioda (= od začátku infekce do doby produkce prvních cercárií dceřinými sporocystami) se liší u každého druhu (Neuhaus 1952, Meuleman a kol. 1984, Islam 1986).

- **Cercárie:**

Tělo je členěno na tělo a ocásek s furkou. Výraznými strukturami těla jsou oční skvrny, acetabulum a hlavový orgán s vývody penetračních žláz, které obsahují sekrety umožňující cercárii lepší průnik do definitivního hostitele. Cercárie opouštějící plže jsou obvykle pozitivně fototaktické. Spočívají na vodní hladině a po stimulaci aktivně vyhledávají a pronikají do definitivního hostitele, nejčastěji vrubozobého ptáka. Stimulem pro průnik cercárie jsou látky obsažené v kůži, např. nenasycené mastné kyseliny. Morfologicky jsou cercárie jednotlivých druhů trichobilharzií téměř nerozlišitelné. Jeden z mála determinačních znaků, tj. rozmístění sensorických papil, uvádí ve své práci Podhorský (2006).

- **Schistosomulum:**

Při průniku do kůže odhazuje cercárie ocásek a transformuje se na schistosomulum. Během prepatentní periody migruje parazit do místa své definitivní lokalizace (nazální sliznice, cévy v okolí střeva). Migrační cesty vedou buď přes periferní nervy, míchu a mozek (nazální druh *T. regenti*) nebo krevním řečištěm (viscerální druh *T. szidati*).

- **Dospělec:**

Tvar těla je podlouhlý, zadní konec často špachtlovitě rozšířený. Mají ústní a břišní (acetabulum) přísavku a sensorické papily v přední části těla. Jedinci jsou odděleného pohlaví. U samců na ventrální straně nalezneme *canalis gynaecophorus*. Živí se krví.

Cerkárie mohou pronikat i do nescifického savčího hostitele, včetně člověka. Způsobují kožní onemocnění nazývané cercáriová dermatitida. Poslední výzkumy ukazují (Horák a kol. 1998, 1999, Hrádková a Horák 2002), že cercárie *T. regenti* a *T. szidati* jsou schopné změnit se v tomto hostiteli ve schistosomulum, ale nemůžou zde úspěšně dokončit svůj vývoj.

2. 4. Vztahy mezi *Trichobilharzia* sp. a mezihostitelem

Schistosomy rodu *Trichobilharzia* jsou druhově specifické ke svým mezihostitelům, jimiž jsou, např. v České republice, plži čeledi *Lymnaeidae*. Pro životní cyklus parazita je nezbytné nalezení správného mezihostitele, penetrace do tkání a překonání imunitních reakcí plže.

2. 4. 1. Nalezení mezihostitele

Dospělci schistosom produkují vajíčka, z nichž se líhnou (díky změně osmotického tlaku a dalším stimulům) ve vnějším prostředí miracidia.

Protože miracidia nemají trávicí soustavu, jsou energeticky zcela odkázána na zásoby glykogenu, který štěpí v citrátovém cyklu. Po vyčerpání zásob miracidia hynou. Proto musí co nejrychleji najít svého mezihostitele. Šanci na jeho nalezení zvyšují miracidia svým chováním - po vylíhnutí se rozptýlí a plavou lineárně od místa líhnutí, což kromě zvýšené pravděpodobnosti nalezení vhodného plže zároveň snižuje riziko silných infekcí u

jednotlivých mezhohostitelů (Haas 2000 – cit. dle Horák a kol. 2002). K další orientaci jim slouží koncentrační gradient sloučenin vylučovaných sekrečně - exkrečním systémem plže („secreted/excreted products“, SEP)(Horák a kol. 2002). Miracidia jsou přitahována makromolekulárními složkami SEP – glykoproteiny, které se nazývají MAGs („miracidia attracting glycoproteins“)(Kalbe a kol. 2000). Poté co miracidia narazí na SEP, mění svou dráhu pohybu směrem k vyšší koncentraci SEP. Pohybují se tedy stále k plži. Po nalezení mezhohostitele následuje penetrace do jeho tkání pomocí proteolytických enzymů.

MAGs mají u různých druhů plžů podobnou peptidovou kostru, ale rozdílnou sacharidovou část. Parazité jsou schopni identifikovat rozdílné sacharidové části MAGs a podle toho si selektivně vybrat plže, kteří jsou vnímaví a zabezpečí jim úspěšný vývoj např. *T. franki* je schopna vývoje pouze v *R. auricularia* a *R. ovata*, nikoliv v dalších zástupcích čeledi *Lymnaeidae* (Kock 2001).

2. 4. 2. Vývoj parazita v plži

Během penetrace a po ní prochází miracidium transformací v mateřskou sporocystu, což je doprovázeno výraznými morfologickými a fyziologickými změnami. Tyto změny zahrnují odhození epiteliálních ciliárních destiček a formování syncytiálního tegumentu (neodermis). Ciliární destičky jsou často napadány vnitřním obranným systémem („internal defence system“, IDS) plže, proto je jejich odhození nezbytné pro přežití parazita. Transformační kroky jsou doprovázeny změnou povrchových antigenů (zejména sacharidů), což parazitovi umožní únik před IDS plže. Fyziologické změny zahrnují přeměnu aerobního metabolismu miracidí na fakultativně anaerobní u sporocyst, který jim dovolí přežít v různých částech plže (Tielens a kol. 1991, 1992).

Po transformaci migrují mateřské sporocysty ze subepidermální vrstvy do tkání hlavonožní oblasti plže. Zde se jejich germinální buňky mitoticky dělí, diferencují se tkáňe a

vzniká další vývojové stadium – dceřiná sporocysta. Mnoho mateřských sporocyst zůstává v místech své původní lokalizace, některé však migrují do ovotestis a žláz trávicího systému (hepatopankreas). Tyto oblasti jsou následně obsazovány dceřinými sporocystami. Některé mateřské sporocysty degenerují, jiné zůstávají nadále schopné produkovat dceřiné sporocysty. Z germinálních buněk dceřiných sporocyst se vyvíjejí cercárie, které po opuštění sporocysty migrují přes „krevní cévy“ obvykle do oblasti kolem plicního vaku a penetrují přes tělní stěnu plže ven (Horák a kol. 2002).

Vývoj v plži je závislý na teplotě. S rostoucí teplotou klesá délka prepatentní periody (doba od proniknutí miracidia do produkce cercárií) a vývoj parazita je rychlejší (Sluiters 1981, Zbikowska 2005). Nakažení plži se pravděpodobně pohybují v chladnější vodě, čímž snižují rychlost vývoje parazita, pohyblivost a množství cercárií, a tím i stupeň poškození epitelii při pronikání cercárií do vnějšího prostředí (Zbikowska 2005).

2. 4. 3. Vnitřní obranný systém (IDS) plžů

Pouze někteří plži jsou vhodnými mezihostiteli pro schistosomy. Prevalence infekcí v populacích plžů jsou nízké (Kolářová a kol. 1997).

Interakce ptačích schistosom a IDS plže jsou studovány zejména na modelu *T. szidati* a *L. stagnalis* (Horák a Kolářová 2005). IDS se skládá z buněčné a humorální složky. Hlavní roli v rozpoznávání patogena hrají zřejmě lektiny, buď v rozpustné formě nebo asociované s membránou obranných buněk (Horák a Van Der Knaap 1997).

IDS je vrozený obsahuje několik typů buněk, z nichž nejdůležitější jsou hemocyty. Tyto buňky se volně pohybují v hemolymfě, jsou schopné fagocytózy a vstupu do pojivových tkání (Adema a Van Der Knaap 1991 – cit. dle Horák a Kolářová 2005). Patogeny velikosti schistosomní larvy jsou tyto buňky schopné enkapsulovat a zničit pomocí lyzozomálních enzymů, radikálů kyslíku (Hahn a kol. 2001a) nebo oxidy dusíku (Hahn a kol. 2001b).

Trichobilharzia ocellata je schopná inhibovat některé funkce hemocytů, např. fagocytózu, enkapsulaci a likvidaci bakterií (Amen a kol. 1992, Adema a kol. 1994, Nuñez a kol. 1994).

Součástí obranných mechanismů plže jsou dvě molekuly produkované granulocyty pojivové tkáně obklopující mozkové ganglium (Horák a Kolářová 2005):

a) MDM („molluscan defence molecule“): Povzbuzuje fagocytickou funkci hemocytů. Množství MDM klesá v pozdějších fázích infekce (Hoek a kol. 1996).

b) Granularin: V době nákazy slouží jako opsonin, čímž aktivuje fagocytickou aktivitu. V průběhu infekce jeho množství roste (Smit a kol. 2004).

Ptačí schistosomy ovlivňují také metabolismus a neuroendokrinní systém meziphostitele. Změny neuroendokrinního systému mohou ovlivnit IDS, protože oba systémy spolupracují na udržení homeostáze. Vývoj cercárií je doprovázen uvolňováním neznámého parazitárního faktoru, který stimuluje plže k produkci schistosominu (Hordijk a kol. 1991). Schistosomin je antagonistou samičího gonadotropního hormonu kalfluxinu a blokuje vývoj bílkovinné žlázy (Hordijk a kol. 1991). Dále inhibuje aktivitu neuroendokrinních buněk zodpovědných za ovulaci a kladení vajec. Způsobuje tak „parazitární“ kastraci, která je doprovázena gigantickým růstem infikovaného plže (de Jong–Brink a kol. 2001).

T. ocellata způsobuje mechanické poškození meziphostitele, ale délka života nakažených a nenakažených plžů se neliší (Sluiter 1981). Parazit aktivně a výrazně mění vnitřní fyziologii plže – získává tak maximum živin a prostoru. Změny metabolismu zahrnují zvýšení srdeční a dýchací činnosti, změny v hladině proteinů, sacharidů, lipidů (Thompson 1997). Díky schopnosti využívání zdrojů meziphostitele k vlastnímu prospěchu a snižování jeho fitness k nule jsou ptačí schistosomy vážnými patogeny plžů.

2. 5. Radixové jako mezihostitelé motolic v ČR

Rod *Radix* patří mezi plicnaté plže (Pulmonata) čeledi Lymnaeidae. Mají jeden pár tykadel, na jejich bázi se nalézají jednoduché oči (skupina spodnoocí, Basommatophora). Krevním barvivem je hemocyenin. Ulita je tenko- nebo silnostěnná, pravotočivá. Plži obývají sladké stojaté nebo tekoucí vody.

Radixové se mohou vyskytovat v dixenním (= dvouhostitelský) nebo trixenním (= tříhostitelský) životním cyklu motolic jako první resp. druzí mezihostitelé. V případě dixenního cyklu jsou plži nakaženi volně plovoucími miracidii, u trixenního cercáriemi. V ČR se problematikou výskytu cercárií a metacercárií, zabývala především Našincová (1992). Nalezla u plžů motolice 11 různých čeledí. Jejich přehled je uveden v Tab. 5 (názvosloví plžů dle Našincová 1992)

Tab. 5: Přehled nalezených motolic v plžích rodu *Radix* (Našincová 1992).

Čeď	Motolice	Plž		
		<i>R. auricularia</i>	<i>R. peregra</i>	<i>R. ovata</i>
Notocotylidae	<i>Notocotylus attenuatus</i>	1		
Echinostomatidae	<i>Echinostoma revolutum</i>	2	1,2	2
	<i>Echinoparyphium aconiatum</i>	2	2	
	<i>Echinoparyphium recurvatum</i>		1,2	1,2
	<i>Hypodereum conoideum</i>	2	1,2	1,2
	<i>Moliniella anceps</i>	2	2	2
Plagiorchidae	<i>Plagiorchis maculosus</i>	1		
	<i>Plagiorchis neomidis</i>	1	1	1
	<i>Plagiorchis sp.</i>	1	1	
	<i>Opisthioglyphe ranae</i>	1	1,2	
	<i>Leptophallus nigrovenosus</i>		1	
Omphalometridae	<i>Neoglyphe locellus</i>	2	2	
Opecoelidae	<i>Sphaerostoma sp.</i>	2		
Sanguinicolidae	<i>Sanguinicola inermis</i>	1	1	

Diplostomatidae	<i>Diplostomum pseudospathaceum</i>	1	1	
	<i>Diplostomum paracaudatum</i>		1	1
Diplostomatidae	<i>Tylodephys clavata</i>	1		1
Strigeidae	<i>Cotylurus cornutus</i>		1,2	2
	<i>Apatemon gracilis</i>	1		
	<i>Cotylurus sp.</i>	2	2	
	<i>Apatemon burti</i>		1	
	<i>Australapatemon sp.</i>		1	
Cyathocotylidae	<i>Cyathocotyle bithyniae</i>	2	2	
Monorchiidae	<i>Asymphylogora sp.</i>	1	1	
Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia franki</i>	1		
	<i>Trichobilharzia regenti</i>		1	1

Vysvětlivky: 1 = první mezihostitel, 2 = druhý mezihostitel

2. 6. Experimentální nákazy plžů rodu *Radix*

Zatímco prací zabývajících se nálezy cercárií, případně metacercárií z volně žijících plžů je velké množství (např. Žďárská 1963, Vojtek 1981, Našincová 1992, Rudolfová 2003, Podhorský 2006, Horáčková 2007), experimentálním nálezům plžů taková pozornost věnována není. Výsledky pěti prací (Našincová 1992, Ward a kol. 1997, Faltýnková a kol. 2005, Horáčková 2007, Caron a kol. 2007) zaměřených na experimentální nákazy plžů rodu *Radix* (jako první i druzí mezihostitelé) jsou shrnuty v Tab. 6 a 7. Kromě poslední uvedené práce je velkým nedostatkem prací absence determinace plžů pomocí sekvenčních dat. Díky tomu nelze spolehlivě zjistit, s jakými plži autoři pracovali, a proto je interpretace výsledků diskutabilní (výjimkou je Caron a kol. 2007). Přesto experimentální nákazy dokazují, že radixové se např. mohou stát mezihostiteli *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna* na lokalitách, kde chybí nebo není příliš běžný jejich přirozený mezihostitel *Galba truncatula*

(Caron a kol. 2007, Horáčková 2007). Adaptace na jiného meziphostitele je významná pro šíření motolice na další území.

Tab. 6: Experimentální nákazy plžů rodu *Radix* jako prvních meziphostitelů motolic.

Plž	Motolice	Počet použitých plžů	% přeživších plžů	% plžů vylučujících cercárie	Autor
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Echinostoma revolutum</i>	15		3	1
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Echinostoma bolschewense</i>	20		0	1
<i>R. peregra</i>	<i>Fascioloides magna</i>	1457	21	42	2, 5
<i>R. labiata</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	neuveđeno	75	45*	3
<i>R. balthica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	neuveđeno	46	6,25*	3
<i>R. peregra</i>	<i>Diplostomum phoxini</i>	neuveđeno			4
<i>R. ovata</i>	<i>Diplostomum phoxini</i>	neuveđeno			4

Vysvětlivky: 1 = Našincová 1992, 2 = Horáčková 2007, 3 = Caron a kol. 2007, 4 = Ward a kol. 1997, 5 = Faltýnková a kol. 2005, *Číslo je součtem % plžů vylučujících cercárie a % plžů, u nichž byla nalezena jen intramoluskární stadia. *Radix balthica* cercárie vůbec nevylučoval.

Při nákaze plžů motolicí *Diplostomum phoxini* se odpověď plžů *R. peregra* a *R. ovata* liší. U *R. ovata* se častěji vyskytuje gigantismus, u *R. peregra* není rozdíl ve velikosti infikovaných a neinfikovaných plžů. Po infekci přežilo více jedinců *R. ovata* (Ward a kol. 1997).

Tab. 7: Experimentální nákazy plžů rodu *Radix* jako druhých mezihostitelů motolic (dle Našincová 1992).

Plž	Motolice	Výsledek infekce
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Echinostoma revolutum</i>	úspěšná
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Echinostoma spiniferum</i>	úspěšná
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Echinostoma bolschewense</i>	úspěšná
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Opisthioglyphe ranae</i>	neuvedeno
<i>R. auricularia</i>	<i>Neoglyphe locellus</i>	úspěšná
<i>R. peregra peregra</i>	<i>Cotylurus cornutus</i>	neuvedeno

2. 7. Problematika determinace plžů rodu *Radix*

Nejednotná taxonomie plžů neumožňuje přesně určit specifitu schistosom k mezihostiteli a vnímavost plže k parazitům. Velký počet jmen pro jednotlivé druhy plžů, jejich synonymizace a používání již zažitých jmen pro geograficky odlišné druhy popsané na základě molekulárních dat (např. *Radix peregra*) znesnadňuje orientaci v počtu mezihostitelů parazita.

Na základě morfologie ulit, která je velmi variabilní a závislá na podmínkách prostředí, v němž plž žije, bylo popsáno velké množství druhů, např. Kruglov a Staroborotov 1993, jejich validita je však nejasná. Kromě morfologických znaků se někteří autoři zaměřili

na determinaci pomocí pitvy pohlavní soustavy plže, ojediněle také podle zbarvení pláště (Jackiewicz 1993) a typu cívky (Jackiewicz 2000a). Tyto práce však nejsou komplexní, většinou zahrnují popis a výsledky určení jen u některých druhů rodu bez srovnání s ostatními.

Zcela nový pohled na systematiku plžů přinesla molekulární biologie, přičemž zpochybnila dosavadní determinace zejména podle morfologie ulity. Komplexní práce zahrnující všechny přístupy (morfologie, anatomie, molekulární biologie) však chybí.

Díky rozdílným přístupům k určování plžů existuje několik pojmenování pro jeden druh, což značně komplikuje srovnávání informací z literatury. Bez determinace plže molekulárními metodami není zcela jisté, s jakými organismy autoři skutečně pracovali. Proto Pfenninger a kol. (2006) navrhuje neřadit plže rodu *Radix* do druhů, ale spíše do skupin, které jsou charakterizované sekvenčními daty, tzv. MOTU („Molecularly Defined Operational Taxonomic Units“).

Různé pojetí platnosti jednotlivých druhů:



a) Ložek 1956: *R. auricularia* *R. p. ovata* *R. p. peregra* *R. p. ampla* *R. p. lagotis*

b) Buchar

a kol. 1995: *R. auricularia* *R. ovata* *R. peregra* *R. ampla*

c) Barges

a kol. 2001: *R. auricularia* *R. labiata* *R. ampla* *R. lagotis*

d) Pfenninger

a kol. 2006: *R.auricularia* *R.labiata* *R. lagotis*

ad a) V pojetí Ložka (1956) a Berana (ústní sdělení) jsou validními druhy *R. auricularia* a *R. peregra*. Ostatní tzv. druhy jsou jen poddruhy *R. peregra* lišící se tvarem ulity (závisí na podmínkách vnějšího prostředí), které mohou být velmi variabilní. Patří sem *R. peregra ampla*, *R.p. peregra*, *R. p. ovata* a *R. p. lagotis*.

ad b) Validními druhy jsou *R. auricularia*, *R. peregra*, *R. ovata* (Buchar a kol. 1995, Jackiewicz 2000b, Remigio 2002) a *R. ampla* (Buchar a kol. 1995, Glöer 2002)

ad c) Tzv. *R. peregra* vyskytující se v severní a střední Evropě je přejmenován na základě sekvence ITS2 oblasti na *R. labiata* (Bargues a kol. 2001). S tímto druhem synonymizují v Glöer a Zettler (2005) i názvy *R. alpicola* a *R. excerpta*. Druhu *R. ovata* žijící v severní a střední Evropě byl dán název *R. balthica*. Název *R. peregra* je nadále používán pro druh vyskytující se v západní a jižní Evropě (s ním ztotožněn druh *R. ovata* a *R. balthica* ze západní Evropy) a na Islandu (Glöer 2002, Glöer a Zettler 2005). Další validní druhy pro střední Evropu jsou *R. auricularia*, *R. ampla* a *R. lagotis*.

ad d) Validním druhem je *R. auricularia*, s nímž je ztotožněn druh *R. ampla*. Ve střední a severní Evropě se také vyskytují druhy *R. labiata* a *R. lagotis*. Rozšíření druhu *R. balthica* na území České republiky je nejasné, na základě sekvence nebyl zatím v ČR prokázán. Na základě genového toku informací bylo rozšíření druhu *R. balthica* prokázáno zatím jen na území západně od hranic ČR.

2. 7. 1. Determinace dle morfologie ulit

Jako rozlišovací znaky slouží zejména celkový tvar ulity, tvar ústí a poměr výšky ulity a ústí. Tyto znaky podléhají velkému vlivu prostředí (Ložek 1956, Beran 2002, Wullschleger a Jokela 2002, Pfenninger a kol. 2006) a mění se během ontogeneze plže (Ložek 1956). Z experimentálních pokusů s chovem plžů vyplynulo, že v laboratorních podmínkách tvar ulity radixů konverguje již v první nebo druhé generaci plžů (Wullschleger a Jokela 2002, Pfenninger a kol. 2006).

Z těchto důvodů je potřeba mít pro správnou determinaci větší počet jedinců z jedné lokality. Zatímco údaje o tvaru ulity a ústí se v literatuře vyskytují běžně (Ložek 1956, Buchar a kol. 1995, Jackiewicz 2000b, Glöer 2002), informace o poměru výšky ulity a ústí se vyskytují zřídka a jsou neúplné (Jackiewicz 2000b, Glöer 2002). Jediným zdrojem, který uvádí poměry ulity a ústí u všech zástupců, je Ložek (1956). Proto se v následujícím textu budu držet nomenklatury tohoto autora.

- a) *Radix auricularia*: Ústí široce opačně uchovité, horní okraj tvoří od svého nasazení jen slabě nahoru vyklenutý oblouk (často probíhá téměř vodorovně). Výška ústí obvykle trochu menší než výška ulity.
- b) *Radix peregra ampla*: Ústí široce opačně uchovité se zaoblenými obrysy, horní vnější okraj tvoří od svého nasazení výrazně nahoru vyklenutý oblouk, jehož nejvyšší bod leží často výše než vrchol kotouče ulity. Výška ústí je nepatrně menší nebo totožná a výškou ulity.
- c) *Radix peregra peregra*: Ústí úzce vejčité, nahoru zúžené. Vnější okraj vybíhá od svého nasazení trochu do strany, pak se náhle lomí prudce dolů. Výška ústí zabírá 30 – 40% výšky ulity (pozn. Glöer (2002) udává přes 60% výšky ulity).

- d) *Radix peregra ovata*: Ústí vejčité, vnější okraj se hned od svého nasazení stáčí mírně klenutým obloukem prudce dolů. Výška ústí neklesá pod 70% výšky ulity, běžně přesahuje 75%
- e) *Radix peregra lagotis*: Ústí vejčité, vnější okraj běží nejprve od svého nasazení téměř vodorovně a poté se klenutým obloukem stáčí pravidelně dolů. Výška ústí nepatrně přesahuje 60% výšky ulity.

Jednotlivé morfometrické charakteristiky se často překrývají a mohou se vyskytovat napříč druhovým spektrem rodu *Radix*. Proto plže nelze determinovat pouze na základě morfologie ulity (Pfenninger a kol. 2006).

2. 7. 2. Determinace podle morfologie a anatomie pohlavní soustavy

Plži rodu *Radix* jsou hermafrodité. Pro determinaci jsou nejdůležitějšími částmi pohlavní soustavy kopulační burza, stopka kopulační burzy, vagina, prostata, odvodné kanálky (vas deferens), falotéka, praeputium a penis.

Jackiewicz (1988) ve své práci uvádí, že na základě morfologie penisu je možné určit plže čeledi Lymnaeidae do podrodů. Nedostatkem studie je malé spektrum studovaných druhů čeledi (*Omphiscola glabra*, *Galba truncatula*, *Radix peregra*, *Radix ovata*, *Myxas glutinosa*, *Stagnicola palustris*, *Stagnicola occulta*, *Lymnaea corpus*, *Lymnaea stagnalis*). Penis pitvaných *R. auricularia* a *R. peregra* je stejný, velmi dlouhý a štíhlý (délka 14 krát větší než šířka báze penisu), pomalu se zužující k ostře hrotnatému konci (Jackiewicz 1988)

Druhy *R. auricularia*, *R. balthica* a *R. labiata* se od sebe liší zejména délkou stopky kopulační burzy a poměrem délky praeputia a falotéky (Glöer 2002)(viz Obr. 1). Determinační znaky pro ostatní druhy nejsou známe.

Znaky jednotlivých druhů :

Radix auricularia – poměr praeputium: falotéka 1 : 1, stopka kopulační burzy dlouhá a tenká, tvar kopulační burzy kulovitý

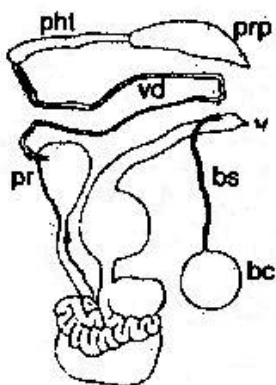
Radix labiata – poměr praeputium: falotéka 2 : 1, stopka kopulační burzy velmi krátká, tvar kopulační burzy kyjovitý

Radix balthica – poměr praeputium: falotéka 1 : 1, stopka kopulační burzy chybí, kopulační burza kyjovitá

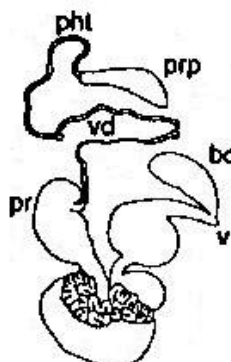
Vzhledem k obtížnosti nalezení těchto znaků je používají jen někteří autoři (Jackiewicz 2000b, Glöer 2002, Beran – ústní sdělení).

Obr. 1: Anatomie pohlavní soustavy plžů rodu *Radix*.

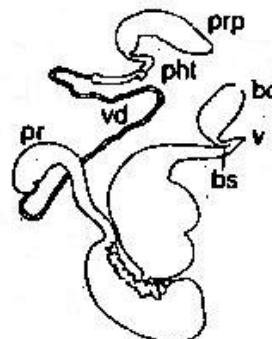
Radix auricularia



Radix balthica



Radix labiata



Vysvětlivky: bc = kopulační burza, bs = stopka kopulační burzy, pht = falotéka, pr = prostata, prp = praeputium, vd = odvodné kanálky (vas deferens), v = vagina (Glöer 2002, upraveno)

2. 7. 3. Determinace podle karyotypu a na základě molekulární analýzy

Radix labiata a *R. balthica* se liší počtem subtelomerických chromozómů - jeden pro *R. labiata* resp. pět pro *R. balthica* (Garbar a Korniuschin 2003). Informace o počtu

subtelomerických chromozómů u ostatních druhů rodu *Radix* Garbar a Korniuschin (2003) neuvádějí.

Fylogenetická analýza se provádí sekvenací genu pro malou ribozomální podjednotku (Bargues a kol. 1997), malou podjednotku mitochondriálního ribozomu (Remigio 2002), ITS2 oblasti (Bargues a kol. 2001), ITS1 oblasti a mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu (Pfenninger 2006). Nejčastěji se pro druhové a mezidruhové rozlišení nejen plžů rodu *Radix* používá analýza ITS2 oblasti, a to z důvodu její velké variability (např. Čepička a kol. 2006, Rudolfová a kol. 2005, Dvořák a kol. 2002).

Bargues a kol. (2001) provedli sekvenaci ITS2 oblasti u 66 populací jednoho severoamerického a 13 evropských druhů plžů čeledi Lymnaeidae. Délka ITS2 narůstá během evoluce čeledi, a proto byly za fylogeneticky nejstarší označeny *Radix* sp. a *Galba* sp. (370 – 406 párů bází), za nejmladší *Lymnaea* sp., evropské druhy rodu *Stagnicola* a *Omphiscola* (468 – 491 párů bází), což odpovídá i paleontologickému pohledu na fylogenezi skupiny. Analýza rozlišila dvě větve lymnaeidních plžů, kteří se vyskytují v Evropě:

a) *Lymnaea* sp. – *Stagnicola* sp. – *Omphiscola* sp.

b) *Radix* sp. – *Galba truncatula*: *Galba truncatula* je pravděpodobně bazální skupinou k rodu *Radix*. Bylo rozlišeno pět druhů rodu *Radix* – *R. auricularia* (dobře odlišitelná od ostatních radixů, byly nalezeny odlišnosti i mezi jednotlivými populacemi plže), *R. ampla* (potvrzena validita druhu), *R. peregra* (= *Radix ovata*, *Radix balthica*), *R. labiata*, *R. lagotis*. Na území ČR se vyskytují *R. auricularia*, *R. labiata* a *R. lagotis*. *Radix peregra* je rozšířen v západní Evropě (Francie, Holandsko, Španělsko) a na Islandu do 2000 m. n. m.

Fylogenetické stromy však byly sestaveny na základě sekvenace malého množství plžů (Horák – ústní sdělení), a proto nelze s jistotou říci, které druhy plžů se skutečně vyskytují na území ČR.

V roce 2006 provedli Pfenninger a kol. fylogenetickou analýzu plžů rodu *Radix* na použitím sekvence mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu a úseku ITS1 jaderné DNA. Gen pro cytochrom c oxidázu je velmi konzervativní. Mitochondriální geny se navíc dědí jen po mateřské linii tj. u jedince se vyskytuje jen jedna alela a nemohou rekombinovat, a proto se hodí pro analýzy, které chtějí zjistit tok genové informace na určitém území a objasnit tak velikost areálu a směr dalšího šíření druhu. Nejdůležitější výsledky práce jsou:

- a) popření validity *R. ampla* (její sekvence se shodují se sekvencemi *R. auricularia*)
- b) potvrzení výskytu *R. labiata*, *R. lagotis* ve střední Evropě
- c) nalezení dvou nových druhů ze švýcarských Alp
- d) diskuze nad otázkou rozšíření druhu *Radix balthica*. Autor předpokládá, že jeho areálem je jižní a západní Evropa, výskyt v střední Evropě (včetně ČR) zatím nebyl potvrzen, a to zejména pro nedostatek materiálu z tohoto území. Pokud by se na území ČR vyskytoval, pak by západní Čechy byly východní hranicí jeho areálu.

2. 8. Souhrnný popis druhů rodu *Radix*

Taxonomické postavení a validita jednotlivých popsanych druhů tohoto rodu je velmi nejasná (viz kapitola 2.3.). V následujícím popisu plžů, kteří by se měli vyskytovat na území ČR bude použita nomenklatura dle Glöer (2001), česká pojmenování dle Beran (2002). Údaje o poměru výšky ulity a výšky ústí, viz také kapitola 2. 7. 1. Morfologie ulity plžů rodu *Radix* zobrazuje Obr. 2.

Radix auricularia (Linnaeus, 1758) – uchatka nadmutá

Ulita: Uchovitě nadmutá s malým špičatým kotoučem s konkávními obrysnicemi, většinou přesahuje oblouk vnějšího okraje ústí. Tenkostěnná, křehká, průsvitná, lesklá, jemně

nepravidelně rýhovaná. Barva světle rohová. Závitů 3,5 – první dva slabě klenuté tvoří špičku kotouče, poslední závit převládá a tvoří velkou část ulity. Výška 25–31 mm, šířka 23–28mm.

Píštěl: Téměř zakrytá.

Cívka: Vinutá, v ústí vytvořen nápadný cívkový záhyb, strofostylní, lumen velmi malý (Jackiewicz 2000a).

Barva pláště: Velké světlé skvrny na tmavém podkladu, okraj pláště světlý s černou kresbou.

Výskyt: Větší, stojaté vodní plochy (rybníky, pískovny, slepá ramena řek) a také pomalu tekoucí vodní toky. Nejčastěji se vyskytuje v nadmořské výšce 150 – 250 m. n. m., nad 600 m. n. m. je vzácný. Rozšíření je palearktické.

Radix ampla (Hartmann, 1821) – uchatka široká

Ulita: Uchovitě nadmutá s velmi nízkým kupovitým kotoučem s konvexními obrysnicemi, často nepřesahuje oblouk vnějšího okraje ústí. Silnější a pevnější než u *R. auricularia*, průsvitná, lesklá, jemně nepravidelně rýhovaná. Barva světle rohová. Závitů 3–3,5, poslední vzrůstá velmi rychle. Výška 20–25 mm, šířka 19-25mm.

Píštěl: Úzká, otevřená nebo nedokonale zakrytá.

Cívka: Cívkový úsek bez záhybu, orthostylní.

Výskyt: Tekoucí vody, hlavně větší řeky, řídkěji i potoky, vzácně i ve vodních nádržích.

Rozšíření ve střední a východní Evropě.

Radix labiata (Rossmasler, 1835) – uchatka toulavá

Pro střední Evropu je synonymem *Radix peregra*.

Ulita: Špičatě vejčitá, špičatě kuželovitý kotouč s téměř rovnými obrysnicemi, poměrně silnostěnná, ale křehká, slabě průsvitná, matně lesklá, nepravidelně jemně rýhovaná až žebrovitá. Barva světle rohově hnědá. Závitů 4–5, mírně klenuté, všechny rostou rychle a

pravidelně, poslední nepravidelně klenutý a stlačený ze stran. Výška i šířka ulity značně kolísají.

Píštěl: Úzká, není zakrytá.

Cívka: Rovná, nevytváří záhyb, v dolní části výrazně rozšířená (Jackiewicz 2000a), lumen malý (Jackiewicz 2000a).

Barva pláště: Tmavý, s malými světlými tečkovitými skvrnami.

Výskyt: Potoky, prameny, tůňky, periodické tůňe s chladnou, oligotrofní a dobře prokysličenou vodou. Nejčastější výskyt v nadmořské výšce 200 – 800 m. n. m., mimo toto rozhraní ojediněle. Rozšířen je ve střední a jižní Evropě.

Radix lagotis (Schrank, 1803)

Ulita: Vejčítá se špičatě kuželovitým kotoučem, jehož první tři závitů mají obrysnice rovné nebo nepatrně konkávní, celkové obrysnice jsou vždy konkávní, tenkostěnná, křehká, mírně průsvitná, slabě lesklá, velmi jemně nepravidelně rýhovaná. Barva světle rohová. Závitů 4–5, všechny dobře pravidelně klenuté s hlubokým švem, poslední dosti nadmutý. Výška 15–17 mm, šířka 10–11 mm.

Píštěl: Úzká, není zakrytá.

Cívka: Cívkový úsek zřetelně odsazen od patra, buď rovný, nebo má náznak záhybu.

Výskyt: Luční příkopy, tůňe, stará říční ramena, nádrže, potoky a velké prameny. Rozšířený po celé Evropě.

Radix balthica (Linnaeus, 1758) – uchatka vejčítá

Pro střední Evropu je synonymem *Radix ovata*.

Ulita: Vejčítá se stlačeně kuželovitým kotoučem, tři závitů mají rovné obrysnice, tenkostěnná, křehká, slabě průsvitná, mírně lesklá, jemně až silněji nepravidelně rýhovaná.

Barva žlutá až narudle rohová. Závitů 4–4,5, mírně pravidelně klenutých, poslední převládá, ale není vytažený do stran. Výška 17-26 mm, šířka 11–18 mm.

Píštěl: Nedokonale zakrytá.

Cívka: Často náznak záhybu, cívkový úsek tvoří s patrovým téměř přímkou nebo slabý oblouk či velmi tupý úhel.

Barva pláště: Černý s tmavými kulovitými skvrnami, okraj světlý s tmavou kresbou.

Výskyt: Vegetací zarostlé stojaté vody, hlavně tůň, ramena řek a bažiny. Výskyt nejčastěji v nadmořské výšce 300 – 500 m. n. m. Nad 500 metrů výskyt ojedinělý. Palearktický druh.

Druhy *R. peregra* a *R. ovata* se jen vzácně vyskytují na lokalitě sympatricky, výjimkou je jezero Seeapsee ve Švýcarsku (Ward a kol. 1996). Rozdíly v biologii obou druhů byly zkoumány v laboratoři (Wullschleger a Jokela 2002). Na základě této práce a studie Ward a kol. (1997) byly popsány následující rozdíly mezi plži:

- a) Juvenilní plži *R. peregra* rostou výrazně rychleji než *R. ovata*.
- b) Reprodukce u *R. ovata* má výrazně pomalejší nástup. *R. peregra* klade vejce brzy na jaře, poté produkce klesá, u *R. ovata* je stejná po celý rok. V měkké vodě klade *R. peregra* vejce na prázdné ulity jedinců svého druhu (zajištění dostatku vápníku pro potomstvo) (Dussart 1976 – cit. dle Piggot a Dussart 1995).
- c) *Radix ovata* žije kratší dobu při nižší hladině vody, *R. peregra* při vyšší hladině vody. Experimentální křížení obou druhů bylo neúspěšné (Wullschleger – nepublikovaná data, cit. dle Wullschleger a Jokela 2002)

Obr. 2: Morfologie ulity plže z čeledi Lymnaeidae.



Vysvětlivky:

1, 2, 3 = závity ulity

4 = ústí ulity

5 = cívka ulity

6 = obústí ulity

3. METODIKA

3. 1. Sběr, vyšetřování a fixace plžů

3. 1. 1. Sběr

Plži rodu *Radix* byli sbíráni na lokalitách v Čechách a na Slovensku, převážně ve stojaté vodě (potoky byly v menšině). Sběr probíhal ručně; plži byli sbíráni z listů litorální vegetace, z předmětů ležících ve vodě a pod kameny. Malí plži (velikost ulity méně než 10 mm) sbírání nebyli z důvodu nedostatečně vyvinuté ulity, pohlavní soustavy a malé pravděpodobnosti nákazy motolicemi. Poté byli plži transportováni v označených plastových nádobách do laboratoře k vyšetření.

3. 2. 2. Vyšetřování

V laboratoři byli plži rozděleni po jednom jedinci do kádinek s odstátou vodou a osvětleni lampou. V případě nákazy začali plži vylučovat cercárie, které byly následně pozorovány pod binokulární lupou. Určování cercárií bylo zaměřeno na nalezení motolic z čeledi Schistosomatidae.

3. 3. 3. Fixace a uchovávání

Po vyšetření plžů bylo z každé lokality zpracováno 5-20 jedinců (výjimkou byly lokality, kde jsme našli méně než pět jedinců). Plži byli usmrceni v 10 ml 96% čistého etanolu, a poté uchováváni v označených plastových nádobkách (naleziště, datum sběru, počet fixovaných kusů) v 70% čistém etanolu pro pozdější zpracování.

3. 2. Determinace plžů pitvou pohlavní soustavy

K pitvě byli vybíráni plži s výškou ulity alespoň 10 mm. Celkem bylo pitváno pět jedinců z každé lokality (výjimkou byly lokality, kde bylo při sběru nalezeno méně než pět plžů). Pitva byla zaměřena pouze na samičí část pohlavní soustavy, a to z důvodu výraznějších mezidruhových rozlišovacích znaků (na rozdíl od samčí části pohlavní soustavy), a také z důvodu vhodnějšího anatomického uložení orgánů. Pitva byla zaměřena především na nalezení rozdílů (1) v tvaru a uložení kopulační burzy (*bursa copulatrix*) vzhledem k *corpus pyriforme*, a (2) v délce stopky kopulační burzy (*ductus bursa copulatrix*) mezi jednotlivými druhy plžů rodu *Radix*.

Vyšetřovaný plž byl vyndán z fixáže. Tělo bylo pomocí pinzety vytaženo z ulity, která byla následně označena číslem a uschována pro pozdější morfometrická měření (viz dále). Z těla plže byla odebrána tkáň (zadní část nohy a přední část pláště; fixace v 96% etanolu) na pozdější determinaci pomocí molekulárních metod. Poté byl plž na Petriho misce s vodou položen pod binokulární lupu. V této fázi pitvy byl hodnocen plášť (barva; přítomnost, velikost a zbarvení skvrn)

Po odstřížení pláště v přední části plášťové dutiny (viz Obr. 3) se odkryla samičí část pohlavních orgánů. Z *corpus pyriforme* byla opatrně odstraněna slabá vazivová blána zakrývající kopulační burzu a její duktus. Byl popsán tvar a uložení kopulační burzy vzhledem k *corpus pyriforme* a délka jejího duktu. V případě zjištění nákazy motolicemi (nález redií v oblasti pohlavní soustavy nebo sporocyst v hepatopankreatu) byl popsán stupeň poškození pohlavních orgánů.

Vypitvané tělo bylo vloženo do eppendorfky s 96% etanolem a uschováno pro možnost pozdějšího kontroly.

3. 3. Determinace pomocí sekvenace ITS2 oblasti

Pro determinaci plžů pomocí molekulárních metod byla zvolena nekódující oblast DNA ITS2 („internal transcribed spacer” 2). Na základě sekvencí byl zkonstruován fylogenetický strom.

3. 3. 1. Izolace DNA

DNA byla izolována podle přiloženého protokolu v kitu (QIAamp DNA MiniKit, QIAGEN). Koncentrace a čistota získané DNA byla měřena na „nanodropu“ (Spektrofotometr ND-100). Vzorke DNA byly uchovány při teplotě – 20⁰ C.

3. 3. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Z hodnot koncentrace DNA (ng/μl) zjištěné na „nanodropu“ byl vypočítán objem vzorku obsahující 50ng DNA, který byl napipetován do připravených 0,5 ml zkumavek . Z chemikálií byla namíchána směs: 2,5 μl pufru (10x NH₄ Reaction Buffer, Bioline,), 1μl 50mM MgCl₂ (Bioline), 2μl 2,5 mM dNTP (Bioline), 1μl Taq polymerázy (BioTaq Red DNA Polymerase, 500 U, koncentrace 1U/μl; Bioline), 0,5μl 10 mM primeru NEWS (5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3' dle Almeyda-Artigas a kol. 2000), 0,5μl 10mM primeru RIXO (5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3' dle Almeyda-Artigas a kol. 2000) a destilované vody do celkového objemu reakce 25μl. Po přidání směsi k DNA byl vzorek důkladně promíchán a vložen do termocykleru (MyCycler, Bio-Rad). Schéma PCR reakce: iniciace 30s 94°C, amplifikace - 30 cyklů (30s 94°C, 30s 50°C a 1 min 72 °C), ukončení 7 min. 72°C

3. 3. 3. Gelová elektroforéza

Po proběhnutí PCR reakce bylo 10 μ l vzorku použito pro gelovou elektroforézu (kontrola, zda amplifikace proběhla správně). Nejprve byl připraven gel: 0,4 g agarózy (Bioline) byl smíchán s 45 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (Bio-Rad). Do vzorku DNA byly přidány 2 μ l nanášecí pufru (5x DNA Loading Buffer Blue, Bioline) a 0,5 μ l SYBR Green I (Invitrogen). Jako standart byla použita směs 5 μ l High-Throughput Ladder I (Bioline) a 0,5 μ l SYBR Green I. Elektroforéza trvala 25 minut při 90 V (PowerPac UniversalTM, Bio-Rad).

Pokud se úspěšná amplifikace potvrdila na gelu, zbylý PCR produkt byl přečištěn pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Po přečištění byla měřena koncentrace a čistota DNA ve vzorku pomocí „nanodropu“. Poté byl přečištěný PCR produkt uchován při – 20° C.

3. 3. 4 Sekvence

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 50 ng přečištěného PCR produktu. Poté byl přidán 1 μ l 10 mM primeru (NEWS nebo RIXO) a voda do celkového objemu reakce 14 μ l. Poté byl vzorek předán do laboratoře sekvenace DNA (PřF UK, Viničná 7, Praha 2).

V případě úspěšné sekvenace byla získána dvě čtení ITS2 oblasti („forward“, „reverse“) pro každý vzorek. Sekvence byly prohlíženy v programu Chromas a srovnávány se sekvencemi v databázi NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Čtení byla složena do konečné sekvence pomocí programu Seqman z balíku DNASTAR (Lasergene) a ručně upravena.

Alignment byl vytvořen v programu BioEdit version 7. 0. 9. 0 (Hall 1999) a ručně upraven. Fylogenetický strom byl vytvořen metodou Neighbor-joining (distance LogDet) v programu PAUP 4. 0 b 10 (Swofford 1998). Věrohodnost větvení byla odhadnuta pomocí bootstrappingu s 1000 opakováním. Stromy byly následně upravovány v programech TreeView (Page 1996) a CorelDraw.

3. 4. Morfometrické určování ulit

Pro morfometrické měření ulity byli vybráni jedinci, od kterých již byla známa sekvence a pitevní výsledky, a to z důvodu zařazení plže do skupiny („druhu“), se kterou se dále pracovalo při vyhodnocování měření. Posuvným měřidlem byla měřena výška ulity, výška ústí, šířka ulity a šířka ústí (viz Obr. 21). Z naměřených hodnot byly vypočítány poměry výšky ulity a výšky ústí, výšky ulity a šířky ústí. Hodnoty byly zaznamenány do tabulky vytvořené v programu MS Excel. Rozdílné morfotypy v rámci jednoho „druhu“ byly fotograficky zdokumentovány (Olympus 550). Ulity byly označeny (naleziště, datum sběru, determinace – dle sekvence) a uchovány pro možnost dalších studií.

Získané údaje byly statisticky zpracovány v programu SPSS verze 16 Mgr. Alešem Kuběnou (Katedra filozofie a dějin přírodních věd, PřF UK, Praha). Pro zjištění, zda se jednotlivé skupiny od sebe liší, byl použit Multivariate general linear model (GLM) a jeho neparametrická obdoba Kruskal-Wallis test (nevyžaduje normální rozdělení ani homogenitu vzorků). Pro odlišení konkrétních skupin byly použity Post Hoc testy. Pro zjištění, zda lze určit plže do druhu pomocí tří vypočítaných poměrů, byla použita diskriminační analýza, která umožňuje přímou („original“) nebo zpětnou („cross-validated“) determinaci programem vybraných konkrétních jedinců. Při cross-validizačním testu je vybrán plž, který je zpětně

určován do skupiny resp. druhu. Při přímé determinaci program rovnou zařazuje plže do skupin, není zpětné určení. Následně program vyhodnotí úspěšnost determinace.

3. 5. Experimentální nákazy plžů

3. 5. 1. Chov plžů

V helmintologické laboratoři PřF UK je již dlouhou dobu zaveden chov *R. lagotis*, nově byl také zaveden chov *R. labiata*. Plži jsou chováni ve skleněných vzduchovaných akváriích, jsou každý druhý den krmeni listy hlávkového salátu, občas je přidán Tetramin. Akvária jsou čištěna jednou měsíčně, nově použitá voda je obohacena o CaCO₃ (pro utváření pevnější ulity).

3. 5. 2. Získání miracidíí a postup experimentální nákazy plžů

Osmidenní kachny byly nakaženy cercáriemi *T. regenti* (získány v rámci zaběhnutého laboratorního cyklu *T. regenti* od *R. lagotis* vyplouvací metodou). Kachny byly infikovány perkutánně (použito cca 300 cercárií po dobu ½ hodiny). Po uplynutí prepatentní periody (21 dní) byly kachny utraceny, nosní sliznice byly odebrány a umístěny do Petriho misky s vodou, kde se začala uvolňovat miracidia.

3. 5. 3. Postup infekce plžů

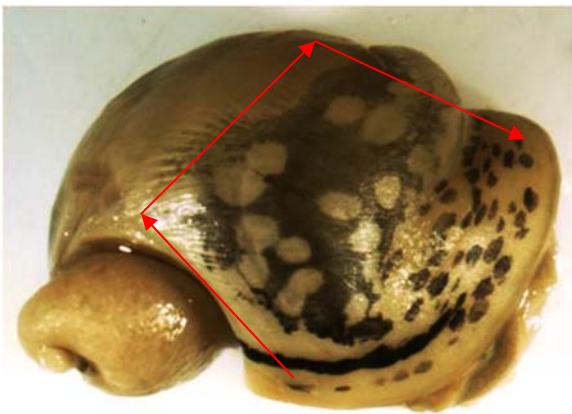
Pokus byl zaměřen na zjištění vnímavosti plžů k *T. regenti*. Pro experimentální nákazy byly použity dva druhy plžů, *Radix lagotis* a *Radix labiata* (oba druhy byly určeny pomocí sekvenace oblasti ITS2). Od každého druhu jsme infikovali 100 plžů, v kontrolní neinfikované skupině bylo 50 plžů. Pro oba druhy jsme pokus jednou zopakovali.

Do 24-jamkové destičky s vodou byli umístěni plži o velikosti 3 – 5mm. Ke každému plži byla přidána 3 - 4 miracidia. Plži byli ponecháni v jamce 3 - 4 hodin a poté umístěni do akvárií (do každého akvária padesát plžů) a standardně krmeni salátem. Prepatentní perioda nákazy je 4 – 6 týdnů (závislost na teplotě).

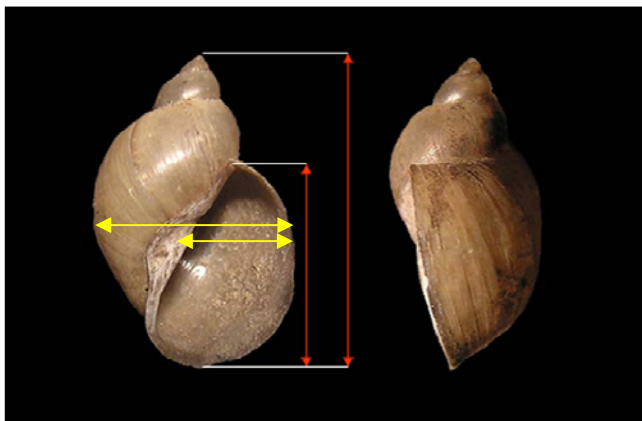
3. 5. 4. Vyšetřování plžů a vyhodnocování nákazy

Po uplynutí prepatentní periody byli plži vyšetřeni. Z hepatopankreatu plžů, kteří nevylučovali cercárie, byl připraven roztakový preparát pro ověření přítomnosti prepatentní fáze infekce.

Obr. 3: Znázornění řezů při otvírání plášťové dutiny.



Obr. 4: Znázornění měřených částí ulity.



Vysvětlivky:

červené šipky – rozměr výška ulity a
výška ústí

žluté šipky – rozměr šířka ulity a
šířka ústí

4. VÝSLEDKY

4. 1. Sběry plžů

Plži rodu *Radix* byli sbíráni v letech 2005 – 2008. Celkem byli nalezeni na 37 českých, 1 slovenské a 5 islandských lokalitách. Vzorky plžů byly determinovány pitvou pohlavní soustavy, sekvenací ITS2 oblasti a podle tvaru ulity. Přehled lokalit a počty sebraných a determinovaných plžů jsou uvedeny v Tab. 8.

České lokality se nacházejí především na území jižních a středních Čech, většinou se jedná o stojaté vody s bohatou pobřežní a litorální vegetací. Výjimky tvoří lokality vyznačené v Tab. 8.

Tab. 8: Seznam lokalit, počty sebraných a determinovaných plžů rodu *Radix*.

Oblast	Lokalita	GPS souřadnice lokalit	Počet sebraných/pitvaných/sekvenovaných
Příbramsko	Červený rybník, r. 2006	49°42'19.26''N, 14°6'25.27''E	40/5/3
	Červený rybník, r. 2007	49°42'20.73''N, 14°6'29.99''E	51/5/3
Brdy	Poněšice-Bedrná 8 ₁	nenalezeno	20/3/3
	Poněšice-Bedrná 8 ₄	nenalezeno	15/3/3
	Poněšice-Bedrná	nenalezeno	18/2/2
	*Poněšice, pramen Černého p.	nenalezeno	38/5/4
	Poněšice, Novoborský seník	nenalezeno	36/5/3
	#Sedliště S1-horní p.	nenalezeno	26/5/3
	#Sedliště S3-dolní p.	nenalezeno	23/5/3
	Poněšice - Libochovka	49°4'46.18''N, 14°29'9.01''E	2/1/1
	Poněšice	nenalezeno	23/4/3
	Boletice - lok. 6	nenalezeno	12/2/2
Poněšice - Bedrná 83	Poněšice - Bedrná 83	nenalezeno	31/5/3
	Boletice - lok. 12	nenalezeno	24/5/3
	*VP-Brdy, Octárna-potok	49°42'56.37''N, 13°55'32.63''E	65/5/3
	VP-Brdy, Octárna-tůňka	49°43'0.59'', 13°55'35.12''E	5/2/2
	Brdy-rybník 3	nenalezeno	23/5/1
	Praha	*Prager	50°0'38.69''N, 14°30'35.17''E
chovy PŘF UK 1		50°4'20.08''N, 14°25'27.03''E	15/4/3
chovy PŘF UK 2		50°4'20.08''N, 14°25'27.03''E	15/4/3

Plánsko	Labutí rybník	49°52'27.96''N, 12°43'7.48''E	2/1/1
Stříbrsko	Bonětický rybník	49°40'3.49''N, 12°48'30''E	54/5/3
Blatensko	Podkadovský rybník	49°24'32.65''N, 13°47'37.32''E	5/1/1
	Žoldánka	49°24'43.11''N, 13°49'12.06''E	86/5/3
	Protivský rybník	nenalezeno	32/5/3
Třeboňsko	Lhotka	48°51'26.38''N, 14°41'31.81''E	6/3/3
	Handlíř	48°51'13.95''N, 14°42'36.13''E	5/2/1
	Velký Klínský rybník	nenalezeno	286/5/3
	Linda	48°53'36.72''N, 14°40'15.45''E	105/5/3
	Kunžak	49°7'1.66''N, 15°11'54.89''E	13/4/2
Plzeňsko	Pětidomý (Čápský) rybník	49°50'19.13''N, 13°46'50.44''E	237/5/3
	Cekovský rybník	49°49'9.21''N, 13°45'27.86''E	234/5/3
Bruntálsko	Suchá Rudná	50°3'47.73''N, 17°21'43.47''E	20/5/4
Českobudějovicko	chovy PŘF České Budějovice	48°58'41.58''N, 14°26'47.26''E	20/2/2
	Pasečná, okr. Český Krumlov	48°36'35.66''N, 14°6'15.08''E	29/4/0
Blansko	Budkovan	49°19'50.79''N, 16°46'33.99''E	15/5/3
Jihlavsko	Vondra (Dačice)	49°5'9.94''N, 15°25'18.15''E	3/1/1
Děčínsko	*Krásná Lípa, potok	50°54'30.14''N, 14°30'5.55''E	42/5/4
Velká Úpa	*Úpa (Mladé Buky)	50°36'7.62''N, 15°50'25.93''E	12/5/3
Slovensko	Dunaj	nenalezeno	2/5/3
Island	Opnur	nenalezeno	6/2/2
	Osland	nenalezeno	5/2/2
	Kriutjörn	nenalezeno	3/2/2
	Akratjorn	nenalezeno	2/2/2
	Faunty Porde	nenalezeno	5/2/2

Vysvětlivky: * tekoucí voda, kamenité dno, # bahniště v lese, nenalezeno – GPS souřadnice
nenalezeny pomocí mapy na internetu (www.atlas.cz)

4. 2. Vyšetření plžů na přítomnost cercárií schistosom

Celkem bylo sebráno a vyšetřeno 1568 plžů. Cercárie motolic čeledi Schistosomatidae nebyly nalezeny u žádného z plžů. Plži z následujících lokalit nebyli vyšetřováni, neboť se jednalo o jedince z laboratorních chovů nebo o exempláře již fixované v etanolu (sběry E. Horáčková, P. Tlachač, L. Mikeš, K. Skirnisson): Boletice lok. 6 a 12, Poněšice - Bedrná 8₃, chovy PŘF UK, chovy PŘF České Budějovice, Budkovan, Úpa, Dunaj a islandské lokality.

Z ostatních motolic byly nejčastěji nalézány echinostomní cercárie a xiphidiocercárie, které nebyly blíže determinovány.

4. 3. Determinace plžů pitvou pohlavní soustavy

Celkem bylo vypitváno 158 plžů ze 43 lokalit (viz Tab. 8), determinovat se podařilo plže z 39 lokalit. Plži byli rozděleni do čtyř skupin podle tvaru kopulační burzy, délky jejího duktu a jejího uložení vzhledem ke *corpus pyriforme*.

Skupina A: Kopulační burza uložena na boku horní části *corpus pyriforme*. Tvar kulovitý, barva proměnlivá (bílá, narůžovělá, žlutá). Duktus kopulační burzy tenký, velmi dlouhý, obtáčející *corpus pyriforme* (Obr. 5, 9). Zbarvení pláště nejčastěji černé s velkými světle žlutými okrouhlými skvrnami v zadní části, v přední části světlý s malými černými skvrnami (Obr. 13). Morfologie pohlavních orgánů odpovídá popisu orgánů *R. auricularia* dle Glöer (2002).

Skupina B: Kopulační burza uložena na *corpus pyriforme* mezi vaginou a prostatou. Tvar hruškovitý, barva bílá nebo žlutá. Duktus silný, délka 0,5 až 1 délky kopulační burzy (Obr. 6, 10). Zbarvení pláště nejčastěji černé se světlými velkými nebo malými kulovitými skvrnami. Skvrny mohou chybět (Obr. 14). Dle osobního sdělení německých malakologů (Dr. Schniebs, Staatliche Naturhistorische Sammlungen Dresden Museum für Tierkunde, Drážďany) odpovídá morfologie pohlavních orgánů těchto plžů druhu *R. lagotis*

Skupina C: Kopulační burza uložena na *corpus pyriforme*. Tvar vejcovitý (oválný průřez), barva hnědá s tmavým mramorováním nebo žlutá. Duktus kratší než 0,5 délky kopulační burzy (Obr. 7, 11). Zbarvení pláště černé s drobnými světlými tečkami (Obr. 15). Morfologie pohlavních orgánů odpovídá popisu orgánů *R. labiata* dle Glöer (2002)

Skupina D: Kopulační burza uložena na *corpus pyriforme*, pod vaginou (Obr. 8). Tvar kulovitý, barva žlutá. Duktus dlouhý, tenký (Obr. 12). Plášť černý, v zadní části velké světlé skvrny, v přední části světlý s malými černými skvrnami (Obr. 16). Morfologie pohlavních orgánů neodpovídá žádnému publikovanému popisu orgánů plžů rodu *Radix*.

Obr. 5: Pohlavní soustava skupiny A.

Obr. 6: Pohlavní soustava skupiny B.



Obr. 7: Pohlavní soustava skupiny C.

Obr. 8: Pohlavní soustava skupiny D.

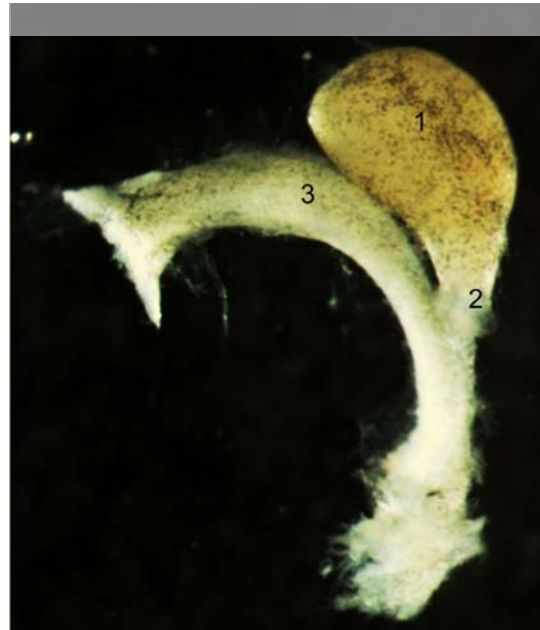


Vysvětlivky: 1 = kopulační burza; 2 = duktus kopulační burzy (Obr. 5, 6), vagina (Obr. 7, 8); *corpus pyriforme* (Obr. 8); 3 = *corpus pyriforme* (Obr. 5), vagina (Obr. 6); 4 = vas deferens

Obr. 9: Skupina A – detail samičí části pohl. soustavy.



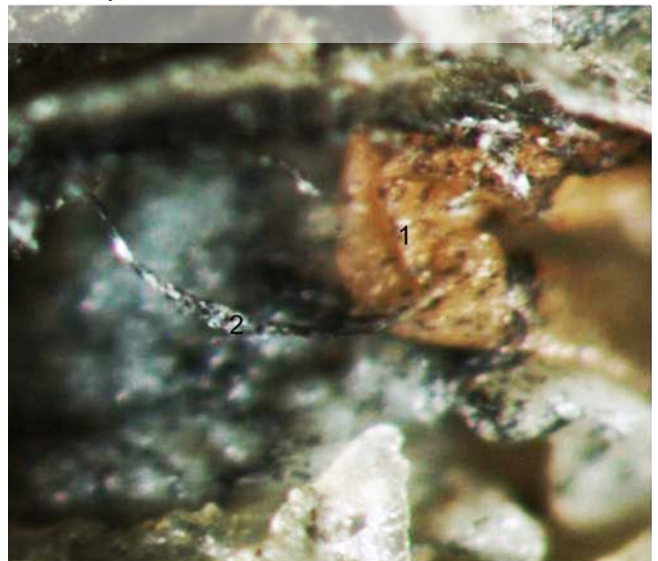
Obr. 10: Skupina B - detail samičí části pohl. soustavy.



Obr. 11: Skupina C - detail samičí části pohl. soustavy.

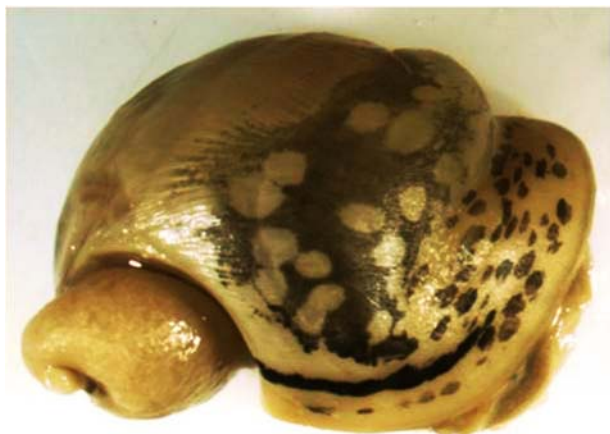


Obr. 12: Skupina D - detail samičí části pohl. soustavy.

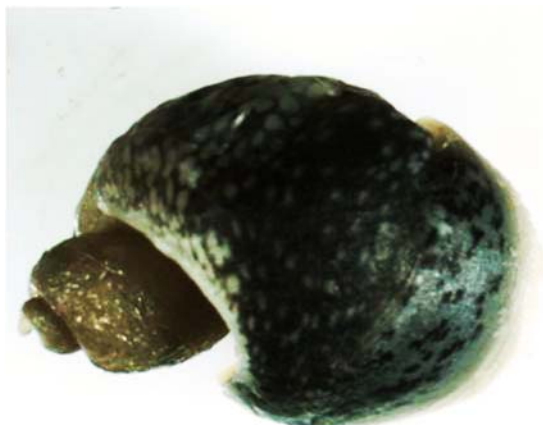


Vysvětlivky: 1 = kopulační burza; 2 = duktus kopulační burzy (Obr. 9, 10, 11), vagina (Obr. 12); 3 = vagina (Obr. 9, 10, 11)

Obr. 13: Zbarvení pláště plžů skupiny A.



Obr. 14: Zbarvení pláště plžů skupiny B.



Obr. 15: Zbarvení pláště plžů skupiny C.



Obr. 16: Zbarvení pláště plžů skupiny D.



U 13% plžů z uvedených lokalit (viz Tab. 8) byla při pitvě zjištěna infekce motolicemi (přítomnost rédií). Tyto jedince nebylo možno determinovat na základě výše uvedených znaků, protože jejich pohlavní orgány byly ve většině případů motolicemi zničeny. Masivní parazitace byla zjištěna zejména u plžů z islandských lokalit a lokality Brdy-rybník č. 3. Žádný plž z těchto lokalit nebyl pitevně determinován.

Občas byly u plžů během pitev v plášťové dutině nalézány pijavky rodu *Glossiphonia* (Obr. 17). U skupiny A byla kopulační burza výjimečně odlišně lokalizována (v prostřední

části těla, nikoliv z boku *corpus pyriforme*, Obr. 18). Tab. 9 shrnuje výsledky pitev u plžů z jednotlivých lokalit.

Tab. 9: Shrnutí výsledků pitev plžů rodu *Radix* z jednotlivých lokalit.

Lokalita	Označení pitvaných plžů	Skupina	Poznámka
Brdy-Červený rybník	57, 58 , 59 , 60, 61	A	60 - parazitace
Brdy-Červený rybník	91, 92 , 93 , 94, 95	A	
Prager	62, 63 , 64 , 65 , 66	A	
Kunžak	77 , 78 , 79, 80	A	80 - parazitace
Labutí rybník	89	A	
Bonětický rybník	98 , 99, 100, 101 , 102	A	
Pětidomý rybník	43.1 ,43.2, 43.3 ,43.4, 43.5	A	43.2 - parazitace
Cekovský rybník	53.1 , 53.2 ,53.3,53.4, 53.5	A	53.5 – juvenilní jedinec, neurčeno
Linda	57.1 , 57.2 , 57.3 ,57.4,57.5	A	
Lhotka	58.1 , 58.2 , 58.3	A	
Handlíř	59.1 ,59.2	A	
Velký klínský rybník	61.1 ,61.2, 61.3 ,61.4, 61.5	A	61.1,61.2 - parazitace
Budkovan	62.1 ,62.2, 62.3 ,62.4, 62.5	A	
Dačice	96	A	
Dunaj	63.1 , 63.2 , 63.3 ,63.4,63.5	A	
Poněšice-Bedrná 81	1 , 2 , 3	B	
Poněšice-Bedrná 84	4 , 5 , 6	B	
Poněšice-Bedrná	12 , 13	B	13 – juvenilní jedinec, neurčeno
Poněšice,pramen Černého p.	14 , 15 , 16 , 17, 18	B	
Poněšice, Novoborský seník	19 , 20, 21, 22 , 23	B	
Žoldánka	24 , 25 , 26 , 27, 28	B	27 - parazitace
Sedliště S1-horní p.	35 , 36, 37, 38 , 39	B	
Sedliště S3-dolní p.	40 , 41, 42 , 43, 44	B	40 – parazitace 41 - typ C
chovy PŘF UK 1	81 , 82, 83 , 84	B	
chovy PŘF UK 2	85 , 86 , 87, 88	B	
Podkadovský rybník	90	B	
Poněšice - Libochovka	97	B	
Poněšice	103 , 104, 105 , 106	B	
Boletice - lok.6	107 , 108	B	
chovy PŘF ČB	109 , 110	B	
Poněšice - Bedrná 83	7 , 8, 9, 10 , 11	C	
Boletice - lok.12	29 , 30 , 31, 32 , 33	C	
VP-Brdy, Octárna-potok	45, 46 , 47, 48 , 49	C	49 - parazitace
VP-Brdy, Octárna-tůňka	50 , 51	C	

Krásná Lípa - potok	52, 53, 54, 55, 56	C	55 - parazitace
Protivský rybník	55.1,55.2,55.3,55.4,55.5	C	
Pasečná	73, 74, 75, 76	C	
Suchá Rudná	65.1,65.2,65.3,65.4,65.5	C	
Mladé Buky	64.1,64.2,64.3,64.4,64.5	D	

Vysvětlivky: U plžů, kteří jsou vyznačení tučně, byla sekvenována ITS2 oblast

Obr. 17: Pijavka rodu *Glossiphonia* nalezená v plášťové dutině plže.



Obr. 18: Atypické uložení kopulační burzy u skupiny A.



Vysvětlivky:

1 – kopulační burza

2 – corpus pyriforme

4. 4. Determinace podle sekvenace ITS2 oblasti

Celkem byly sekvenovány ITS2 oblasti ribosomální DNA 107 plžů ze 42 lokalit (Tab. 8 a 9). Pro každého plže byly získány dvě sekvence („forward“ a „reverse“). Celkem tedy bylo získáno 214 sekvencí.

Po zkonstruování fylogenetického se sekvence rozdělily do čtyř skupin (Obr. 19a, 19b). Srovnáním získaných sekvencí s databází NCBI jsme jednotlivým skupinám přidělili druhové označení *Radix auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* (dle sekvencí publikovaných Barges a kol. 2001). Porovnali jsme výsledky získané pitvou a sekvenací a zjistili jsme, že determinace plžů na základě sekvencí není shodná s determinací pomocí pitev pohlavních orgánů (Obr. 19b, Tab. 10).

Tab. 10: Srovnání determinace plžů rodu *Radix* dle sekvenace a pitev.

lokality	označení pitvaných plžů	dle pitev	dle sekvenace
Brdy-Červený rybník	57, 58, 59, 60, 61	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Brdy-Červený rybník	91, 92, 93, 94, 95	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Prager	62, 63, 64, 65, 66	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Kunžak	77, 78, 79, 80	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Labutí rybník	89	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Bonětický rybník	98, 99, 100, 101, 102	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Pětidomý rybník	43.1,43.2,43.3,43.4,43.5	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Cekovský rybník	53.1,53.2,53.3,53.4,53.5	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Linda	57.1,57.2,57.3,57.4,57.5	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Lhotka	58.1,58.2,58.3	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Handlíř	59.1,59.2	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Velký klínský rybník	61.1,61.2,61.3,61.4,61.5	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Budkovan	62.1,62.2,62.3,62.4,62.5	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Vondra	96	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Dunaj	63.1,63.2,63.3,63.4,63.5	<i>R. auricularia</i>	<i>R. auricularia</i>
Poněšice-Bedrná 81	1, 2, 3	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Poněšice-Bedrná 84	4, 5, 6	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Poněšice-Bedrná	12, 13	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>

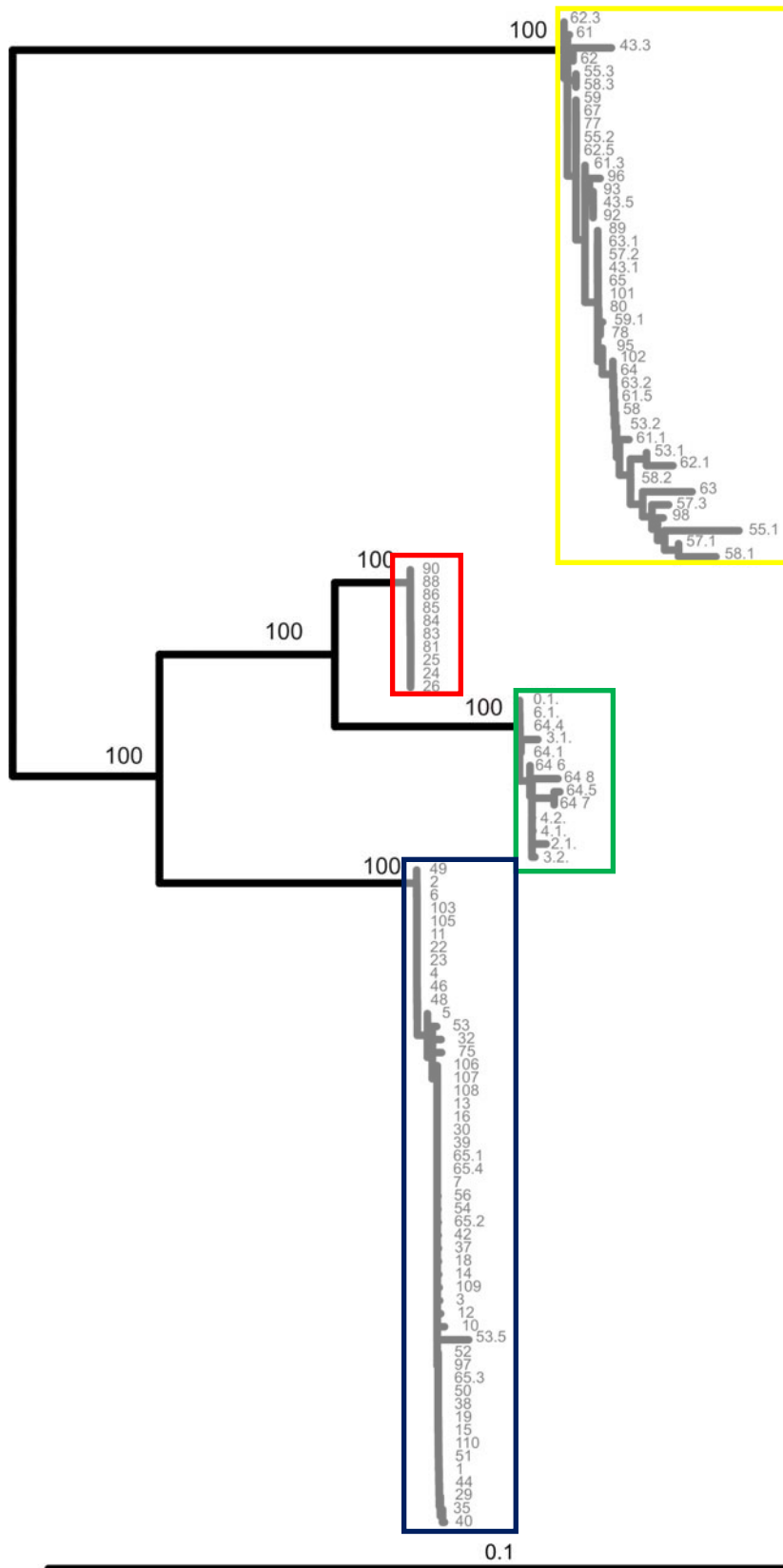
Poněšice, pramen Černého p.	14, 15, 16, 17, 18	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Poněšice, Novoborský seník	19, 20, 21, 22, 23	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Žoldánka	24, 25, 26, 27, 28	<i>R. lagotis</i>	<i>R. lagotis</i>
Sedliště S1-horní p.	35, 36, 37, 38, 39	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Sedliště S3-dolní p.	40, 41, 42, 43, 44	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
chovy PŘF UK 1	81, 82, 83, 84	<i>R. lagotis</i>	<i>R. lagotis</i>
chovy PŘF UK 2	85, 86, 87, 88	<i>R. lagotis</i>	<i>R. lagotis</i>
Podkadovský rybník	90	<i>R. lagotis</i>	<i>R. lagotis</i>
Poněšice - Libochovka	97	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Poněšice	103, 104, 105, 106	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Boletice - lok.6	107, 108	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
chovy PŘF ČB	109, 110	<i>R. lagotis</i>	<i>R. labiata</i>
Poněšice - Bedrná 83	7, 8, 9, 10, 11	<i>R. labiata</i>	<i>R. labiata</i>
Boletice - lok.12	29, 30, 31, 32, 33	<i>R. labiata</i>	<i>R. labiata</i>
VP-Brdy, Octárna-potok	45, 46, 47, 48, 49	<i>R. labiata</i>	<i>R. labiata</i>
VP-Brdy, Octárna-tůňka	50, 51	<i>R. labiata</i>	<i>R. labiata</i>
Krásná Lípa - potok	52, 53, 54, 55, 56	<i>R. labiata</i>	<i>R. labiata</i>
Protivský rybník	55.1,55.2,55.3,55.4,55.5	<i>R. labiata</i>	<i>R. auricularia</i>
Pasečná	73, 74, 75, 76	<i>R. labiata</i>	?
Suchá Rudná	65.1,65.2,65.3,65.4,65.5	<i>R. labiata</i>	<i>R. labiata</i>
Mladé Buky	64.1,64.2,64.3,64.4,64.5	*	<i>R. peregra</i>
Brdy-rybník 3	67	x	<i>R. auricularia</i>
Opnur	2.1, 2.2	x	<i>R. peregra</i>
Osland	3.1, 3.2	x	<i>R. peregra</i>
Kriutjörn	4.1, 4.2	x	<i>R. peregra</i>
Akratjorn	5.1, 5.2	x	<i>R. peregra</i>
Faunty Porde	6.1, 6.2	x	<i>R. peregra</i>

Vysvětlivky: Červeně jsou vyznačeny lokality, kde se lišil výsledek determinace plžů v závislosti na použité metodě; x = plži nebyli pitváni, ? = plži nebyli sekvenováni, * = v literatuře nebyl nalezen odpovídající popis

Nejčastěji nalézaným druhem byl *R. auricularia*, z nějž bylo získáno i nejvíce ITS2 sekvencí. Následovaly druhy *R. labiata*, *R. lagotis* a *R. peregra*. Na 12 lokalitách se neshodoval výsledek determinací pomocí pitvy a sekvenace, z toho na 11 lokalitách byl

převážně špatně určen druh *R. lagotis* (dle sekvencí *R. labiata*), v jednom případě se jednalo o *R. labiata* (dle sekvencí *R. auricularia*) viz Obr. 19b.

Obr. 19a: Phylogenetický strom znázorňující rozdělení jednotlivých plžů rodu *Radix* do skupin



Vysvětlivky:

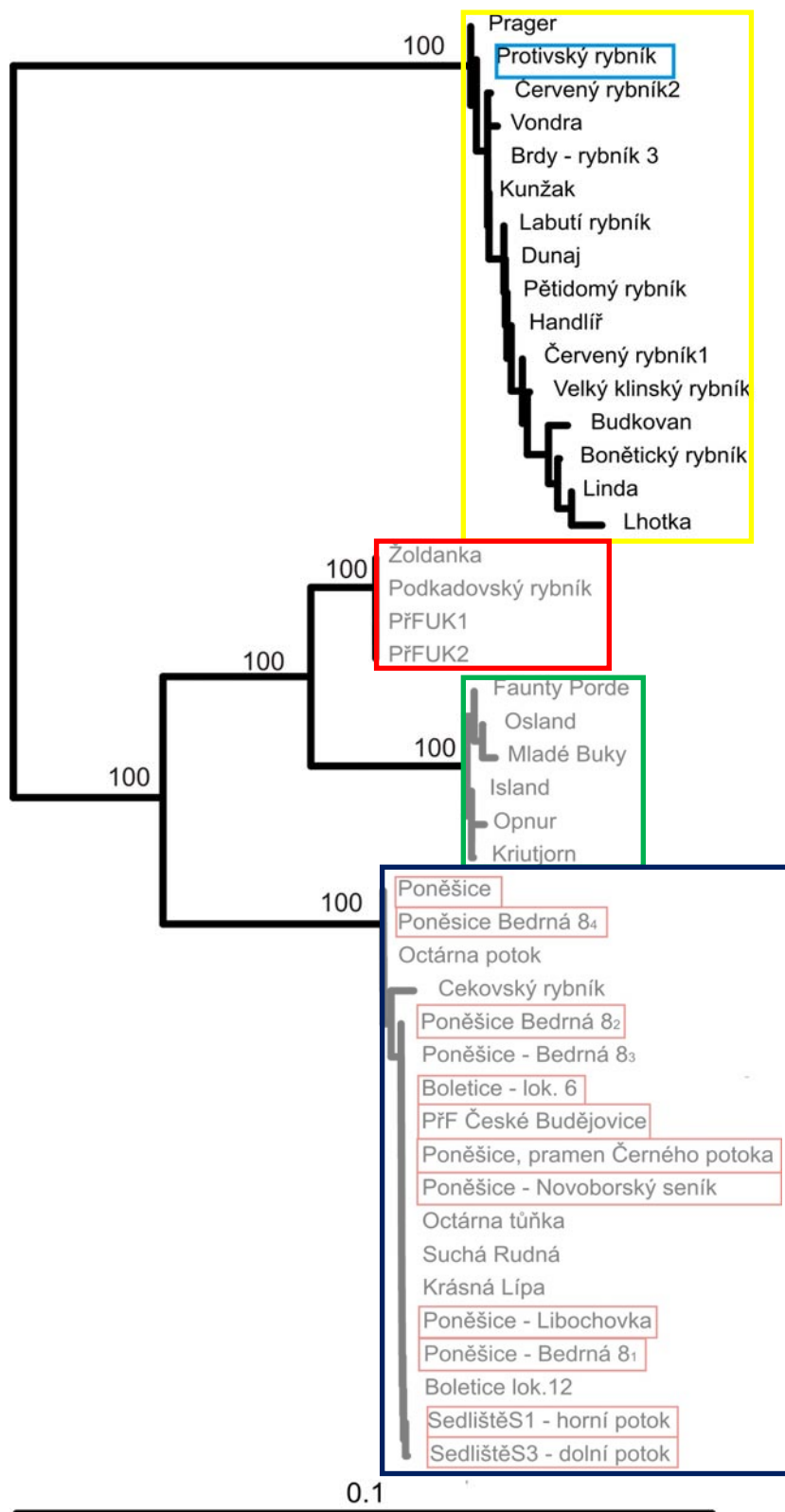
žlutý obdélník – *R. auricularia*

červený obdélník – *R. lagotis*

zelený obdélník – *R. peregra*

modrý obdélník – *R. labiata*

Obr. 19b: Fylogenetický strom znázorňující odlišný výsledek determinace plžů dle použité metody



Vysvětlivky:

žlutý obdélník – *R. auricularia*

červený obdélník – *R. lagotis*

zelený obdélník – *R. peregra*

tmavě modrý obdélník – *R. labiata*

světle modrý obdélník – plži
určení dle pitev jako *R. labiata*

světle červený - plži
určení dle pitev jako *R. lagotis*

Odlišnosti sekvencí jednotlivých druhů plžů na úrovni bází

pozice	7	20	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	52	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
<i>R. per.</i>	T	T	G	A	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	C	G	C	G	C	A	A
<i>R. lag.</i>	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	G	T	A	A	A	A	T	G	T	A	T
<i>R. lab.</i>	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	T	G	G	A	G	A	A	T	T	C
<i>R. aur.</i>	T	T	T	T	G	A	A	A	A	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	T	A	A
	65	66	67	68	69	70	71	72	73	75	76	78	79	80	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
	C	G	C	A	C	G	G	T	T	T	T	T	T	T	C	C	A	A	T	T	T	T	T	T	T
	C	-	-	-	-	-	A	A	A	T	T	T	A	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	A	C	A	A	C	T	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	T	T	-	-	T	T	T	C	C	T	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	99	108	110	113	115	116	117	118	120	121	122	123	124	127	143	146	147	148	149	150	159	161	169	170	175
	G	C	C	C	A		T	C	-	-	-	-	-	G	-	T	-	-	-	-	C	G	-	A	G
	T	C	C	C	A	A	T	C	-	-	-	-	-	G	-	T	-	-	-	-	A	G	-	A	C
	G	C	C	C	A	G	C	G	A	G	C	G	T	G	C	C	-	-	-	-	-	G	G	G	C
	G	T	T	T	T	C	A	A	-	-	-	-	-	T	T	T	T	C	C	C	-	A	T	G	T
	177	223	236	240	328	342	346	349	350	353	354	355	356	361	362	363	364	365	374	376	381	382	383	384	385
	T	A	G	-	A	G	G	A	C	G	C	A	A	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	A
	T	A	G	-	A	A	A	A	C	G	C	A	A	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	A
	T	A	G	-	A	A	A	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G
	A	T	C	T	T	A	A	-	-	A	-	-	C	G	A	C	A	T	A	A	A	T	G	A	G
	386	387	388	393	394	398	407	416	419	435	441	448													
	-	-	C	A	G	C	C	A	T	A	A	G													
	T	T	C	A	G	C	C	A	T	A	G	A													
	T	T	A	T	G	C	T	A	T	C	G	A													
	G	G	C	A	A	T	T	C	A	C	G	-													

Z výše uvedeného vyplývá, že sekvence plžů rodu *Radix* jsou bohaté na mnohonásobné

inzerce Charakteristické inzerce pro jednotlivé druhy jsou vyznačené červenou barvou.

Sekvence jedinců jednoho druhu jsou si velmi podobné, u *R. lagotis* jsou zcela identické viz

Obr. 19a,b.

4. 5. Determinace dle morfologie ulity

Celkem byly proměřeny ulity 145 jedinců. Ulity plžů z islandských lokalit měřeny nebyly (špatná fixace a dlouhé skladování způsobily křehkost ulit, které byly zničeny při pitvě).

Všechny zjištěné parametry jsou shrnuty v Tab. 11. Číslování ulit se shoduje s číslováním jedinců uvedených v tabulkách 8, 9, 10. Druhové označení plžů v této kapitole je odvozeno od výsledků sekvenace ITS2 oblasti. Variabilita ulit jednotlivých druhů je zdokumentována na Obr. 26 – 30. Fotografie dokazují, že ulity jednotlivých druhů jsou si velmi podobné. Ulity jednoho druhu z různých lokalit mohou vypadat dosti odlišně např. *R. auricularia* (Obr. 27).

Tab. 11: Výsledky měření parametrů ulit.

lokalita	číslo ulity	VUL (mm)	VUS (mm)	ŠUL (mm)	ŠUS (mm)	VUL/VUS	VUL/ŠUL	ŠUL/ŠUS
Chovy PŘF UK	81	12,5	9,1	7,3	6,3	1,37	1,71	4,59
Chovy PŘF UK	82	13,8	10,6	8,9	7,3	1,30	1,55	5,61
Chovy PŘF UK	84	11,1	7,6	6,1	5,1	1,46	1,82	3,49
Chovy PŘF UK	85	14,2	10,1	7,9	7	1,41	1,80	4,98
Chovy PŘF UK	87	12,2	8,9	7,1	6,3	1,37	1,72	4,60
Žoldánka	24	18,1	13,6	10,5	9,4	1,33	1,72	7,06
Žoldánka	25	15,9	11,3	8,9	7,6	1,41	1,79	5,40
Žoldánka	26	17	12,8	9,6	8,9	1,33	1,77	6,70
Žoldánka	27	18	14	10,1	9,5	1,29	1,78	7,39
Žoldánka	28	15,8	11,6	9,3	8	1,36	1,70	5,87
Prager	62	13,4	9,1	7,6	7,1	1,47	1,76	4,82
Prager	63	14,3	9,7	8	6,9	1,47	1,79	4,68
Prager	64	13,9	9,5	7,3	6,2	1,46	1,90	4,24
Prager	65	14,6	10	8	6,9	1,46	1,83	4,73
Prager	66	12	7,7	7	5,1	1,56	1,71	3,27
Kunžak	77	15,3	12,6	9,9	8,7	1,21	1,55	7,16
Kunžak	78	12,8	10,1	8	7,1	1,27	1,60	5,60
Kunžak	79	12,1	9,8	7,3	6,7	1,23	1,66	5,43
Kunžak	80	11,5	9,3	7,2	6,8	1,24	1,60	5,50
Červený rybník	57	16	13	10,1	9,4	1,23	1,58	7,64
Červený rybník	58	13,4	10,7	8	7,4	1,25	1,68	5,91
Červený rybník	59	14,9	11,9	9,4	8,7	1,25	1,59	6,95
Červený rybník	60	13,3	10,3	8,8	8	1,29	1,51	6,20
Červený rybník	61	13,7	11,1	9	8,2	1,23	1,52	6,64
Labutí rybník	90	15,3	12,1	9,8	9	1,26	1,56	7,12
Brdy-rybník 3	67	15	12	9,4	8,5	1,25	1,60	6,80
Boletice-lok.12	29	14,2	9	7,8	6,6	1,58	1,82	4,18
Boletice-lok.12	30	13,1	8,3	7,1	5,5	1,58	1,85	3,48
Boletice-lok.12	31	15,4	10	8,6	7,1	1,54	1,79	4,61
Boletice-lok.12	32	14,4	9	8,2	6,3	1,60	1,76	3,94

Boletice-lok.12	33	15,5	9,5	8,6	6,7	1,63	1,80	4,11
Sedliště S3-dolní potok	40	12,2	7,5	7	6	1,63	1,74	3,69
Sedliště S3-dolní potok	41	10,9	7,4	6,6	5,6	1,47	1,65	3,80
Sedliště S3-dolní potok	42	10,5	7	6,4	5,1	1,50	1,64	3,40
Sedliště S3-dolní potok	43	11,2	7,1	6,7	5	1,58	1,67	3,17
Sedliště S3-dolní potok	44	10,4	7	6,1	5	1,49	1,70	3,37
Sedliště S1-horní potok	35	12,6	8	7,5	6,2	1,58	1,68	3,94
Sedliště S1-horní potok	36	9,9	6,4	5,6	4,6	1,55	1,77	2,97
Sedliště S1-horní potok	37	8,9	6,1	5,4	4,3	1,46	1,65	2,95
Sedliště S1-horní potok	38	9,3	6,2	5,6	4,6	1,50	1,66	3,07
Sedliště S1-horní potok	39	9,1	5,5	5,4	4,3	1,65	1,69	2,60
VP Brdy-Octárna tůňka	50	11,7	7,2	6,9	5,7	1,63	1,70	3,51
VP Brdy-Octárna tůňka	51	11,2	7,2	6,4	5	1,56	1,75	3,21
VP Brdy-Octárna potok	45	16,1	10,1	9	7,3	1,59	1,79	4,58
VP Brdy-Octárna potok	46	15,2	9,7	8,3	7	1,57	1,83	4,47
VP Brdy-Octárna potok	47	13	9,2	7,3	5,6	1,41	1,78	3,96
VP Brdy-Octárna potok	48	12,9	8,2	7,5	6	1,57	1,72	3,81
VP Brdy-Octárna potok	49	12,3	8	7,1	5,5	1,54	1,73	3,58
Krásná Lípa, potok	52	15,5	9,9	8	6,7	1,57	1,94	4,28
Krásná Lípa, potok	53	15,1	9,6	7,8	6,4	1,57	1,94	4,07
Krásná Lípa, potok	54	12,8	7,8	7	5,7	1,64	1,83	3,47
Krásná Lípa, potok	55	13,2	8,1	7,2	5,6	1,63	1,83	3,44
Krásná Lípa, potok	56	15,1	8,9	7,5	6,3	1,70	2,01	3,71
Poněšice Bedrná	12	9,9	6,4	5,5	4,7	1,55	1,80	3,04
Poněšice Bedrná	13	8	5,3	4,8	3,7	1,51	1,67	2,45
Poněšice Bedrná 8₁	1	11,8	8,2	7,2	6	1,44	1,64	4,17
Poněšice Bedrná 8₁	2	11,1	8	7,2	6	1,39	1,54	4,32
Poněšice Bedrná 8₁	3	10	7,1	6,3	5,1	1,41	1,59	3,62
Poněšice Bedrná 8₄	4	9,1	6,6	5,1	4,1	1,38	1,78	2,97
Poněšice Bedrná 8₄	5	9	6,6	5,8	5	1,36	1,55	3,67
Poněšice Bedrná 8₄	6	7,8	5	4,9	4	1,56	1,59	2,56
Poněšice Bedrná 8₃	7	14,2	8,6	7,7	6,3	1,65	1,84	3,82
Poněšice Bedrná 8₃	8	11,9	8,1	6,9	5,5	1,47	1,72	3,74
Poněšice Bedrná 8₃	9	11,9	8	7	5,9	1,49	1,70	3,97
Poněšice Bedrná 8₃	10	11,8	8	6,9	5,8	1,48	1,71	3,93
Poněšice Bedrná 8₃	11	11,3	7,9	7	5,6	1,43	1,61	3,92
Poněšice, Novoborský seník	19	13,1	8,3	7,3	6,3	1,58	1,79	3,99
Poněšice, Novoborský seník	20	12	7,3	6,8	5,2	1,64	1,76	3,16
Poněšice, Novoborský seník	21	11,4	7,3	6,3	5,4	1,56	1,81	3,46
Poněšice, Novoborský seník	22	11,6	7,4	6,5	5,6	1,57	1,78	3,57
Poněšice, Novoborský seník	23	11,2	7,4	6,3	5,3	1,51	1,78	3,50
Poněšice, pramen Černého potoka	14	11,5	8	6,9	5,4	1,44	1,67	3,76
Poněšice, pramen Černého potoka	15	10,3	7	5,5	5,1	1,47	1,87	3,47
Poněšice, pramen Černého potoka	16	9,7	7,3	6	4,4	1,33	1,62	3,31
Poněšice, pramen Černého potoka	17	11,1	7,2	6,4	5	1,54	1,73	3,24

Poněšice, pramen Černého potoka	18	10,2	7,1	6,1	4,6	1,44	1,67	3,20
Chovy PřF JU, ČB	109	13,9	9,2	8	6	1,51	1,74	3,97
Chovy PřF JU, ČB	110	13,4	9	7,5	5,6	1,49	1,79	3,76
Poněšice	103	13,3	8,6	7,7	6	1,55	1,73	3,88
Poněšice	104	12,9	9,5	7,3	6	1,36	1,77	4,42
Poněšice	105	13	8,3	7,3	5,7	1,57	1,78	3,64
Poněšice	106	12,1	8,1	7,1	5,9	1,49	1,70	3,95
Boletice lok. 6	107	15,1	9,1	8,1	6,6	1,66	1,86	3,98
Boletice lok. 6	108	14,1	8,8	8	6,8	1,60	1,76	4,24
Poněšice Libochovka	97	9,1	6	5,3	4,4	1,52	1,72	2,90
Dačice	96	11,9	9,7	7,4	7	1,23	1,61	5,71
Bonětický rybník	98	18,9	15	12,1	11,2	1,26	1,56	8,89
Bonětický rybník	99	19,3	15,8	13,7	11,9	1,22	1,41	9,74
Bonětický rybník	100	13,9	10,7	14	7,8	1,30	0,99	6,00
Bonětický rybník	101	17,3	13,6	11,8	10,1	1,27	1,47	7,94
Bonětický rybník	102	15,1	12,1	10,3	8,8	1,25	1,47	7,05
Červený rybník	91	16,4	13	10,9	9,5	1,26	1,50	7,53
Červený rybník	92	19	15	12,9	11	1,27	1,47	8,68
Červený rybník	93	16,1	12,9	9,7	9,2	1,25	1,66	7,37
Červený rybník	94	21,1	17	13,6	12	1,24	1,55	9,67
Červený rybník	95	15,1	11,4	10	8,6	1,32	1,51	6,49
Budkovan	62.2	19	15,4	11,7	11	1,23	1,62	8,92
Budkovan	62.3	16,6	13,3	11,4	9,6	1,25	1,46	7,69
Budkovan	62.1	20,4	16,7	15,1	12,3	1,22	1,35	10,07
Budkovan	62.5	19,4	17	13,1	11,8	1,14	1,48	10,34
Budkovan	62.4	19,1	16,2	13,2	11,5	1,18	1,45	9,75
Pětidomý rybník	43.2	16,8	14,1	10,8	9,9	1,19	1,56	8,31
Pětidomý rybník	43.4	16,3	14	10,7	9,6	1,16	1,52	8,25
Pětidomý rybník	43.1	15,1	12,1	10	8,7	1,25	1,51	6,97
Pětidomý rybník	43.3	16,7	13,1	10,6	9,2	1,27	1,58	7,22
Pětidomý rybník	43.5	16	13,2	10,2	9	1,21	1,57	7,43
Linda	57.5	14,4	11,9	8,9	7,7	1,21	1,62	6,36
Linda	57.3	18,9	14,2	11,3	10,3	1,33	1,67	7,74
Linda	57.2	12,1	9,9	7,9	7	1,22	1,53	5,73
Linda	57.4	17	13,2	10	9,6	1,29	1,70	7,45
Linda	57.1	17,9	14	11,5	9	1,28	1,56	7,04
Cekovský rybník	53.1	18	14,5	11	9,6	1,24	1,64	7,73
Cekovský rybník	53.2	16,5	13	11	9,4	1,27	1,50	7,41
Cekovský rybník	53.5	13,8	8,3	8	6,4	1,66	1,73	3,85
Cekovský rybník	53.4	14,5	9	8	6,5	1,61	1,81	4,03
Cekovský rybník	53.3	13,1	8,6	8,1	6,3	1,52	1,62	4,14
Handlír	59.3	18,1	13,3	11	9,3	1,36	1,65	6,83
Handlír	59.1	21,2	19	14,5	12,6	1,12	1,46	11,29
Handlír	59.2	21,3	17,2	14	12,3	1,24	1,52	9,93
Lhotka	58.3	17,2	14,1	11,7	10,2	1,22	1,47	8,36
Lhotka	58.1	19,7	17,7	14,2	13,8	1,11	1,39	12,40
Lhotka	58.2	24	21,2	16,6	14	1,13	1,45	12,37
Velký klínský rybník	61.5	16,2	12,6	9,9	9	1,29	1,64	7,00
Velký klínský rybník	61.1	14,7	12	9,5	8,3	1,23	1,55	6,78
Velký klínský rybník	61.3	17	13,4	10,2	9	1,27	1,67	7,09
Velký klínský rybník	61.4	14,9	11,6	9	7,5	1,28	1,66	5,84
Dunaj	63.2	15,6	13,2	10	8,5	1,18	1,56	7,19

Dunaj	63.5	12	10,4	8	7,5	1,15	1,50	6,50
Dunaj	63.3	12,9	9,7	7,9	7,2	1,33	1,63	5,41
Dunaj	63.4	11	8,9	7	6,3	1,24	1,57	5,10
Dunaj	63.1	18,4	16,3	13,4	11,7	1,13	1,37	10,36
Protivský rybník	55.1	23,2	20,3	17,3	15	1,14	1,34	13,13
Protivský rybník	55.5	18,8	15,9	14,8	11,6	1,18	1,27	9,81
Protivský rybník	55.3	23	20,9	17,9	16,4	1,10	1,28	14,90
Protivský rybník	55.4	22,2	19,3	15,5	14	1,15	1,43	12,17
Protivský rybník	55.2	20,4	18,4	14,9	13,2	1,11	1,37	11,91
Úpa, Mladé Buky	64.2	14	11,9	9,3	8,2	1,18	1,51	6,97
Úpa, Mladé Buky	64.3	12	10,2	8,9	8	1,18	1,35	6,80
Úpa, Mladé Buky	64.1	16	13,3	10	9,2	1,20	1,60	7,65
Úpa, Mladé Buky	64.4	13,8	11,4	8,2	8	1,21	1,68	6,61
Úpa, Mladé Buky	64.5	13,2	11,5	9,1	8,7	1,15	1,45	7,58

Vysvětlivky: Barevné označení koresponduje s umístěním plžů na společné větvi

fylogenetického stromu (viz Obr. 18); růžová - *R. lagotis*, žlutá - *R. auricularia*, modrá - *R.*

labiata, zelená - *R. peregra*; VUL - výška ulity, VUS - výška ústí, ŠUL - šířka ulity, ŠUS -

šířka ústí, VUL/VUS - poměr výšky ulity a výšky ústí, VUL/ŠUL - poměr výšky ulity a šířky

ulity, ŠUL/ŠUS - poměr šířky ulity a šířky ústí

Poměry rozměrů jednotlivých skupin plžů byly statisticky zpracovány programem SPSS verze 16 (viz kapitoly 4. 4. 1. až 4. 4. 3.).

4. 5. 1 Deskriptivní statistika

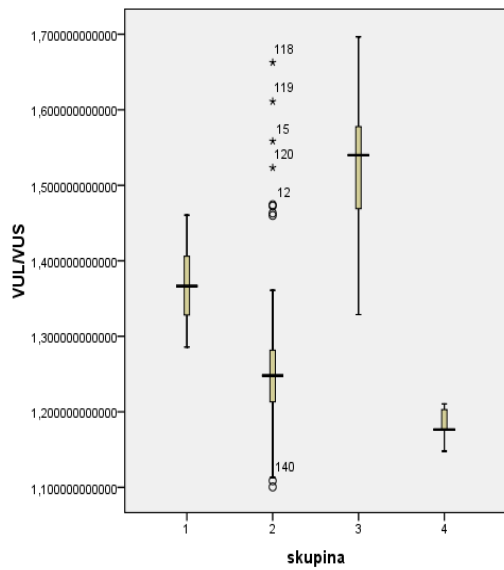
Tab. 12: Popisná statistika průměrů poměrů u jednotlivých skupin plžů rodu *Radix*.

Descriptive Statistics				
	sk.	Mean	Std. Deviation	N
VULWUS	1	1,36266368429724	,053153124851689	10
	2	1,26472073432977	,115048127652828	67
	3	1,52403304121531	,083964925612285	63
	4	1,18286021960272	,024901665463041	5
	Total	1,38131937060445	,161008539072701	145
VULŠUL	1	1,73606035696890	,077072020871085	10
	2	1,55024847098688	,142542568160868	67
	3	1,73618958259720	,093377843256777	63
	4	1,51743344612907	,129831929904715	5
	Total	1,64271973834537	,151185841463080	145
ŠULŠUS	1	5,56880375155301	1,225793459312636	10
	2	7,59043997486827	2,395587506299601	67
	3	3,63587803928136	,479922516152398	63
	4	7,12114822134387	,467911267987312	5
	Total	5,71664533388379	2,535214014783990	145

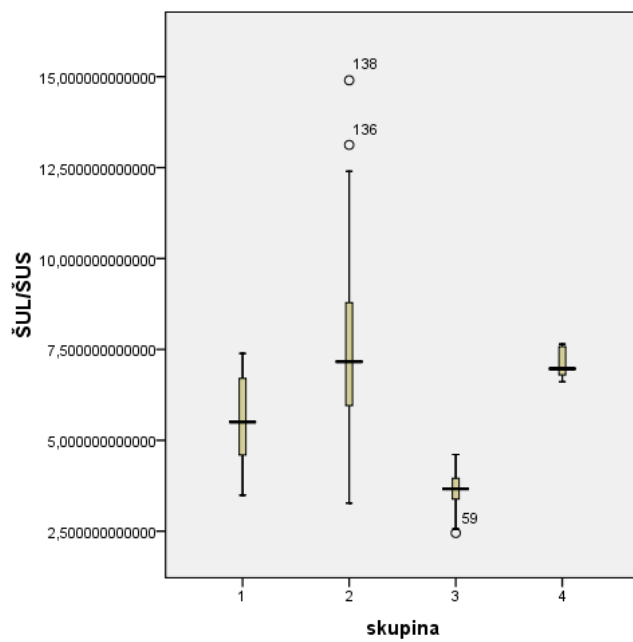
Vysvětlivky: 1 – *Radix lagotis*, 2 - *R. auricularia*, 3 - *R. labiata*, 4 - *R. peregra*, Mean = průměr hodnot jednotlivých poměrů, Std. Deviation = standardní odchylka, N= počet měřených plžů z každé skupiny.

Mediány hodnot jednotlivých poměrů se u jednotlivých druhů liší, viz Obr. 20 – 22. Výjimkou jsou dvojice skupin 2 (*R. auricularia*) a 4 (*R. peregra*) pro poměr ŠUL/ŠUS viz Obr. 21; 1 (*R. lagotis*) a 3 (*R. labiata*) pro poměr VUL/ŠUL viz Obr. 22.

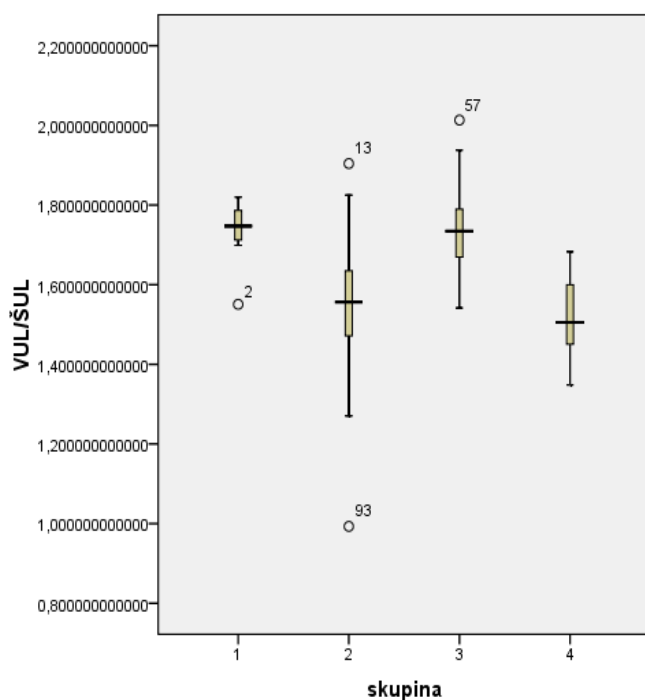
Obr. 20: Znázornění rozdílů mezi skupinami plžů v poměru výška ulity/výška ústí.



Obr. 21: Znázornění rozdílů mezi skupinami plžů v poměru výška ulity/výška ústí.



Obr. 22: Znázornění rozdílů mezi skupinami plžů v poměru výška ulity/šířka ulity.



4. 5. 2. „Multivariate general linear model“ (GLM)

Pro zjištění, zda se jednotlivé skupiny (druhy) mezi sebou liší ve výše uvedených poměrech, byl použit „Multivariate general linear model (GLM)“. Předpokladem pro jeho použití je normální rozdělení a homogenita vzorků. Normální rozdělení bylo potvrzeno testem dobré shody (Lack of fit test), homogenita vzorků byla ověřena Leveneho testem, který prokázal signifikantně narušenou homogenitu pro poměr ŠUL/ŠUS. Z tohoto důvodu bylo nutné použít ke GLM ještě Kruskal-Wallace test (neparametrická obdoba GLM).

Následná analýza GLM prokázala signifikantní rozdíl mezi skupinami ve zkoumaných poměrech ($p < 0,001$), a také silný vliv proměnné poměr na faktoru skupina. Tyto výsledky ukazují, že mezidruhová variabilita ve srovnání s vnitrodruhovou variabilitou je velká.

Pro odlišení konkrétních skupin byly použity Post Hoc testy. Prokázaly, že signifikantní odlišnost (hodnota Sig. větší než 0,05) není u poměru VUL/VUS pro skupiny 2 a 4; u poměru VUL/ŠUL pro skupiny 1 a 3, 2 a 4; u poměru ŠUL/ŠUS pro skupiny 1 a 4, 2 a 4. Z toho vyplývá, že *R. peregra* se signifikantně neliší v žádném poměru uvedeném poměru od *R. auricularia*.

Tab. 13: Výsledek Post Hoc testů.

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) skupina	(J) skupina	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
						LSD	
VUL/VUS	1	2	,09794294996747'	,033031099195248	,004	,03264272986420	,16324317007075
		3	-,16136935691807'	,033167002255104	,000	-,22693824805977	-,09580046577636
		4	,17980346469453'	,053367356665339	,001	,07429985683767	,28530707255139
	2	1	-,09794294996747'	,033031099195248	,004	-,16324317007075	-,03264272986420
		3	-,25931230688554'	,017099328866148	,000	-,29311650855553	-,22550810521555
		4	,08186051472705'	,045170917264631	,072	-,00743929398387	,17116032343798
	3	1	,16136935691807'	,033167002255104	,000	,09580046577636	,22693824805977
		2	,25931230688554'	,017099328866148	,000	,22550810521555	,29311650855553
		4	,34117282161259'	,045270390887112	,000	,25167636036510	,43066928286009
	4	1	-,17980346469453'	,053367356665339	,001	-,28530707255139	-,07429985683767
		2	-,08186051472705'	,045170917264631	,072	-,17116032343798	,00743929398387
		3	-,34117282161259'	,045270390887112	,000	-,43066928286009	-,25167636036510
VUL/ŠUL	1	2	,18581188598202'	,040400344046843	,000	,10594317368417	,26568059827986
		3	-,00012922562830	,040566567106595	,997	-,08032654952710	,08006809827051
		4	,21862691083983'	,065273624634946	,001	,08958542692174	,34766839475792
	2	1	-,18581188598202'	,040400344046843	,000	-,26568059827986	-,10594317368417
		3	-,18594111161032'	,020914192563773	,000	-,22728703744899	-,14459518577164
		4	,03281502485781	,055248557960951	,553	-,07640758907680	,14203763879243
	3	1	,00012922562830	,040566567106595	,997	-,08006809827051	,08032654952710
		2	,18594111161032'	,020914192563773	,000	,14459518577164	,22728703744899
		4	,21875613646813'	,055370224168547	,000	,10929299677661	,32821927615964
	4	1	-,21862691083983'	,065273624634946	,001	-,34766839475792	-,08958542692174
		2	-,03281502485781	,055248557960951	,553	-,14203763879243	,07640758907680
		3	-,21875613646813'	,055370224168547	,000	-,32821927615964	-,10929299677661
ŠUL/ŠUS	1	2	-2,02163622331526'	,576277364473950	,001	-3,16089709133072	-,88237535529980
		3	1,93292571227164'	,578648398410633	,001	,78897747260614	3,07687395193715
		4	-1,55234446979087'	,931074060425687	,098	-3,39301409809655	,28832515851482
	2	1	2,02163622331526'	,576277364473950	,001	,88237535529980	3,16089709133072
		3	3,95456193558690'	,298323592412414	,000	3,36479663194444	4,54432723922936
		4	,46929175352440	,788074807873106	,552	-1,08867814955899	2,02726165660778
	3	1	-1,93292571227164'	,578648398410633	,001	-3,07687395193715	-,78897747260614
		2	-3,95456193558690'	,298323592412414	,000	-4,54432723922936	-3,36479663194444
		4	-3,48527018206251'	,789810275308180	,000	-5,04667098536579	-1,92386937875922
	4	1	1,55234446979087'	,931074060425687	,098	-,28832515851482	3,39301409809655
		2	-,46929175352440	,788074807873106	,552	-2,02726165660778	1,08867814955899
		3	3,48527018206251'	,789810275308180	,000	1,92386937875922	5,04667098536579

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 2.890.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Vysvětlivky: 1 – *R. lagotis*, 2 – *R. auricularia*, 3 – *R. labiata*, 4 – *R. peregra*

4. 5. 3. Diskriminační analýza

Pro zjištění, zda lze na základě tří poměrů (VUL/VUS, VUL/SUL, SUL/SUS) zařadit plže do konkrétní skupiny (druhu), byla použita diskriminační analýza. Úspěšnost determinace byla 84,1%. Nejvyšší úspěšnost zpětného zařazení do výchozí skupiny při použití přímé metody byla v případě *R. labiata* (sk. 3) 98,4%, dále u *R. auricularia* (sk. 2) 88,1%. Nízká úspěšnost byla u *R. lagotis* (sk. 1) 10%, u *R. peregra* (sk. 4) dokonce 0%. Při „cross-validated“ analýze byla úspěšnost nižší: *R. labiata* 95,2%, *R. auricularia* 86,6%, pro *R. lagotis* a *R. peregra* byl výsledek stejný jako při přímém určení.

Tab. 14: Výsledek diskriminační analýzy.

Classification Results ^{bc}							
	skupina	Predicted Group Membership				Total	
		Radix lagotis	Radix auricularia	Radix labiata	Radix peregra		
Original	Count	Radix lagotis	1	8	1	0	10
		Radix auricularia	1	59	7	0	67
		Radix labiata	1	0	62	0	63
		Radix peregra	0	5	0	0	5
	%	Radix lagotis	10,0	80,0	10,0	,0	100,0
		Radix auricularia	1,5	88,1	10,4	,0	100,0
		Radix labiata	1,6	,0	98,4	,0	100,0
		Radix peregra	,0	100,0	,0	,0	100,0
Cross-validated ^a	Count	Radix lagotis	1	8	1	0	10
		Radix auricularia	0	58	9	0	67
		Radix labiata	2	1	60	0	63
		Radix peregra	0	5	0	0	5
	%	Radix lagotis	10,0	80,0	10,0	,0	100,0
		Radix auricularia	,0	86,6	13,4	,0	100,0
		Radix labiata	3,2	1,6	95,2	,0	100,0
		Radix peregra	,0	100,0	,0	,0	100,0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 84.1% of original grouped cases correctly classified.

c. 82.1% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Vysvětlivky: „Predicted Group Membership“ – skupiny, do kterých jsou plži zpětně

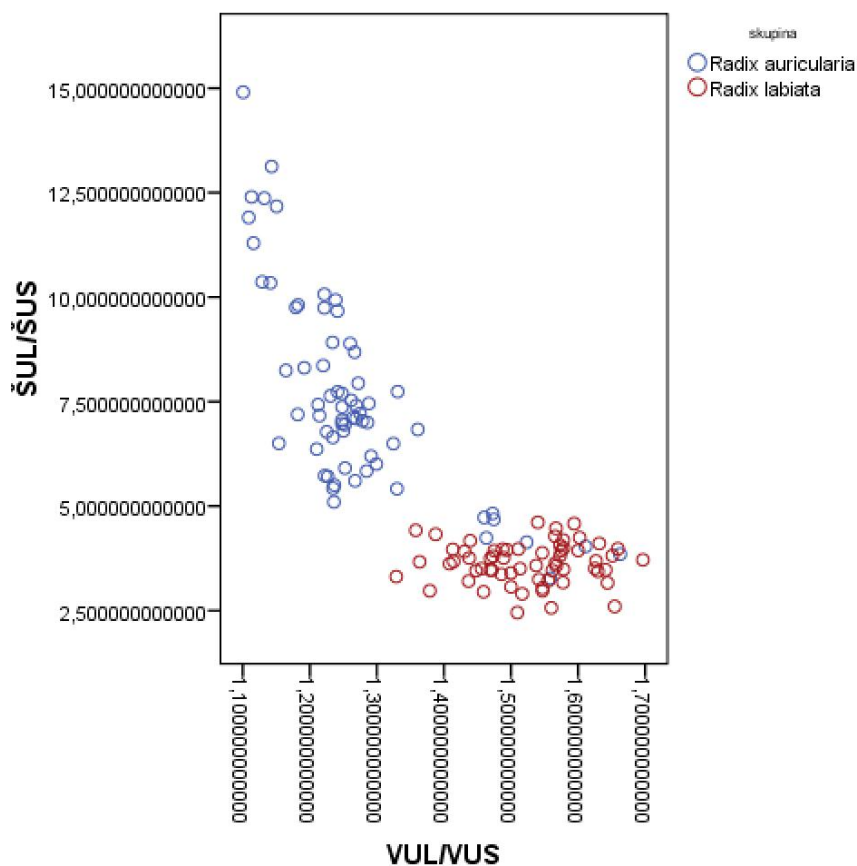
zařazováni na základě jednotlivých poměrů, Total – celkový počet plžů

Na základě následně programem vypočítaných koeficientů diskriminačních funkcí (Tab. 15) byly vytvořeny dva „scatter – ploty“ (Obr. 23, 24). První z nich (Obr. 23) znázorňuje odlišnost skupin 2 (*R. auricularia*) a 3 (*R. labiata*), druhý (Obr. 24) částečný překryv skupin 1 (*R. lagotis*) a 4 (*R. peregra*) s ostatními skupinami.

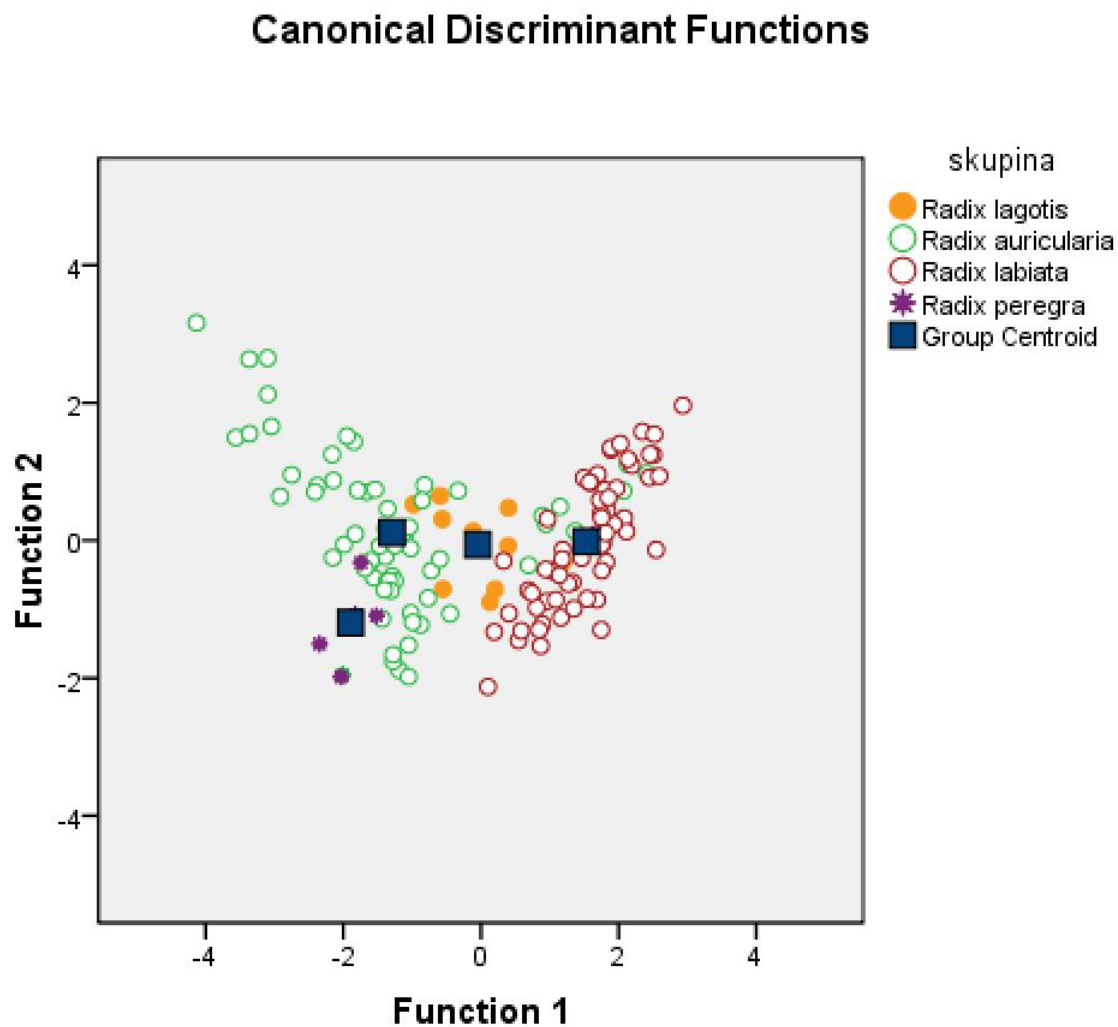
Tab. 15: Koeficienty diskriminačních funkcí

	Function		
	1	2	3
VULVUS	,816	,965	,635
VULŠUL	-,145	-,143	,590
ŠULŠUS	-,377	,374	1,161

Obr. 23: „Scatter – plot“ pro první dvě diskriminační funkce, rozlišení *R. labiata* a *R. auricularia*.



Obr. 24: „Scatter – plot“ pro první dvě diskriminační funkce s rozlišením jednotlivých skupin.



Z Obr. 23 a 24 vyplývá, že nejodlišnější skupiny jsou *R. labiata* a *R. auricularia*. Skupiny *R. lagotis* a *R. peregra* se překrývají v naměřených hodnotách s *R. auricularia*, částečně i s *R. labiata*.

Na základě první a druhé diskriminační funkce byla zkonstruovaná také teritoriální mapa (Obr. 25), která je rozdělena na 4 části, z nichž každá predikuje jednu skupinu plžů. Zařazení plže na mapě určují souřadnice dané hodnotami prvních dvou kanonických

diskriminačních funkcí. Ty se vypočítávají z diskriminačních koeficientů (viz Tab. 15):

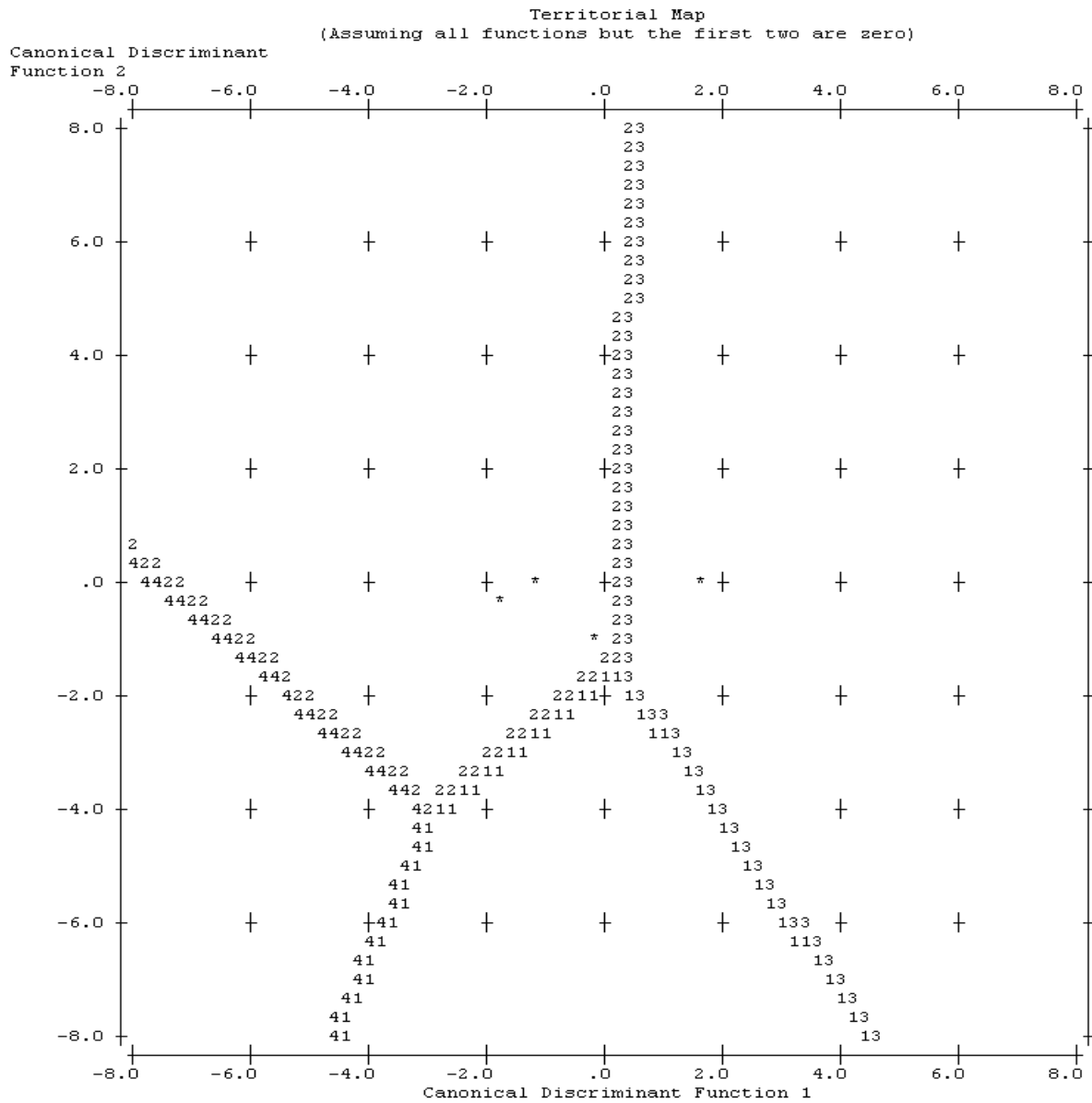
$$f_1 = 0,816 \text{ VUL/VUS} - 0,145 \text{ VUL/ŠUL} - 0,377 \text{ ŠUL/ŠUS} \text{ (pozice na vodorovné ose)}$$

$$f_2 = 0,635 \text{ VUL/VUS} - 1,143 \text{ VUL/ŠUL} + 0,374 \text{ ŠUL/ŠUS} \text{ (pozice na svislé ose)}$$

Dvě kanonické funkce rozdělily teritoriální mapu na čtyři nestejně velké kvadranty (způsobeno rozdílným počtem jedinců plžů od každého druhu). Na základě výpočtu kanonických funkcí z diskriminačních koeficientů lze jakéhokoliv plže rodu *Radix* zařadit do skupiny (druhu). Hranice rozdělení kvadrantů na teritoriální mapě jsou i hranicí jednotlivých skupin viz Obr. 25

Na základě morfometrických údajů lze od sebe rozeznat *R. labiata* a *R. auricularia*. Nepodařilo se odlišit druhy *R. peregra* a *R. lagotis*, které se svými parametry překrývají s *R. auricularia* a *R. labiata*. Vzhledem k překryvu parametrů nelze druhy od sebe spolehlivě rozlišit podle morfologie ulity.

Obr. 25: Teritoriální mapa



Symbols used in territorial map

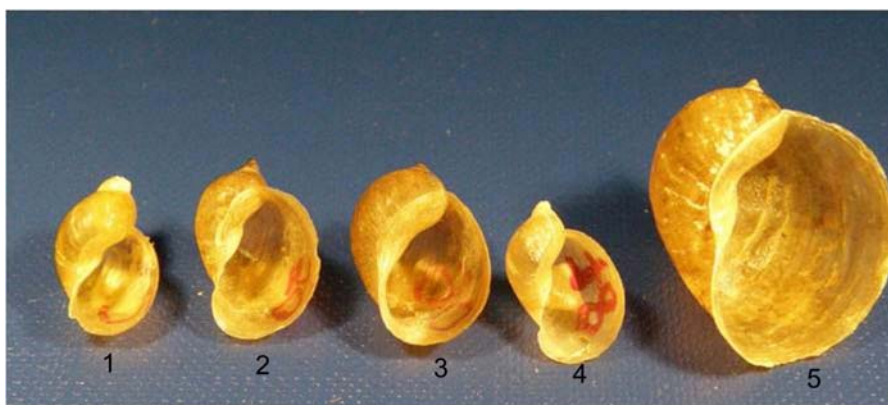
Symbol	Group	Label
1	1	
2	2	
3	3	
4	4	
*		Indicates a group centroid

Vysvětlivky: 1 = *R. lagotis*, 2 = *R. auricularia*, 3 = *R. labiata*, 4 = *R. peregra*

4. 5. 4. Variabilita ulit plžů rodu *Radix*

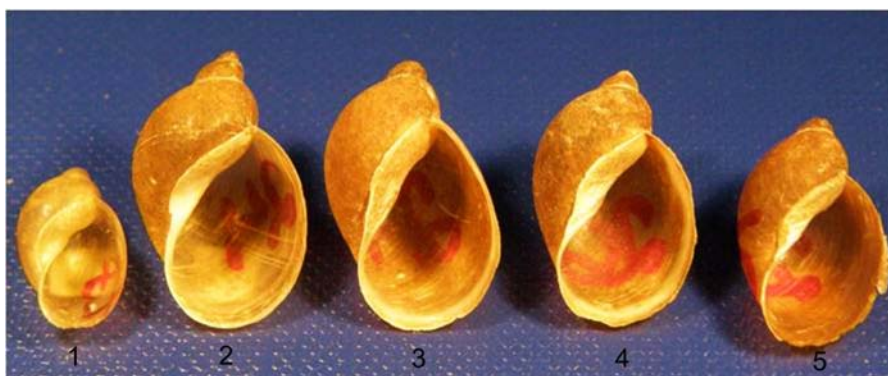
Ulita plžů rodu *Radix* je velmi variabilní (Obr. 26 – 30). V rámci jednoho druhu můžeme nalézt různé tvary ulit, ústí i rozdílný poměr výšky ulity a ústí (Obr. 26). Mezi sebou si ulity jsou podobné. Proto bez molekulární analýzy jde jen těžko určit, o který druh se jedná.

Obr. 26: Variabilita ulit plžů druhu *Radix auricularia*.



- 1 – Červený rybník
- 2 – Prager
- 3 – Kunžak
- 4 – Kunžak
- 5 – Velký Klínský rybník

Obr. 27: Variabilita ulit plžů druhu *Radix lagotis*.



- 1 – chovy PřF UK1
- 2 – Žoldánka
- 3 – Žoldánka
- 4 – Žoldánka
- 5 – Žoldánka

Obr. 28: Variabilita ulit plžů druhu *Radix labiata*.



- 1 – Krásná Lípa
- 2 – Krásná Lípa
- 3 – Octárna - potok
- 4 – Poněšice, Bedrná 8₃
- 5 – Boletice lok. 12
- 6 – Octárna tůňka

Obr. 29: Variabilita ulit plžů druhu *Radix labiata* (dle pitev určen jako *R. lagotis*).



- 1 – Poněšice - Libochovka
- 2 – Poněšice, pramen
Černého potoka
- 3 – Poněšice, Bedrná 8₁
- 4 – Sedliště S₃
- 5 – Poněšice, Novoborský
seník

Obr. 30: Variabilita ulit plžů druhu *Radix peregra*.



- 1 – Mladé Buky
- 2 – Mladé Buky
- 3 – Mladé Buky

4. 6. Experimentální nákazy plžů

K infekčním pokusům byli použiti plži druhů *R. lagotis* a *R. labiata* (dle sekvencí ITS2). Celkem bylo infikováno 400 plžů (200 jedinců od každého druhu) miracidii *Trichobilharzia regenti* viz Tab. 16.

Tab. 16: Výsledky experimentálních infekcí plžů rodu *Radix* motolicí *Trichobilharzia regenti*.

Druh plže	Počet infikovaných plžů	Počet plžů v kontrolní skupině	Datum infikování	Datum kontroly	Počet přeživších inf. plžů	Počet plžů vylučujících cercárie	Počet přeživších kontrol. plžů
<i>R. labiata</i>	100	50	17.1.2008	21.2.2008	81 (81%)	72 (89%)	46 (92%)
<i>R. lagotis</i>	100	50	17.3.2008	24.4.2008	97 (97%)	88 (91%)	47 (94%)
<i>R. lagotis</i>	100	50	18.3.2008	24.4.2008	81(81%)	73 (90%)	46 (92%)
<i>R. labiata</i>	100	50	18.7.2008	21.8.2008	80 (80%)	71 (89%)	43 (86%)

Z Tab. 16 vyplývá, že není rozdíl mezi *R. lagotis* a *R.labiata* ve vnímavosti k infekci motolicí *T. regenti*. Z přeživších 81% - 97% plžů vylučovalo cercárie 89%-91%. Kontrolní plži měli nižší úmrtnost (6 – 14%) než plži infikovaní motolicí (cca 20%). Výjimku tvoří plži *R. lagotis* infikovaní 17. 3. 2008 (přežilo procentuálně více infikovaných plžů).

5. DISKUZE

5. 1. Sběr a vyšetření plžů

Celkem byly sebrány vzorky ze 43 lokalit, vyšetřeno bylo 1568 plžů z 33 lokalit. Cerkárie čeledi Schistosomatidae nebyly vylučovány žádným z vyšetřených plžů. Z údajů v literatuře vyplývá (Dvořák 2000, Rudolfová 2003, Podhorský 2006), že prevalence nálezů schistosomami jsou nízké, většinou se pohybují v řádu několika málo promile až procent. Pravděpodobnost nákazy klesá s některými faktory prostředí, jako jsou např. proudící voda, nepřítomnost vodních ptáků, intenzivní obhospodařování rybníků (v eutrofních izolovaných rybnících s velkým množstvím ryb žije málo plžů); možnou příčinou může být i mezidruhová kompetice motolic uvnitř plžů, kdy např. redie echinostom likvidují larvální stadia některých jiných druhů (Kian 1973, Sousa 1992). Echinostomy přitom byly nejčastěji nalézány motolicemi u vyšetřovaných plžů. Souhrn všech jmenovaných faktorů je i pravděpodobným důvodem, proč jsme žádné cercárie čeledi Schistosomatidae nenašli.

5. 2. Determinace plžů

Plži byli determinováni pomocí pitvy pohlavní soustavy, sekvencí ITS2 oblasti a morfologie ulity.

Na základě pitev (uložení kopulační burzy, délka stopky kopulační burzy) byli plži rozděleni do čtyř skupin (A-D) a získaná data byla porovnána s údaji v literatuře. Popisy a nákresy stavby pohlavní soustavy plžů rodu *Radix* nejsou v literatuře hojné, fotografie téměř neexistují (Glöer 2002). Skupině A byl pracovním způsobem přiřazen druhový název *R. auricularia* (dle Glöer 2002), skupině C *R. labiata* (dle Glöer 2002), skupině B *R. lagotis* (dle Dr. Katrin Schniebs, Drážďany – ústní sdělení). Pro skupinu D nebyl v literatuře nalezen odpovídající

popis pohlavní soustavy (tito plži byli později determinováni na základě sekvence ITS2 jako *R. peregra* sensu Barges a kol. 2001).

Popis a fotografie pohlavní soustavy *R. lagotis* nebyly v literatuře publikovány a jsou proto nové. Všichni jedinci *R. lagotis* (dle sekvence ITS2) měli stavbu pohlavní soustavy odpovídající skupině B. Jako problematické se ukázalo jejich odlišení od plžů *R. labiata* (dle sekvence ITS2) – plži *R. labiata* z většiny lokalit měli stejnou pohlavní soustavu jako *R. lagotis* (typ B); typ C byl zastoupen v menšině. Druhy *R. lagotis* a *R. labiata* od sebe nešlo v naší studii rozlišit bez použití metod molekulární biologie. Toto zjištění je v přímém rozporu s některými malakologickými klíči. Ložek (1956) uvádí, že *R. lagotis* je poddruhem *R. peregra* (dle nové nomenklatury pravděpodobně *R. labiata*) a jednotlivé poddruhy rozeznává na základě morfologie ulity. Stejně tak od sebe odlišuje *R. labiata* a *R. lagotis* ve své práci Glöer (2002).

Popis struktury pohlavní soustavy *R. peregra* sensu Barges a kol. 2001 je rovněž nový. Dříve uváděný popis morfologie pohlavní soustavy *R. peregra* (Jackiewicz 2000b) dle nové nomenklatury (Barges a kol. 2001) odpovídá pravděpodobně morfologii pohlavní soustavy *R. labiata*. Toto tvrzení podporují také námi zjištěné údaje – oproti Jackiewicz (2000b), která pro *R. peregra* uvádí ve své práci krátký duktus kopulační burzy, jsme našli duktus dlouhý a tenký. Pojmenování skupiny plžů s touto stavbou pohlavní soustavy bylo proto stanoveno až na základě sekvencí ITS2 oblasti (viz dále).

Komplikací při determinaci plžů podle morfologie pohlavní soustavy, o které se literatura nezmiňuje, je přítomnost larválních stadií motolic (sporocyst, redií), ovlivňujících podobu pohlavní soustavy plže - některé druhy motolic způsobují parazitární kastraci plžů (de Jong–Brink a kol. 2001). Při pitvě parazitovaných plžů pak lze nalézt částečně nebo úplně destruované pohlavní orgány, což zcela znemožňuje determinaci. Zničené jsou všechny

důležité znaky, hlavně kopulační burza a její duktus. Pomocí pitev také není možné určovat juvenilní jedince plžů, protože u nich ještě pohlavní soustava není zcela vyvinutá. Občasně nalézané pijavky (*Glossiphonia* sp.) v plášťové dutině plžů determinaci neovlivňují.

Po následné sekvenaci ITS2 oblasti, porovnání získaných sekvencí s databází NCBI a sestrojení fylogenetických stromů se plži rozdělili do 4 skupin, které odpovídají druhům *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001, *R. labiata* sensu Bargues a kol. 2001, *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. lagotis* sensu Bargues a kol. 2001.

Bargues a kol. (2001), kteří zpracovávali vzorky z celé Evropy včetně ČR, předpokládali, že výskyt *R. peregra* je omezen jen na západní Evropu a Island. Tvrdí, že dřívější nálezy ze střední Evropy popsané jako *R. peregra* jsou ve skutečnosti druhem *R. labiata*. Jedním z nedostatků této studie je absence většího množství vzorků z jednotlivých států (území). *Radix peregra* ve své práci, založené na sekvenaci cytochrom c oxidázy, nepopisuje z území Evropy ani Pfenninger a kol. (2006). Navzdory předpokládanému rozšíření tohoto druhu jsme potvrdili přítomnost *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001 ve východních Čechách (zatím jediná lokalita Krkonoše, Mladé Buky, řeka Úpa). Domníváme se, že na území ČR a pravděpodobně i střední Evropy se tento druh vyskytoval vždy. Nálezy a popisy plžů z území střední Evropy označované jako *R. peregra* jsou zavádějící (Ložek 1956, Buchar a kol. 1995, Jackiewicz 2000b) neboť tyto nálezy zřejmě označují stejné plže, kteří se dle novější literatury označují jako *R. labiata* (Bargues a kol. 2001, Glöer 2002, Pfenninger a kol. 2006). Popisy založené pouze na morfologii ulity, případně pitev pohlavní soustavy mohou pod označením *R. peregra* zahrnovat jak *R. peregra*, tak *R. labiata*, popř. i *R. lagotis*.

Výskyt *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001 jsme také opakovaně potvrdili na všech islandských lokalitách, ze kterých jsme měli vzorky.

Determinace pomocí sekvencí i pitev rozdělila plže do čtyř skupin. Jejich vzájemným porovnáním jsme zjistili, že determinace na základě pitev není vždy totožná s determinací na základě sekvence ITS2. Skupiny se plně shodovaly v případě *R. auricularia* (skupina A), *R. lagotis* (skupina B) a *R. peregra* (skupina D). Pohlavní soustava většiny plžů *R. labiata* (skupina C) vypadala stejně jako u *R. lagotis*, ačkoliv sekvenčně se jednalo o jasně oddělenou skupinu odpovídající *R. labiata* sensu Bargues a kol. (2001). Pouze na 5 lokalitách z dvaceti byl druh *R. labiata* jasně odlišen i pitvou pohlavní soustavy. Na základě pitvy nelze spolehlivě říci, zda daný jedinec patří do druhu *R. labiata* nebo *R. lagotis*. Vzhledem k tomu, že neexistuje souhrnná práce zohledňující při určování radixů morfologický i molekulárně biologický přístup, nebyla tato variabilita pohlavní soustavy popsána, a to ani v obsáhlé fylogenetické práci publikované Bargues a kol. (2001) za účasti německých malakologů. Důvěryhodnost existujících prací založených pouze na pitevní determinaci (Jackiewicz 2000b, Glöer a Pešic 2007) je možné díky získaným výsledkům částečně zpochybnit.

Během naší studie jsme nenalezli druh *R. balthica* sensu Bargues a kol. 2001 (syn. *R. ovata*). Důvodem může být, že naše sběry pokryly relativně malé území ČR a žádnou lokalitu výskytu tohoto druhu jsme nezachytili. Je nutno ověřit hypotézu německého malakologa Dr. M. Pfenningera (ústní sdělení), že druh *R. balthica* se vyskytuje na západ od území ČR, a pokud k nám jeho areál zasahuje, pak západní Čechy jsou východní hranicí rozšíření tohoto druhu. Také se nepodařilo nalézt druh *R. ampla*, o jehož validitě se vedou spory a který někteří autoři považují za formu *R. auricularia* (Pfenninger a kol. 2006), jiní za platný druh (Ložek 1956, Glöer 2002, Bargues a kol. 2001).

Poslední metoda determinace sledovala morfologii ulity, na základě které mnoho autorů plže rozlišuje (Ložek 1956, Buchar a kol. 1995, Jackiewicz 2000b, Beran 2002, Glöer 2002). Novější práce však její spolehlivost zpochybňují (Pfenninger a kol. 2006). Jediná práce dávající do souvislosti morfologii ulity a molekulární data byla publikovaná

Pfenningerem a kol. (2006). Autoři konstatují, že tvar ulity je natolik variabilní a ovlivnitelný prostředím, že tento znak není vhodný pro determinaci plžů rodu *Radix*.

V naší práci jsme se pokusili najít rozdíly v měřitelných morfologických parametrech ulity (výška ulity, výška ústí, šířka ulity, šířka ústí), resp. v poměrech jejich hodnot. Analýzy byly provedeny programem SPSS, verze 16

Jako sledované faktory pro „Multivariate general linear model“ (GLM) mohly být použity jen poměry rozměrů, nikoliv lokalita – velké množství lokalit by znemožnilo provedení analýzy. Přestože model GLM ukázal, že se plži v jednotlivých poměrech signifikantně liší, následně provedené Post Hoc testy ukázaly, že signifikantní odlišnost není v poměru VUL/VUS u dvojice *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001, VUL/ŠUL u dvojice *R. lagotis* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. labiata* sensu Bargues a kol. 2001; *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001, ŠUL/ŠUS *R. lagotis* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001; *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001. I když výsledkem GLM byl signifikantní rozdíl mezi skupinami, následné Post hoc testy prokázali, že není signifikantní odlišnost mezi *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001 a to v žádném z měřených poměrů. Zdánlivě si odporující výsledek je možný proto, že GLM určuje pouze, jestli je nějaký rozdíl mezi skupinami, nikoli jak se skupiny liší mezi sebou. K signifikantnímu výsledku mu tak stačí jen odlišnost jediné skupiny od skupin ostatních. Až podle Post Hoc testů lze říci, které skupiny plžů se od sebe signifikantně liší. Dle Post Hoc testů se prokazatelně signifikantně od sebe liší pouze *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001 a *R. labiata* sensu Bargues a kol. 2001 (obrázek 21). *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001 se v parametrech překrývá s *R. auricularia* sensu Bargues a kol. 2001, *R. lagotis* sensu Bargues a kol. 2001 s *R. labiata* sensu Bargues a kol. 2001 (obrázek 22). Možné využití teritoriální mapy, s jejíž pomocí byli plži zpětně

určování do druhu, při terénním určování plžů je téměř nulové, protože ji nelze použít bez vlastnictví statistického programu SPSS verze 16.

Celá statistická analýza je zatížena malým počtem jedinců druhu *R. lagotis* Bargues a kol. 2001 a *R. peregra* Bargues a kol. 2001, kteří analýzy zkreslují. Díky malému počtu jedinců a překrývání hodnot v jednotlivých poměrech mezi skupinami, nelze stanovit vhodnou metodiku pro determinaci plžů rodu *Radix* na základě morfologie ulity.

Dostupná literatura, která se zabývá morfologií ulit plžů rodu *Radix*, pracuje pouze s poměrem výška ulity/výška ústí (VUL/VUS). Ložek (1956) uvádí pro *R. peregra* (dle nových poznatků odpovídá pravděpodobně *R. labiata*), že výška ústí zabírá 30 – 40% výšky ulity, pro *R. p. lagotis* hodnotu 60% výšky ulity. Glöer (2002) udává výšku ústí *R. labiata* jako 60% výšky ulity. Naše výsledky se téměř shodují jen u *R. labiata* s hodnotou uváděnou Glöerem (2002), zbylá data nelze vzhledem k nekompletnosti literárních údajů porovnat. Vzhledem k překryvu skupin v některých parametrech není, dle našeho názoru, možná determinace radixů pouze na základě rozměrů ulity a poměrů jednotlivých částí, což lze dobře demonstrovat na nálezu *R. peregra* sensu Bargues a kol. 2001 z Krkonoš (viz Obr. 30). Při použití malakologického klíče (Ložek 1956, Glöer 2002) by tito plži byli dle morfologie ulity chybně zařazeni do druhu *R. auricularia* nebo *R. ovata* (resp. *R. balthica*). Bez použití molekulárních metod by nebylo možné odlišit *R. peregra* sensu Bargues 2001 od *R. auricularia* nebo *R. ovata* (resp. *R. balthica*).

Domníváme se, že při kombinaci rozměrů ulity a morfologie pohlavní soustavy lze téměř spolehlivě určit *R. auricularia*. Tento postup selhává v případě *R. lagotis*, *R. labiata* a *R. peregra* vzhledem k nerozlišitelnosti morfologie ulit a dvojtvárnosti pohlavní soustavy *R. labiata*, která byla ve většině námi zjištěných případů stejná jako u *R. lagotis*. Jak se zdá, poslední dva druhy lze jednoznačně odlišit pouze na základě molekulárních dat, ostatní

metody determinace mohou sloužit pouze pro orientační určení. Pro spolehlivou determinaci vyhodnocením morfologie ulit i pohlavní soustavy bude nutné najít další určovací znaky.

Vzhledem k výše uvedeným zjištěním je na místě otázka, nakolik jsou věrohodné literární údaje zmiňující se jednak o druhovém rozšíření plžů, jednak o mezihostitelské specifitě motolic (např. Našincová 1992, Horák a kol. 1998, 1999). Bez podrobné studie využívající i molekulárních metod, která by rovnoměrně pokryla velkou část našeho území, nelze s jistotou říci, kolik druhů plžů rodu *Radix* žije na našem území. Zatím tedy není jasné ani to, které druhy radixů slouží jako mezihostitelé konkrétním druhům motolic a zdali jsou tyto motolice striktně druhově specifické. Zajímavé by rovněž bylo zjistit, zda jsou jednotlivé druhy radixů schopny vzájemné hybridizace za vzniku plodného potomstva.

5. 3. Experimentální nákazy plžů

Výsledky experimentálních nálezů plžů *R. labiata* a *R. lagotis* motolicí *Trichobilharzia regenti* jsou srovnatelné. U obou druhů přežilo přibližně stejné množství infikovaných plžů (cca 80%) a z těchto plžů bylo infikováno cca 90% jedinců. Množství přeživších neinfikovaných jedinců se pohybovalo kolem 90%, z čehož vyplývá, že nákaza motolicí způsobila v experimentu o cca 10% větší mortalitu plžů. Výjimečně mohou být počty přeživších infikovaných plžů i vyšší jako např. u *R. lagotis* infikovaných 17. 3. 2008, kdy přežilo 97% infikovaných plžů, z toho 81% vylučovalo cercárie a z kontrolní skupiny přežilo 94% jedinců. Důležité je, že nebyl zjištěn významný rozdíl ve vnímavosti obou druhů plžů k infekci *T. regenti*. U 10 – 11% případů se vnitřní obranný systém plžů s nákazou dokázal vyrovnat (nebyly nalezeny cercárie ani sporocysty).

Naše pokusy ukazují, že *T. regenti* se vyvíjí minimálně ve dvou blízké příbuzných druzích plžů rodu *Radix* (*R. labiata*, *R. lagotis*), což podporuje hypotézu, že motolice jsou velmi pravděpodobně schopné infikovat kromě svého hlavního mezihostitele (nejvíce

vnímavý k infekci) i blízce příbuzné druhy daného rodu nebo dokonce příbuzné rody.

Dokazují to pokusy s motolicí *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna*. Hlavním meziphostitelem *F. hepatica* je *Galba truncatula*, ale tato motolice dokáže infikovat a vyvíjet se i v *R. labiata* (Caron a kol. 2007). Horáčková (2007) a Faltýnková a kol. 2005 uvádějí stejné údaje i pro *Fascioloides magna* (v této studii nebyli plži sekvenováni, proto nelze jednoznačně říci, zda „náhradním meziphostitelem“ byl *R. labiata* nebo jiný druh).

I když mortalita těchto „náhradních“ meziphostitelů bývá vyšší, přesto toto přizpůsobení umožňuje parazitům přežití a šíření i na lokalitách, kde hlavní meziphostitel je vzácný nebo vymizel (Caron a kol. 2007).

6. ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce se podařilo:

1) získat plže rodu *Radix* z 37 českých, 1 slovenské a 5 islandských lokalit. Celkem bylo vyšetřeno 1598 plžů na přítomnost motolic čeledi Schistosomatidae. Žádné cercárie motolic této čeledi nebyly nalezeny.

2) pitvou pohlavní soustavy rozdělit plže rodu *Radix* do čtyř skupin:

A: duktus velmi dlouhý, tenký; burza kulovitá, uložená na boku horní části *corpus pyriforme*.

B: duktus 0,5 – 1 délky kopulační burzy, tlustý, burza hruškovitého tvaru ležící na *corpus pyriforme* mezi vaginou a prostatou.

C: duktus kratší než 0,5 délky kopulační burzy, tenký, burza vejčitého tvaru ležící na *corpus pyriforme*.

D: duktus tenký, dlouhý, burza kulovitého tvaru ležící na *corpus pyriforme*.

Skupině A byl přiřazen název *R. auricularia*, skupině C *R. labiata* (Glöer 2002). Skupina B byla určena jako *R. lagotis* (dle ústního sdělení Dr. Katrin Schniebs, Drážďany). Skupinu D se pitevně nepodařilo determinovat.

Popis a fotografie pohlavní soustavy *R. lagotis* a *R. peregra* dosud nebyly publikované, a jsou proto nové.

Tato metoda determinace se nedá použít pro juvenilní jedince (nemají dostatečně vyvinutou pohlavní soustavu) a jedince parazitované motolicemi (způsobují úplnou nebo částečnou parazitární kastraci, jejímž důsledkem je destrukce pohlavních orgánů plže).

3) pomocí sekvenace ITS2 oblasti rozdělit plže rodu *Radix* na čtyři skupiny, kterým bylo dle databáze NCBI (sekvence vložené Bargues a kol. 2001) přiřazeno druhové

pojmenování: *R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis* a *R. peregra*. Druh *R. peregra* (dle Barges a kol. 2001) byl na území ČR zjištěn poprvé.

Po srovnání s pitevní determinací je zřejmé, že *R. auricularia* odpovídá pitevní skupině A, *R. peregra* skupině D, *R. labiata* skupině B a C (B převažuje), *R. lagotis* skupině B. Z toho vyplývá, že při použití pitev od sebe nelze rozlišit *R. labiata* a *R. lagotis*.

- 4) statisticky zpracovat rozměry ulit plžů. Prokázaly se rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Největší statistický rozdíl je mezi *R. auricularia* a *R. labiata*. Vzhledem k překryvu hodnot *R. auricularia* s *R. peregra*, a *R. labiata* s *R. lagotis* je determinace pomocí morfometrických parametrů ulit (resp. poměrů z nich získaných) nejméně spolehlivá a nelze ji použít bez dalších metod.
- 5) pomocí experimentálních pokusů prokázat, že *R. lagotis* i *R. labiata* jsou stejně vhodnými mezihostiteli pro motolici *T. regenti*. Procentuální úspěšnost nákazy obou druhů ukazuje, že mezihostitelská specifita studovaných motolic není vázaná jen na jeden druh, ale že vnímavými mezihostiteli mohou být i další druhy rodu *Radix*.

Závěrem lze říci, že determinace plžů rodu *Radix* je velmi složitá. Kvůli velké variabilitě ulit nelze plže určovat jen na základě morfometrie jejich schránek, a ani pitva pohlavní soustavy nedává vždy jednoznačný výsledek. Nejspolehlivější metodou determinace je sekvenace ITS2 oblasti, která dokáže skupiny spolehlivě rozlišit. Její nevýhodou je časová a finanční nákladnost. Také ji není možné použít pro určování plžů v terénu. Vzhledem k výše uvedenému je nutné najít rychlou, levnou a efektivní metodu pro možnost determinace plžů nejen v laboratoři, ale v přírodě.

Problematické je pojmenovávání jednotlivých skupin plžů. V ČR je stále hojně používaná starší nomenklatura (dle Ložka 1956 nebo Buchara a kol. 1995). Vzhledem k

pojmenování západoevropských a islandských plžů názvem *R. peregra* (dle Bargues a kol. 2001) je však tato nomenklatura matoucí a zavádějící. Ložek (1956) a Buchar a kol. (1995) označují názvem *R. peregra* plže, kteří jsou na našem území běžní. Naše data ukazují, že tito plži patří dle sekvence ITS2 do skupiny *R. labiata* dle nové literatury (Bargues a kol. 2001, Glöer 2002) by se tak i měli pojmenovávat. Pojmenování *R. peregra* by mělo zůstat vyčleněno jen pro plže, kteří jsou na našem území vzácnější a sekvenčně odpovídají nálezům z islandských lokalit.

Díky praktické nerozlišitelnosti jednotlivých druhů dle morfologie ulity (snad s výjimkou plně vyvinutých jedinců druhu *R. auricularia*) by bylo s výhodou nacházené plže pokaždé determinovat na základě sekvencí nebo je označovat jako *Radix* sp.

Pro svou složitost by si problematika determinace plžů rodu *Radix* zasloužila další studium. Jeho hlavním cílem by měl být pokus o nalezení praktické metody pro odlišení jednotlivých druhů radixů v přírodě.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adema C. M., van Deutekom–Mulder E. C., van der Knaap W. P. W., Sminia T. (1994): Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* hemocytes – the role of oxygen radicals. *Parasitology* 109, 479-485.
- Almeyda – Artigas R. J., Bargues M. D., Mas – Coma S. (2000): ITS – 2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 86, 537 – 544.
- Amen R. I., Baggen J. M. C., Bezemer P. D., de Jong–Brink M. (1992): Modulation of the activity of the internal defense system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* 104, 33-40.
- Bargues M. D., Mas–Coma S. (1997): Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 14, 569-577.
- Bargues M. D., Vigo M., Horák P., Dvořák J., Patzner R. A., Pointier J. P., Jackiewicz M., Meier–Brook C., Mas–Coma S. (2001): European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate host of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 1, 85–107.
- Bash P. F. (1991): *Schistosomes, development, reproduction and host relations*. Oxford University Press.
- Beran L. (2002): Vodní měkkýši ČR – rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam. Sborník přírodovědného klubu v Uherském Hradišti, Supplementum 10.
- Blair D., Islam K. S. (1983): The life cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n. sp. (Digenea : Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Systematic Parasitology* 5, 89 – 117.

Buchar J., Ducháč V., Hůrka K., Lellák J. (1995): Klíč k určování bezobratlých. Scientia.

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

Cepicka I., Hampl V., Kulda J., et al (2006): New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (2), 542 – 551.

De Jong–Brink M., Bergamin–Sassen M., Soto M. S. (2001): Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology* 123, 129-141.

Dvořák J. (2000): Morfologie, životní cykly a taxonomie vybraných druhů trichobilharzií. Diplomová práce, PšF UK Praha.

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

Dvorak J., Delcroix M., Rossi A., et al (2005): Multiple cathepsin B isoforms in schistomula of *Trichobilharzia regenti*: identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *International Journal for Parasitology* 35 (8), 895 – 910.

Faltynkova A., Horackova E., Hirtova L, et al (2005): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica* 50 (1), 49 – 55.

Farley J. (1971): A review of the family Schistosomatidae: excluding the genus *Schistosoma* from mammals. *Journal of Helminthology*, 280-320.

Garbar A. V., Korniushev A. V. (2003): Karyotypes of European species of *Radix* (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae) and their relevance to species distinction in the genus. *Malacologia* 45, 141-148.

- Gelnar M. (1980): Taxonomie a morfologie vývojových stádií motolic. Diplomová práce, Univerzita J. E. Purkyně Brno.
- Glöer P. (2002): Die Süßwassergastropoden Nord-und Mitteleuropas. 2. neubearbeitete Auflage, Conchbooks.
- Glöer P., Zettler M. L. (2005): Kommentierte Artenliste der Süßwassermollusken Deutschlands. Malakologische Abhandlungen 23, 3-26.
- Glöer P., Pešic V (2008): *Radix scutaris* n. sp., a new species from Montenegro (Gastropoda : Lymnaeidae). Mollusca 26 (1), 83 – 88.
- Hahn U. K., Bender R. C., Bayne C. J. (2001): Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. Journal of Parasitology 87, 778-785.
- Hahn U. K., Bendr R. C., Bayne C. J. (2001): Killing of *Schistosoma mansoni* sporocyst by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: Role of reactive oxygen species. Journal of Parasitology 87, 292-299.
- Hall T. A (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95 – 98.
- Hoek R. M., Smit A. B., Frings H., Vink J. M., de Jong–Brink M., Geraerts W. P. M. (1996): A new Ig–superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down–regulated during parasitosis. European Journal of Immunology 26, 939-944.
- Horáčková E. (2007): Biologie a výskyt larválních stádií motolice obrovské (*Fascioloides magna*) v České republice. Diplomová práce, PřF JU České Budějovice.
- Horák P., van der Knaap W. P. W. (1997): Lectins in snail – trematode immune interactions: a review. Folia Parasitologica 44, 161-172.

- Horák P., Kolářová L., Dvořák J. (1998): *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5, 349 – 357.
- Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L. (1999): *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems, *Parasitology* 119, 577-581.
- Horák P., Kolářová L., Adema C. M. (2002): Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology* 52, 155–233.
- Horák P., Kolářová L. (2005): Molluscan and vertebrate immune responses to bird schistosomes. *Parasite Immunology* 27, 247-255.
- Hordijk P. L., Schallig H. D. F. H., Ebberink R. H. M., de Jong–Brink M., Joosse J. (1991): Primary structure and origin of schistosomin, an anti–gonadotropic neuropeptide of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Biochemical Journal* 279, 837-842.
- Hrádková K., Horák P. (2002): Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology* 76, 137-142.
- Islam K. S. (1986): The morphology and life-cycle of *Trichobilharzia arcuata* n.sp (Schistosomatidae : Bilharziellinae) a nasal schistosome of water whistle ducks (*Dendrocygna arcuata*) in Australia. *Systematic Parasitology* 8, 117 – 128.
- Jackiewicz M. (1993): Die Mantelpigmentation als Diagnosemerkmal bei Schlammschnecken (Gastropoda, Pulmonata : Lymnaeidae. *Malakologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* 16 (19).
- Jackiewicz M. (1998): The penis as a valuable diagnostic feature in lower taxonomic units of the family Lymnaeidae (Gastropoda, Pulmonata). *Malakologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* 13 (2).
- Jackiewicz M. (2000a): Structure of lymnaeid shell columella (Gastropoda: Pulmonata). *Malakologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* 20 (5).

- Jackiewicz M. (2000b): Blotniarki Europy (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae), Wydawnictwo Kontekst, Poznań.
- Kalbe M., Haberl B., Haas W. (2002): Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of „miracidia-attracting glycoproteins“. *Experimental Parasitology* 96, 231-242.
- Khalil L. F. (2002): Family Schistosomatidae Stiles and Hass all, 1898. In: *Keys to Trematoda*, (DI Gibson, A Jones & RA Bray eds.), Vol. 1, Wallingford: CAB International.
- Kian J. L. (1973): Larval trematode antagonism: Principles and possible application as a control method. *Experimental Parasitology* 33, 343-349.
- Kock S. (2001): Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea : Schistosomatidae). *Parasitology* 123, 67-70.
- Kolářová L., Horák P., Sitko J. (1997): Cercarial dermatitis in focus: schistosomes in the Czech Republic. *Helminthologia* 34, 127–139.
- Kolářová L., Skirnisson K., Horák P (1999): Schistosome cercariae as the causative agent of swimmer's itch in Iceland. *Journal of Helminthology* 73, 215 – 220.
- Kolářová L., Rudolfová J., Hampl V., Skirnisson K. (2006): *Allobilharzia visceralis* gen. nov. (Schistosomatidae – Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae). *Parasitology International* 55, 179 – 186.
- Kruglov N. D., Staroborotov Y. I. (1993): Guide to recent molluscs of northern Eurasia. *Ruthenica* 3 (2), 161 – 180.
- Ložek V. (1956): Klíč československých měkkýšů. Vydavatel'stvo Slovenskej akademie vied, Bratislava.

- Meuleman E., Huyer A. R., Mooij J. H. (1984): Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via duck *Anas platyrhynchos* and pond snail *Lymnaea stagnalis*. Netherlands Journal of Zoology 34, 414 – 417.
- Našincová V. (1992): Vývojová stádia motolic v našich vodních plžích a vývojové cykly vybraných druhů čeledi Omphalometridae a Echinostomatidae. Kandidátská dizertační práce, Parazitologický ústav ČSAV České Budějovice.
- Neuhaus W. (1952): Der Einfluss des Zwischenwirtes auf die Gestalt der Cercariae von *Trichobilharzia szidati* Neuhaus 1951 und ihre systematische Kennzeichnung. Zoologischer Anzeiger 148, 275–285.
- Núñez P. E., Adema C. M., de Jong–Brink M. (1994): Modulation of the bacterial clearance activity of hemocytes from fresh–water mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. Parasitology 109, 299-310.
- Page R. D. M (1996): TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12:357 – 358.
- Pfenninger M., Cordellier M., Streit B. (2006): Comparing the efficacy of morphologic and DNA – based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). BMC Evolutionary Biology 6 (100).
- Piggott H., Dussart G. (1995): Egg – laying and associated behavioral responses of *Lymnaea peregra* (Muller) and *Lymnaea stagnalis* (L) to calcium in their environment. Malacologia 37 (1), 13 – 21.
- Podhorský M. (2006): Taxonomie a morfologie larválních stádií schistosom. Diplomová práce, PřF UK Praha.
- Remigio E. A. (2002): Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon sampling. Parasitology Research 88, 687 – 696.

- Rudolfová J. (2003): Nové nálezy ptačích schistosom a fylogenetická analýza vybraných druhů. Diplomová práce, PřF UK Praha.
- Rudolfová J., Sitko J., Horák P. (2002): Nasal schistosomes of wildfowl in the Czech Republic. *Parasitology Research* 88, 1093-1095.
- Rudolfová J., Hampl V., Bayssade–Dufour C., Lockyer A. E., Littlewood D. T. J., Horák P. (2005): Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitology Research* 95, 79-89.
- Rudolfová J., Sitko J., Horák P. (2006): Unusual finding of *Trichobilharzia* sp. in *Motacilla alba* in the Czech Republic. *Journal of Helminthology* 80, 83-85.
- Short R. B. (1983): Presidential address: Sex and the single schistosome. *Journal of Parasitology* 69, 3 – 22.
- Sluiter J. F. (1981): Development of *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis* and the effects of infection on the reproductive system of the host. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 64, 303-319.
- Smit A. B., de Jong–Brink M., Li K. W., Sassen M. M. J., Spijker S., van Elk R., Buijs S. P., van Minnen J., van Kesteren R. E. (2004): Granularin, a novel molluscan opsonin comprising a single vWF type C domain is up–regulated during parasitisation. *FASEB Journal* 18, 845-847.
- Sousa W. P. (1992): Interspecific interactions among larval trematode parasites of freshwater and marine snails. *American Zoology* 32, 583- 592.
- Swofford D. L. (1998): PAUP* . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson S. N. (1997): Physiology and biochemistry of snail – larval trematode relationships. In: *Advances in Trematode Biology* (B. Fried and T. K. Graezyk, eds), Boca Raton : CRC Press.

- Tielens A. G. M., van de Pas F. A. M., van der Heuvel J. M., van der Bergh S. G. (1991): The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46, 181-184.
- Tielens A. G. M., Horemans A. M. C., Dunnewijk R., van der Meer P., van der Bergh S. G. (1992): The facultative anaerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* sporocyst. *Molecular and Biochemical Parasitology* 56, 49-58.
- Vojtek J. (1981): Fauna motolic ptáků v ČSSR. Univerzita J. E. Purkyně Brno.
- Ward P. I., Goater C. P., Mikos M. (1997): Shell variation in sympatric freshwater *Lymnaea peregra* and *L. ovata* (Gastropoda : Lymnaeidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 61, 139 – 149.
- Wullschleger E. B., Jokela J. (2002): Morphological plasticity and divergence in life–history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *Journal of Molluscan Studies* 68, 1-5.
- Zbikowska E. (2004): Infection of snail with bird schistosomes and threat of swimmers itch in selected Polish lakes. *Parasitology Research* 92, 30–35.
- Zbikowska E. (2005): Do larvae of *Trichobilharzia szidati* and *Echinostoma revolutum* generate behavioral fever in *Lymnaea stagnalis* individuals? *Parasitology Research* 97, 68-72.
- Žďárská Z. (1963): Larvální stadia motolic z vodních plžů na území ČSSR. *Československá parazitologie* 10, 207-262.