

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská diplomová práce

**Ekologie krevních protist skokanů**  
***Pelophylax ridibundus***

**Miroslav BARANKIEWICZ**

Školitel: Mgr. Miloslav Jirků, Ph.D.

České Budějovice

2010

**Bakalářská diplomová práce**

**Barankiewicz M., 2010:** Ekologie krevních protist skokanů *Pelophylax ridibundus*

[Ecology of blood protists in frogs *Pelophylax ridibundus*], Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Examination of large datasets on prevalence, parasitaemia and host ecological variables provided insight into ecological aspects of communities of protist blood parasites of amphibians for the first time.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 11. 1. 2010

.....  
Miroslav Barankiewicz

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěl bych především poděkovat za velkou ochotu při zpracování mé bakalářské práce svému školiteli Miloslavovi Jirků. Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu.

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	5
2.	Přehled krevních protist obojživelníků v Evropě .....	5
	2.1. Apicomplexa .....	6
	2.1.1. Rod <i>Haemogregarina</i> Danilewsky, 1885 .....	6
	2.1.2. <i>Dactylosoma ranarum</i> (Lankester, 1882) Wenyon, 1926 .....	8
	2.1.3. <i>Lankesterella minima</i> Chaussat, 1850) Nöller, 1912 .....	9
	2.2. Euglenozoa .....	9
	2.3. <i>Aegyptianella bacterifera</i> (Labbé, 1894) .....	10
	2.4. Skokan skřehotavý, <i>Pelophylax ridibundus</i> (Pallas, 1771) .....	11
3.	CÍLE PRÁCE .....	12
4.	MATERIÁL A METODIKA .....	12
	4.1. Lokalita odběru materiálu .....	12
	4.2. Metody získání, zpracování a vyhodnocení výsledků .....	13
	4.3.1. Odchyt skokanů skřehotavých <i>Pelophylax ridibundus</i> .....	13
	4.3.2. Klasifikace vyšetřených zvířat pro statistické analýzy .....	13
	4.3.3. Získání a archivace krevních nátěrů .....	13
	4.3.4. Laboratorní vyšetření krevních nátěrů a výpočet parazitémie .....	14
	4.4. Statistické vyhodnocení, výpočet prevalence a parazitémie .....	14
5.	Výsledky .....	15
	5.1. Výsledky vyšetření krevních nátěrů – diverzita krevních protist a jejich prevalence .....	15
	5.1.1. Euglenozoa .....	15
	5.1.2. Apicomplexa .....	16
	5.1.3. <i>Aegyptianella bacterifera</i> .....	18
	5.2. Prevalence .....	19
	5.3. Parazitémie .....	20
	5.4. Laboratorní vyšetření krevních nátěrů a výpočet parazitémie .....	24
6.	DISKUSE .....	25
7.	POUŽITÁ LITERATURA .....	27
8.	PŘÍLOHA – tabulka získaných dat .....	32

## 1. ÚVOD

Obojživelníci (Amphibia) představují unikátní skupinu obratlovců zahrnující 6599 známých druhů (www.amphibiaweb.org 10.1. 2010). Podle recentních analýz se snižují populace 42% druhů a 32% druhů je ohroženo, což potvrzuje i trvalý nárůst počtu vymřelých a ohrožených druhů (Stuart et al. 2004, Daszak et al. 2003). V některých případech je úbytek obojživelníků vysvětlený antropogenními změnami životního prostředí, u jiných však není souvislost s environmentálními faktory zřejmá.

Z konkrétních příčin poklesu populací obojživelníků lze uvést například ničení biotopů (Marsh and Trenham 2001), introdukce nepůvodních druhů (Vredenburg 2004, Kats and Ferrer 2003), znečištění prostředí a UV záření (Hayes et al. 2002, Blaustein et al. 2003), přičemž zřejmě největší hrozbou jsou pro obojživelníky globální změny související s oteplováním klimatu (Pounds et al. 1999, Kiesecker et al. 2001, Carey and Alexander 2003). Ačkoliv byl v posledních dvou dekadách potvrzen zásadní význam infekčních onemocnění na masové ubývání obojživelníků, zejména Chytridiomykózy a retroviróz, vliv jiných parazitárních onemocnění na populace obojživelníků nebyl až na ojedinělé výjimky studován (Daszak et al. 2003, Bosch et al. 2001, Berger et al. 1998, Cunningham et al. 1996).

Předložená práce se zabývá studiem ekologie protozoárních krevních parazitů skokanů skřehotavých (*Pelophylax ridibundus*) s cílem charakterizovat komunity krevních protist a základních ekologických charakteristik jejich (infra)populací u obojživelníků v brakickém prostředí.

## 2. Přehled krevních protist obojživelníků v Evropě

Protozoární<sup>1</sup> krevní parazitózy jsou běžné u obojživelníků ve všech klimatických pásmech (Barta 1989, Werner 1993, Chutmongkonkul 2006). Krevní protista obojživelníků jsou v Evropě zastoupena dvěma skupinami, Apicomplexa (4 spp.) a Euglenozoa (2 spp.) - charakteristika jednotlivých druhů viz následující kapitoly 2.1.-2.3. a Tabulka 1. Pro úplnost je v následujícím textu zahrnuta také *Cytamoeba bacterifera*, intraerytrocytární bakterie popsána původně jako protist.

**Tabulka 1.** Přehled krevních protist známých u obojživelníků v Evropě.

Druhy	Hostitelé	Rozšíření	Reference
<i>Haemogregarina hortai</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Korsika	Barta et al. 1989
<i>Haemogregarina magna</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Itálie, Korsika	Barta et al. 1989, Vojtkova and Roca 1993
<i>Dactylosoma ranarum</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Česká republika, Korsika, Rusko	Barta et al. 1989, Přívora 1948, Vojtkova and Roca 1993
<i>Lankesterella minima</i>	<i>Pelophylax esculentus</i> , <i>Lithobates</i> spp.	Česká republika, Korsika, Rusko, Kanda	Barta et al. 1989, Vojtkova and Roca 1993, Barta and Desser 1984
<i>Trypanosoma loricatum</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Korsika	Barta et al. 1989
<i>Trypanosoma neveulemaire</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Korsika, bývalá Jugoslávie	Barta et al. 1989, Martin 2002
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	<i>Pelophylax esculentus</i> , <i>Rana temporaria</i> , <i>Bufo bufo</i> , <i>Lithobates</i> spp.	Česká republika, Kanada, Korsika, Litva, Rusko	Barta et al. 1989, Barta and Desser 1984, Žičkus 2002, Přívora 1948, Vojtkova and Roca 1993
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Pelophylax esculentus</i>	Korsika	Barta et al. 1989

<sup>1</sup> Protozoární z technického termínu "protist" – jednobuněčný eukaryotický organizmus

## 2.1. Apicomplexa

Skupina Apicomplexa, tvořená zpravidla obligátními parazity metazoí, je charakterizována přítomností tzv. apikálního komplexu u některých vývojových stádií. Apikální komplex je soubor organel na apikálním pólu invazních pohyblivých stádií, zoitů, který je patrný pouze při použití transmisní elektronové mikroskopie. Umožňuje průnik a invazi do hostitelské buňky nebo fixaci na její povrch, a také se podílí na výstavbě stěny parazitoforní vakuoly. Zoiti, mají na svém povrchu pelikulu - povrch ze tří plazmatických membrán: vnější membrány, podložené dalšími dvěma membránami – tvořících dohromady plochý měchýřek, alveolus. Na třech místech jsou kryti pouze plazmatickou membránou – na předním a zadním pólu a mikropóru. Zoiti vyhledávají vhodné buňky hostitele, cestují ve tkáních, a následně indukují invaginaci povrchu cílové buňky. Zoit se zanoří do hostitelské buňky a vytvoří parazitoforní vakuolu. Ačkoliv je membrána parazitoforní vakuoly v podstatě vchlípená membrána invadované buňky, parazit ji zásadním způsobem modifikuje vložení proteinů a denzních granul, a mění tak její biochemické a antigenní vlastnosti (Paterson 1988, Scholtyssek 1979).

Životní cykly apikomplexu obecně (ovšem s výjimkami) sestávají ze tří fází - merogonie (nepohlavní množení), gamogonie (pohlavní rozmnožování) a sporogonie (nepohlavní množení v oocystě). Životní cykly apikomplexu jsou složité a jednotlivé vývojové fáze se mohou uskutečňovat v jednom hostiteli (monoxenní cyklus) nebo ve více hostitelích (heteroxenní cyklus). Během merogonie dochází k asexuálnímu množení, kdy se mnohojaderný meront dělí na jednojaderné merozoity. Ty infikují další buňky hostitele a merogonie se pak zpravidla několikrát opakuje. Jednotlivé merogoniální fáze se mohou odehrávat v různých tkáních hostitele a vzniklé merozoiti mohou být fyziologicky i morfologicky odlišné. Z merozoitů poslední generace vznikají gametocyty, z nichž se vyvíjí pohlavní stadia, mikro- a makro-gamonty. Splynutím mikro- a makrogamet vzniká zygota, jež se obaluje obalem (stěnou oocysty) a mění se v oocystu. V rámci sporogonie se cytoplazma uvnitř oocysty dále dělí na dva až několik desítek sporoblastů. Sporoblasty si vytvoří obal (stěnu sporocysty), stanou se sporocystami a dalším mitotickým dělením jejich cytoplazmy vzniká různý počet infekčních stádií, sporozoitů, kteří opouští oocystu až v trávicím traktu nového hostitele.

Co do diverzity, představují zřejmě Apicomplexa jednu z největších skupin eukaryot, čítající kolem 5000 popsáných druhů. Všichni příslušníci skupiny Apicomplexa mají složitý vývojový cyklus a různá vývojová stadia téhož druhu byla v minulosti popisována jako samostatné druhy, nebo dokonce vyšší taxony (rody, podřády). Popisy velkého množství druhů se navíc datují k přelomu 19. a 20. století a jsou z dnešního hlediska nedostatečné. Podle Levine (1988) se Apicomplexa rozdělují na skupiny Perkinsasida, Conoidasida a Aconoidasida. Taxony parazitující v krvi nalezneme u posledních dvou skupin, konkrétně v řádech Eucoccidiorida, Piroplasmorida, Haemospororida. Krevní apikomplexa parazitující u obojživelníků pak nalezneme v čeledích Haemogregarinidae, Karyolysidae, Dactylosomatidae (vše Eucoccidiorida) a Lankesterellidae (Eucoccidiorida). Z Evropských obojživelníků jsou známy tři druhy krevních apikomplex (viz níže).

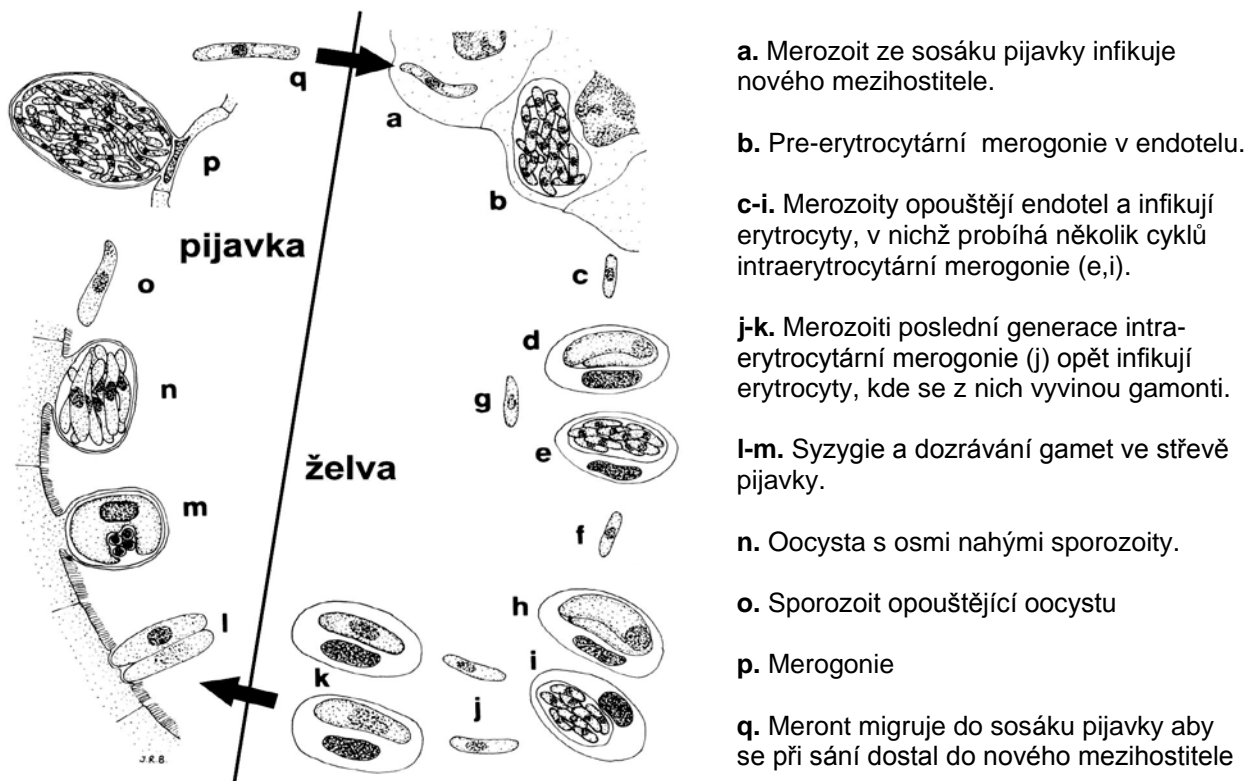
### 2.1.1. Rod *Haemogregarina* Danilewsky, 1885

Čeď Haemogregarinidae zahrnuje rody *Haemogregarina* Danilewsky, 1885; *Cyrtia* Lainson, 1981 a *Desseria* Siddall, 1995. Předpokládá se, že rod *Haemogregarina* je umělým taxonem

zahrnujícím nepříbuzné druhy (Barta 2000). V minulosti se snažili tuto skupinu zrevidovat Barta (1989) a Siddall (1995). Samotný rod *Haemogregarina* obsahuje přes 300 druhů z poikilothermních obratlovců, přičemž většina dostupných informací o jednotlivých druzích se omezuje na morfologii gamontů z krevních buněk, pozorovaných v krevních nátěrech. Absence dat dalších stádií životního cyklu, spolu s absencí molekulárních analýz jsou důvodem nejasných příbuzenských vztahů v rámci skupiny a pochybného systematického zařazení řady druhů (Siddall 1995).

Nejlépe byl experimentálně zdokumentován životní cyklus *Haemogregarina balli* Paterson et Desser, 1972 mezi pijavkou *Placobdella ornata* a želvou *Chelydra serpentina* – viz Obr. 1 (Siddall and Desser 1990, 1991). Gametogeneze a sporogonie probíhá ve střevních epitelových buňkách pijavek, které jsou jejich definitivními hostiteli a přenašeči. Merozoiti ze sosáku pijavky infikují endotelové buňky želvy, v nichž proběhne pre-erytrocytární merogonie. Výslední merozoiti infikují erythrocyty a následuje několik cyklů merogonie intraerytrocytární. Z merozoitů poslední generace pak vznikají gamonty, které se při sání s krví dostávají do pijavky. Následná syzygie a dozrávání gamet, potažmo vlastní pohlavní rozmnožování, již tedy probíhá ve střevě pijavek. Výsledkem je vytvoření oocyst ve střevě pijavky, jež obsahují osm holých sporozoitů. Sporozoity opouští oocystu a infikují různé buňky pijavky, kde iniciují merogonii. Teprve merozoity této generace se pak přesunují do sosáku pijavky a při sání infikují nového mezihostitele (želvu). Životní cyklus hemogregarin obojživelníků není znám.

**Obr. 1.** Životní cyklus *Haemogregarina balli* (upraveno podle Siddall and Desser 1990, 1991).



Z Evropy jsou známy dva druhy rodu *Haemogregarina* parazitující u obojživelníků.

*Haemogregarina magna* Labbé, 1899 je místy běžný parazit vodních skokanů rodu *Pelophylax*, doložený z Itálie a Korsiky (Vojtková and Roca 1993, Barta et al. 1989). Intraerytrocytární gamonty *H.magna* jsou delší než hostitelský erythrocyt  $28.6 \times 3.7 \mu\text{m}$  (Barta et al. 1989) a jsou proto uvnitř

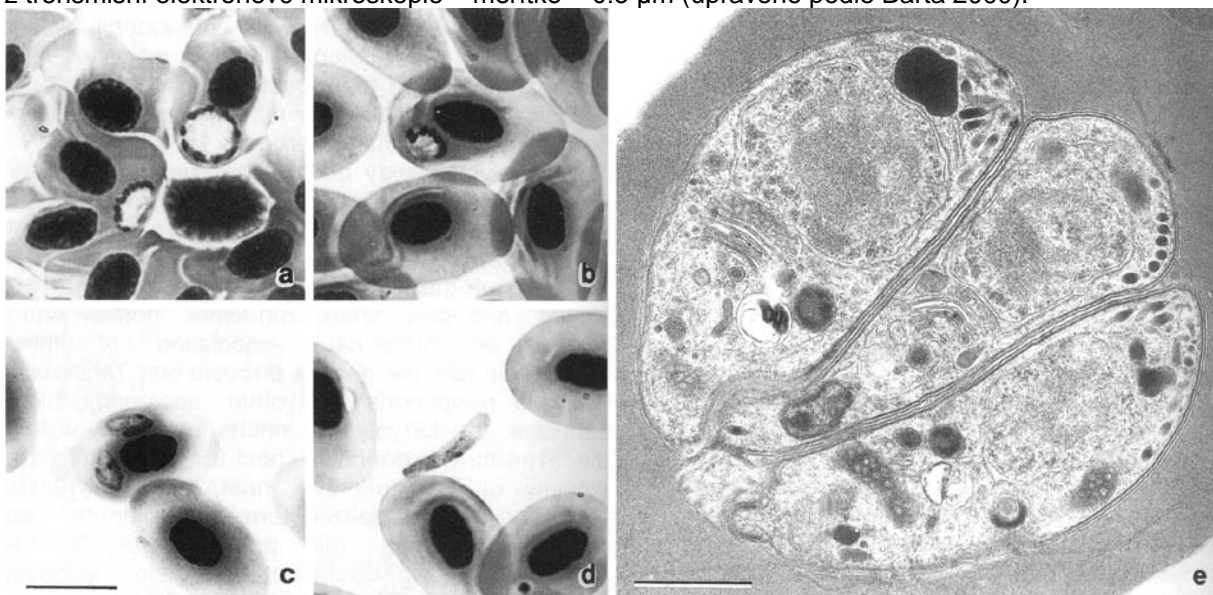
parazitoformní vakuoly typicky přeložené, přičemž zabírají podstatnou část vnitřního prostoru buňky. Infikované erythrocyty mají výrazně světlejší cytoplasmu oproti zdravým, jejich jádro je posunuto na periferii buňky a celá krvinka bývá tvarově zdeformována. Druhý zástupce, *Haemogregarina hortai* Brumpt, 1928 je uváděn rovněž ze skokanů r. *Pelophylax* z Korsiky (Barta et al. 1989). Gamonty *H. hortai* jsou relativně malé  $9.5 \times 5.3 \mu\text{m}$ , oválného tvaru a nevytváří parazitoformní vakuolu (Barta et al. 1989). Tento druh je některými autory opomíjen, takže zatím co např. v review parazitů žab v Evropě chybí (Vojtková and Roca 1993), jiní autoři jej uvádějí (Barta et al. 1989).

### 2.1.2. *Dactylosoma ranarum* (Lankester, 1882) Wenyon, 1926

Zástupci u čeledi Dactylosomatidae Jakowska et Nigrelli, 1955 jsou heteroxenní paraziti krevních buněk poikilotermů, jejichž definitivním hostitelem a přenašečem bývá pijavka. Čeleď je sice kosmopolitně rozšířena, ale její zástupci nejsou tak běžná jako hemogregariny (Barta 2000). Patří sem rody *Dyctylosoma* Labbé, 1894 a *Babesiosoma* Jakowska and Nigrelli, 1956. Oba rody se vyskytují u obojživelníků a v Evropě se vyskytuje pouze *Dactylosoma ranarum* (Obr. 2) s typicky vějířovitými meronty ( $4-8 \mu\text{m}$ ) s chromatinem rozmístěným na okraji buňky. Merozoiti bývají protáhlí, srpkovití. Gamonti jsou podobní zoitům  $6-8 \times 2.5-3.5 \mu\text{m}$  (Barta et al. 1989). Intraerytrocytární stádia se vyvíjejí uvnitř parazitoformní vakuoly a nedeformují hostitelské krvinky, jak je to obvyklé u hemogregarin.

U rodu *Dactylosoma* se při první merogonii v erythrocytech vytváří šest až šestnáct merozoitů za současného exogeního pučení z každého merontu. Merozoiti bývají často uspořádáni pouze na jedné straně dozrávajícího merontu. Při druhé merogonii se obvykle zvýší na šest menších merozoitů, které jsou předurčeny stát se v erythrocytech gamonty. Následně se v pijavce v oocystě tvoří třicet a více sporozoitů za exogeního pučení přímo v cytoplasmě střevních epitelních buněk. Oocysty netvoří stěnu. Definitivním hostitelem jsou pijavky čeledi Glossiphoniidae a jako mezihostitelé jsou známi obojživelníci, ryby (Barta 2000).

**Obr. 2.** *Dactylosoma ranarum* ze skokana zeleného, *Pelophylax* kl. *esculentus*; ; a-d. krevní rozetř byrvený giemsou, a – primární meront, b – sekundární meront, c – zakroucený gamont, d – gamont vně krvinky – jednotné měřítko =  $10 \mu\text{m}$ . e - dospělý intraerytrocytární sekundární meront, snímek z transmisní elektronové mikroskopie – měřítko =  $0.5 \mu\text{m}$  (upraveno podle Barta 2000).

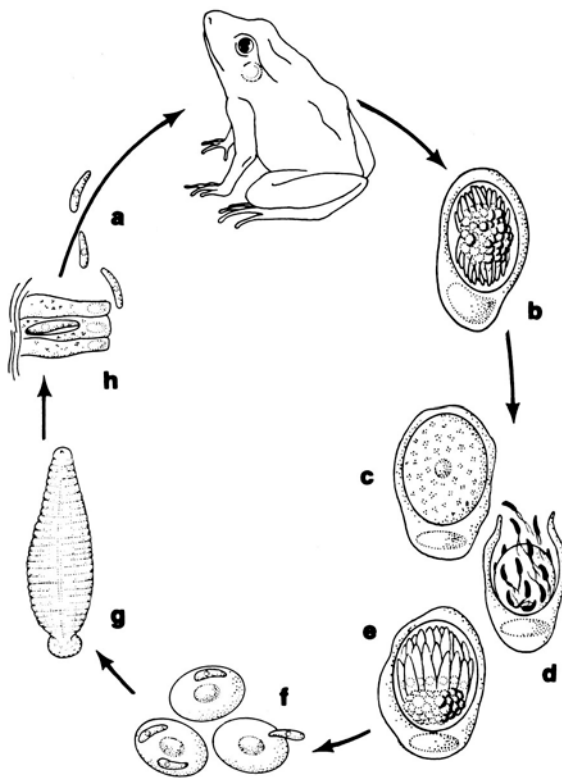




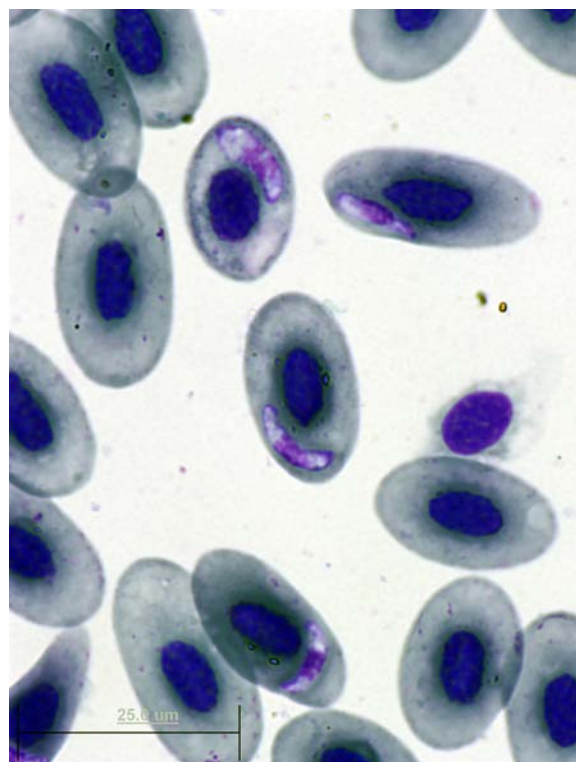
### 2.1.3. *Lankesterella minima* Chaussat, 1850) Nöller, 1912

Do čeledi Lankesterellidae patří rody *Lankesterella* Labbé, 1899 a *Schellackia* Reichenow, 1919. Definitivními hostiteli jsou obojživelníci, u rodu *Schellackia* i plazi. Přenašeči jsou pijavky (*Lankesterella*) a krev sající členovci (*Schellackia*). Z evropských obojživelníků je znám pouze druh *Lankesterella minima*. Merogonie, gametogonie a sporogonie probíhá v endotelových buňkách krevních kapilár skokanů rodu *Pelophylax* (Obr. 3. b-e). V oocystě (Obr. 3. e) vzniká několik desítek nahých sporozoitů, které po dozrání infikují červené krvinky hostitele (Obr. 3. f), kde v dormantním stavu čekají na pozření pijavkou. Infikované erythrocyty nejsou výrazně deformovány, ani "odbarveny" (Obr. 4), jak tomu bývá u erythrocytů infikovaných gamonty *Hemogregarina* spp. (viz výsledky) Sporozoity jsou spolu s krví nasáty pijavkou *Hemiclepsis marginata* (Obr. 3. g), v jejichž slinných žlázách dospívají a stávají se infekčními. Dospělí sporozoiti pak při sání krve opouštějí pijavku a dostávají se se slinami do nového definitivního hostitele, skokana.

**Obr. 3.** Životní cyklus *Lankesterella minima*, převzato z Upton (2000).



**Obr. 4.** Sporozoity *L. minima* v erythrocytech skokana *Pelophylax ridibundus* z lokality Sfintu Gheorghe v deltě Dunaje. Krevní nátěr barvený giemsou, měřítko = 25  $\mu$ m. © Miloslav Jirků



## 2.2. Euglenozoa

Zástupci skupiny Euglenozoa mají v původním stavu dva bičíky, z nichž jeden (zpětný bičík) je někdy extrémně zkrácen, nebo z něj zbývá pouze bazální tělísko. Z parazitologického hlediska nejvýznamnější je skupina Kinetoplastea, zahrnující i volně žijící formy. Znakem této skupiny je kinetoplast (úsek mitochondrie, ve kterém je nahromaděno velké množství DNA). Kinetoplast se nachází v blízkosti bazálního tělíska. Specifickou organelou skupiny Kinetoplastea jsou glykosomy

(obsahují glykolytické enzymy). Kinetoplastea se dělí na dva řády, Bodonina a Trypanosomatina. Řád Trypanosomatida je tvořen výhradně parazitickými taxony. Vyskytují se v hmyzu, obratlovcích a rostlinách a zahrnují formy s jedním bičíkem, který u některých forem tvoří undulující membránu. Z druhého bičíku je zachováno jen bazální tělísko. Rozlišují se čtyři morfologická stadia trypanosomatid: amastigot – kulatá forma, bičík nevyčnívá z flagelární kapsy na vrcholu okrouhlého tělesa, promastigot – štíhlá buňka s bičíkem na předním konci těla a kinetoplastem před jádrem, epimastigot – štíhlá buňka, základ bičíku vybíhá z krátké periflagelární kapsy ze strany a tvoří malou undulující membránu na předním konci těla, kinetoplast a bazální tělíska jsou před nebo vedle jádra, trypomastigot – podlouhlá buňka, kinetoplast a bazální tělíska jsou za jádrem, bičík vybíhá z krátké periflagelární kapsy na straně těla a tvoří dlouhou undulující membránu. Distální konec bičíku může, ale nemusí být volný. Podle vývoje v přenašeči a způsobu přenosu lze trypanosomy rozdělit na tři velké skupiny: sterkorální, salivární a trypanosomy ryb a obojživelníků (Wolf et al. 2007). V přenašeči dochází nejen k množení, ale i k diferenciaci parazita (někdy vícestupňové) ve stadia schopná nakazit nového hostitele (metacyklická stadia - například metacykličtí trypomastigoti).

Rod *Trypanosoma* Gruby, 1943 se skládá z velké skupiny výhradně flagelátních krevních parazitů, kteří se vyskytují u všech tříd obratlovců a jsou téměř vždy přenášeni krev sajícími bezobratlými (Hoare 1972). Ptáci a savci jsou infikováni členovci a poikiloternní obratlovci jsou infikováni pijavkami, ale existuje i přenos kontaminativní. Podle studie Martín et al. (2002) a Desser (2001) může jeden druh vytvářet morfologicky velmi odlišné formy, což komplikuje morfologickou determinaci jednotlivých taxonů a je proto pravděpodobné, že na morfologii založené literární údaje o diverzně, životních cyklech a hostitelské specifitě trypanosom obsahují velké množství chyb.

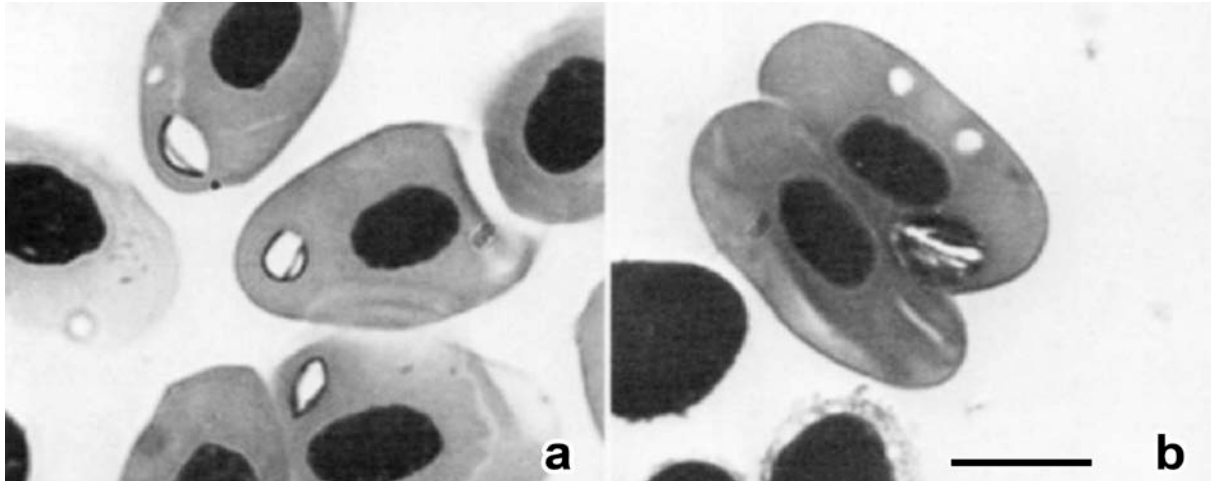
Z obojživelníků celého světa je popsána řada druhů rodu *Trypanosoma*, přičemž z Evropy jsou uváděny čtyři druhy (Tabulka 1). Současné studie naznačují velkou diverzitu trypanozom u bezocasých obojživelníků a předpokládají se sesterské příbuzenské vztahy trypanosom skokanů Starého a Nového světa (Barta et al. 1989, Martín et al. 2002).

### **2.3. *Aegyptianella bacterifera* (Labbé, 1894)**

Intraerytrocytární inkluze obsahující silně se barvící podlouhlá tělíska poprvé pozoroval Labbé (1894). Nález považoval za intraerytrocytárního prvoka a popsal jako *Cytamoeba bacterifera*. Podlouhlá tělíska následně popsal Laveran (1899) jako *Bacillus krusei* a Hegner (1921) je posléze označil za hyperparazita *C. bacterifera*. V následujících letech řada autorů zjistila podobné organismy u obojživelníků v Evropě, Asii a severní a jižní Americe (Barta et al. 1989). Druh který v mezičase popsal França (1910) jako *Toddia bufonis* považoval Lahmann (1961) rovněž za *C. bacterifera*. Barta a Desser (1984) pozorovali organismus velmi podobný *C. bacterifera* v krvinkách nearktických skokanů rodu *Lithobates*. Následná ultrastrukturální analýza prokázala, že se ve skutečnosti nejedná o prvoka, nýbrž o inkluze obsahující bakterie ze skupiny Rickettsiales (Desser 1987). Objevená rickettsie byla v téže práci pojmenována *Aegyptianella ranarum* Desser, 1987. V roce 1989 objevili Barta et al. *C. bacterifera* u skokana zeleného *P. kl. esculentus* z Korsiky a na základě nepublikované ultrastrukturální analýzy určili v ní obsažená podlouhlá tělíska rovněž jako rickettsii a upravili proto

název organismu na *Aegyptianella bacterifera*. Taxon *C. bacterifera* je dosud občas mylně zmiňován, např. Adl et al. (2005) jej uvádějí jako prvoka nejasného systematického zařazení v rámci eukaryot.

**Obr. 5.** Riketsie *Aegyptiella bacterifera* v erythrocytech skokana zeleného, *Pelophylax kl. esculentus* z Korsiky, a – nedospělé inkluze obsahující malé množství rickettsií, b – dospělé inkluze obsahující mnoho rickettsií. Krevní nátěr barvený giemsou, měřítko = 10 µm (upraveno podle Barta et al. 1989)



#### **2.4. Skokan skřehotavý, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)**

Tento druh patří mezi největší evropské skokany. Tělo je robustní, hlava je široká a při pohledu shora vpředu zaokrouhlená. Maximální délka těla je 170 mm a hmotnost maximálně 300 g. Skokan skřehotavý je výrazně vázán na pomalu tekoucí a stojaté vody. V jižní a jihovýchodní části areálu je běžně rozšířen v brakických jezerech při pobřeží moře. Areál skokana skřehotavého zabírá téměř celou Evropu, Malou a střední Asii, a severozápadní Afriku.

Život tráví ve vodě nebo jejím bezprostředním okolí, kde také loví. V letním období je nejaktivnější ráno a večer. Zatímco, na jaře a na podzim je aktivní ve světelné části dne. Základem potravy jsou bezobratlí a drobní obratlovci (obojživelníci a jejich larvy, ryby, malí plazi, ptáci a savci).

Skokani zimují na souši i ve vodě. K páření dochází kolem měsíce až dvou po ukončení zimního spánku, tj. převážně v květnu a červnu. K výběru páru dochází na shromaždištích, kde samci volají samičky velmi výrazným hlasem pomocí rezonátorů (Zwach 2009). U nedospělých jedinců je možné rozlišit pohlaví pouze pitvou (Baruš et al 1992). Obě pohlaví se liší velikostí těla. Dospělé samice jsou zřetelně větší než samci.

### 3. CÍLE PRÁCE

- 1) Determinace a základní morfologická charakteristika studovaných protist pomocí technik světelné mikroskopie
- 2) Charakteristika komunit krevních parazitů
- 3) Charakteristika populací krevních parazitů pomocí základních ukazatelů: parazitémie, temporální změny prevalence, vliv BMI a pohlaví hostitele

### 4. MATERIÁL A METODIKA

#### 4.1. Lokalita odběru materiálu

Odchyt skokanů jsem prováděl na cca 500 m úseku břehu brakického jezera při pobřeží Černého moře v Rumunsku v oblasti Histria (44°32'58.54"N, 28°46'32.34"E). Jedná se o soustavu jezer s brakickou vodou přiléhající k deltě Dunaje. Jezera jsou mělká, a břehy pokryté rákosem a orobincem. V okolní krajině se vyskytují převážně pastviny. Je to areál antických ruin, které skýtají velké množství úkrytů pro živočichy (např. *Natrix natrix*, *Natrix tessellat*, *Lacerta agilis* a další).

**Obr. 5.** Umístění studijní lokality vůči deltě Dunaje (vlevo) a detail lokality samotné (vpravo) – šipka na pravém obrázku ukazuje do středu cca 500 m úseku pobřeží, kde probíhaly odchyty.





## 4.2. Metody získání, zpracování a vyhodnocení výsledků

### 4.3.1. Odchyt skokanů skřehotavých *Pelophylax ridibundus*

Všechny vzorky byly odebrány v roce 2007. První odběr byl proveden na jaře na přelomu dubna a května v termínu 26.4.-2.5. 2007. Jedinci byli odchytáváni ve dne do ruky nebo do podběráku. Odchycené jedince jsem umístil do plastového kbelíku s malým množstvím vody na dně. Poté byli přeneseni k výzkumné stanici. Po změření "snout-vent length" (SVL), zvážení (g), určení pohlaví, a odebrání vzorků krve bylo náhodně vybráno šest jedinců, které jsem přivezl z Rumunska do laboratoře v České republice. Zbylé odchycené jedince jsem vypustil na původní lokalitě. Tabulka shrnující veškerá terénní data viz Příloha.

Druhý letní odběr probíhal v červenci, 7.7-18.7.2007, oproti jarnímu hlavně v noci s použitím svítilny. Odchycení jedinci byli přes noc vloženi do mokrého pytle, a po odběru vzorků vypuštěni na původní lokalitě. Vybraní jedinci z posledního dne odchyty byli převezeni z Rumunska do ČR.

**Tabulka 2.** Počty vyšetřovaných jedinců. Symboly: Juv – juvenil; Ad – adult; ♂ - samec; ♀ - samice.

Sezona	J	A	♂	♀	Total
Jaro	13	17	7	10	30
Léto	4	82	10	72	86

**Tabulka 3.** Velikostní rozpětí – SVL (mm) a hmotnosti (g) jednotlivých věkových kategorií. Symboly: Juv – juvenil; Ad – adult; ♂ - samec; ♀ - samice.

Sezona	J	A	♂	♀	Pooled
Jaro	31-54 mm 7-40 g	46-76 mm 30-96 g	46-66 mm 30-41 g	57-76 mm 45-96 g	31-76 mm 7-96 g
Léto	47-51 mm 11-24 g	55-111 mm 18-129 g	60-74 mm 28-38 g	55-111 mm 18-129 g	47-111 mm 11-129 g

### 4.3.2. Klasifikace vyšetřených zvířat pro statistické analýzy

Pro zařazení do kategorií podle věku bylo použito studie Yilmaz et al. (2005). Minimální velikost pro samice je 55 mm a dospívají ve dvou letech. Pro samce je minimální velikost 46 mm a dospívají ve dvou letech. Pohlaví bylo určováno podle Baruš (1992). Samci mají na spodní straně palců předních končetin pářící hrboly, které se v období páření zvětšují a černají. Zvukové rezonátory se vytvářejí při velikosti samců 58 mm a pářící se mozoly u samců délky těla 66 mm a více už nejsou patrné.

### 4.3.3. Získání a archivace krevních nátěrů

Pro získání vzorků jsem použil techniku ustříhnutí posledního článku prstu. Z ustříhnutého prstu jsem krev přímo kápnul na podložní sklíčko, rozetřel pomocí krycího sklíčka a nechal ve stínu zaschnout. Suché krevní roztěry byly fixovány 100% metanolem a následně ponechány ve stínu k zaschnutí. Vzorky z jara byly obarveny (přibližně po jednom týdnu) v laboratoři v ČR. K barvení vzorků jsem použil 7% geimsu, kterou jsem ponechal asi 20 min barvit. Poté byl vzorek vyndán a opláchnut destilovanou vodou. Letní vzorky byly barveny 15 min přímo v terénu 7%. Šest skokanů přivezených

z Rumunska bylo umístěno do akvaterária v pokojové teplotě pro pozdější odběry krve. Odběr krevních vzorků ze skokanů v laboratoři jsem provedl 8.6.2007 stejným způsobem jako u skokanů v přírodě. Veškeré krevní nátěry použité v této studii byly po jejím ukončení zařazeny do Sbírký Parazitických Protist Parazitologického ústavu Akademie Věd České Republiky v Českých Budějovicích pod katalogovými.

#### **4.3.4. Laboratorní vyšetření krevních nátěrů a výpočet parazitémie**

Obarvené krevní nátěry byly prohlíženy za použití světelného mikroskopu. Fotodokumentace byla pořízena školitelem v rámci pilotní studie v r. 2006 na světelném mikroskopu Olympus AX 70 vybaveném digitální kamerou.

Z krevních nátěrů skokanů jsem v první řadě zjišťoval, jaká je skladba ifrakomunity krevních protist vyšetřeného zvířete. Posledním krokem zpracování krevních nátěrů bylo zjištění prevalence, tj. proporce infikovaných jedinců ve vyšetřeném souboru, parazitémie (intensita), tj. proporce napadených erytrocytů (Margolls et al. 1982). Jako volní gamonti byli klasifikováni i ti, kteří byli zachyceni při vylézání z erytrocytu.

#### **4.4. Statistické vyhodnocení, výpočet prevalence a parazitémie**

Testování hypotéz vztahu prevalence mezi ročním obdobím a kategoriemi věku. Dále byla testována parazitémie a její interakce mezi ročním obdobím a kategoriemi věku, mezi ročním obdobím a pohlavím, mezi velikostí a hmotností.

K otestování vlivu sezóny a stáří na přítomnost parazitů ve skokanech jsem použil Factorial ANOVA v rámci zobecněného lineárního modelu (GLM). Parazitémii jsem otestoval závislosti vlivu sezóny a stáří na přítomnost parazitů ve skokanech Factorial ANOVA v rámci zobecněného lineárního modelu (GLM). U otestování vlivu velikosti a hmotnosti na parazitémii ve skokanech jsem použil Simple regression v rámci zobecněného lineárního modelu (GLM). Srovnání grafů závislosti velikosti na parazitémii na jaře a v létě jsem použil graf Scatterplots 2D. Data parazitémie byly transformovány Arcsinovou transformací, z důvodů urovnání dat.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Výsledky vyšetření krevních nátěrů – diverzita krevních protist a jejich prevalence

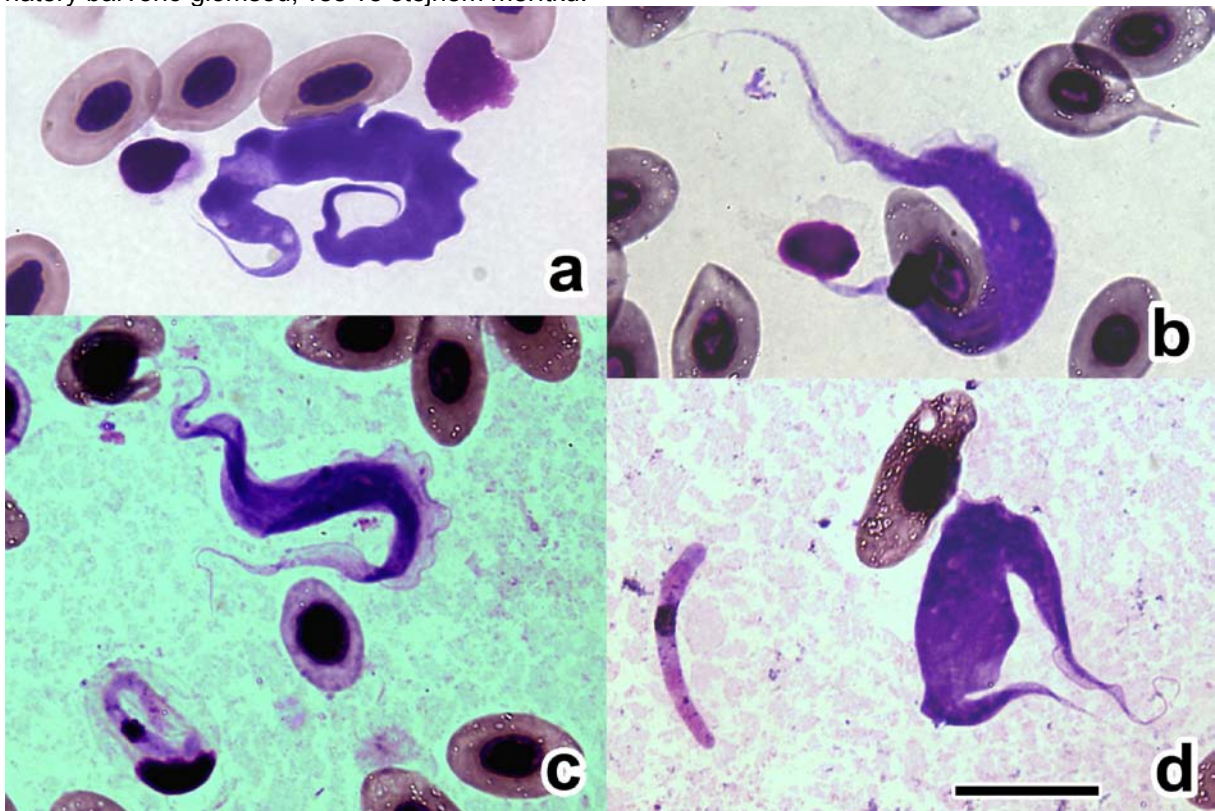
Ze 116 vyšetřených skokanů *P. ridibundus* bylo 100% infikováno krevními parazity. Celkem byly v krvi *P. ridibundus* z Histrie zjištěny tři druhy krevních protist a jeden druh bakterie.

#### 5.1.1. Euglenoza

U dvou skokanů (1.7%) ze 116 vyšetřených byla nalezena krevní stádia euglenozoi (Obr. 6) s délkou buňky přibližně 100  $\mu\text{m}$  (bez volných bičků) a šířkou 8-12  $\mu\text{m}$ . V jednom případě byl v nátěru jeden, v druhém pět jedinců. Cytoplasma byla vesměs velmi sytě zabarvena giemsou, což znemožnilo pozorování vnitřních struktur. Buňky měly protáhlý vřetenovitý tvar s nápadně protaženými póly jež se směrem ke konci pozvolna zužovaly a oba plynule přecházely v jeden relativně krátký volný bičík. Bičinky z opačných pólů buňky se jevily podobně dlouhé – asi 1/6 délky buňky. Undulující membrána probíhala podél celé délky buňky. Vzhledem k malému počtu nakažených jedinců (jeden skokan na jaře a jeden v létě) nebyly tyto organismy zahrnuty do následujících statistických analýz.

Celkový tvar buněk a přítomnost dvou heterodynamických bičků naznačuje příslušnost k čeledi Bodonidae, konkrétně rodu *Trypanoplasma* Laveran et Mesnil, 1901.

**Obr. 6.** Euglenozoa z krevní plasmy *P. ridibundus* z lokality Histria ve společnosti erytrocytů (a,b) a intraerytrocytárního (c), resp. volného (d) gamonta *Haemogregarina magna*; měřítko = 20  $\mu\text{m}$ ; krevní nátěry barvené giemsou, vše ve stejném měřítku.

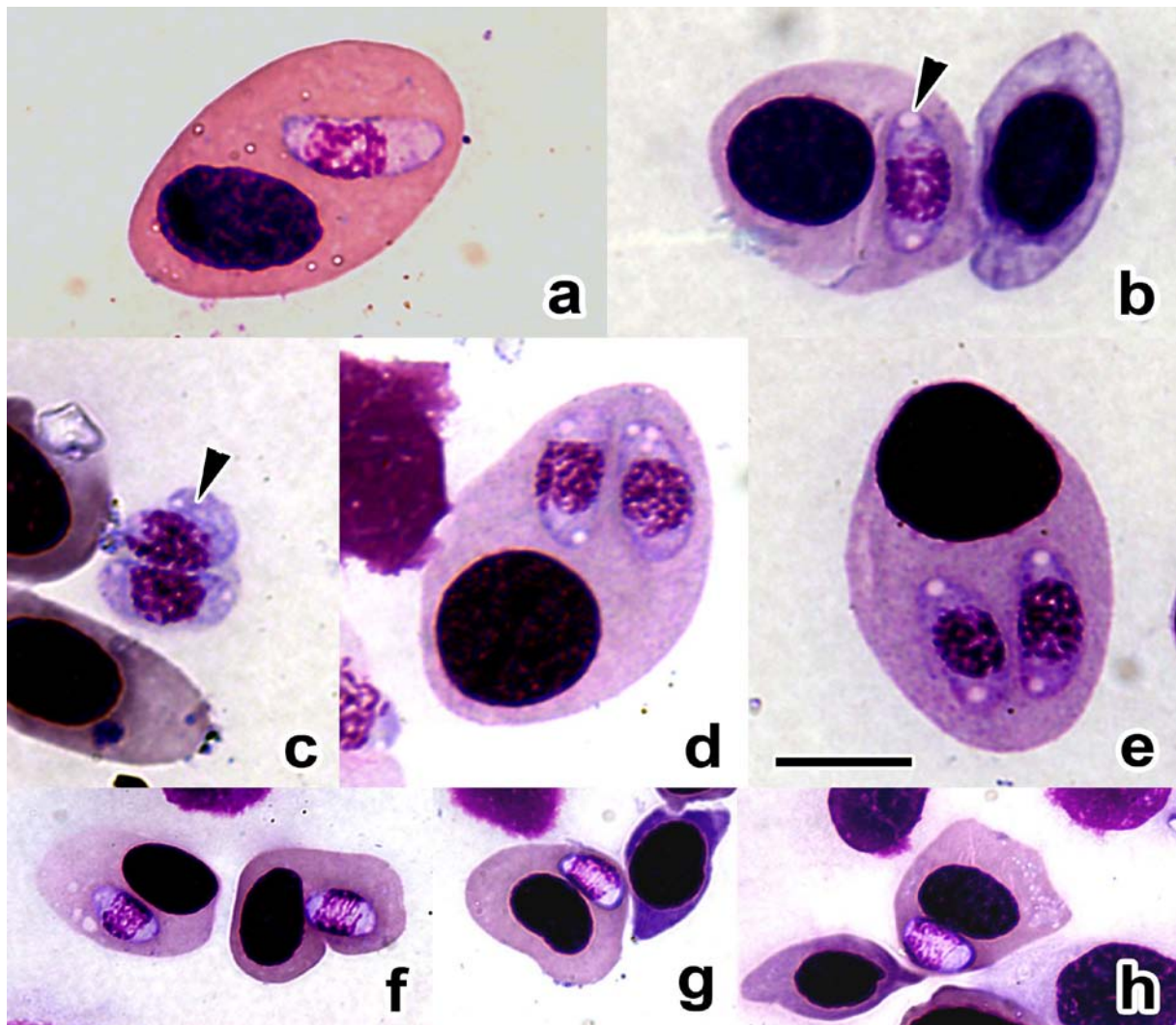


### 5.1.2. Apicomplexa

Pomocí světelné mikroskopie byl zjištěn častý výskyt dvou druhů intraerytrocytárních apikomplex *Haemogregarina hortai* a *Haemogregarina magna*. Erythrocyty napadené *H. hortai* i *H. magna* měly jádro posunuté mimo centrální část buňky a bývaly často zdeformované a mívaly cytoplasmou zabarvenou světleji než erythrocyty zdravé.

Gamonty prvního druhu, *H. hortai* (Obr. 7) byly nacházeny v cytoplasmě erythrocytů. Gamonty měly široce eliptický tvar s průměrnou délkou 9  $\mu\text{m}$  a šířkou 4  $\mu\text{m}$ . Jádro dlouhé 5  $\mu\text{m}$  a široké 4  $\mu\text{m}$  bylo většinou lokalizováno ve střední části buňky. Ač na první pohled morfologicky uniformní, vykazovaly gamonty *H. hortai* při detailnější prohlídce určitou variabilitu. Největší variabilita se dala vysledovat ve tvaru gamontů a organizace chromatinu v jádře. Nejběžnější forma měla široce eliptický až mírně rohličkovitý tvar buňky a kondenzované jádro ležící ve střední části buňky (Obr. 7 a-e).

**Obr. 7.** Gamonty *Haemogregarina hortai*. a – gamont bez refraktilních tělísek (RB), b – gamont s RB (šipka), c – dva gamonti mimo buňku – šipka ukazuje na záhyb buňky, d-e – erythrocyty hostící po dvou gamontech, f-h – gamonty s jádrem s nerovnoměrně rozloženým chromatinem; krevní nátěry barvené giemsou, a-e stejné měřítko, měřítko = 10  $\mu\text{m}$ .



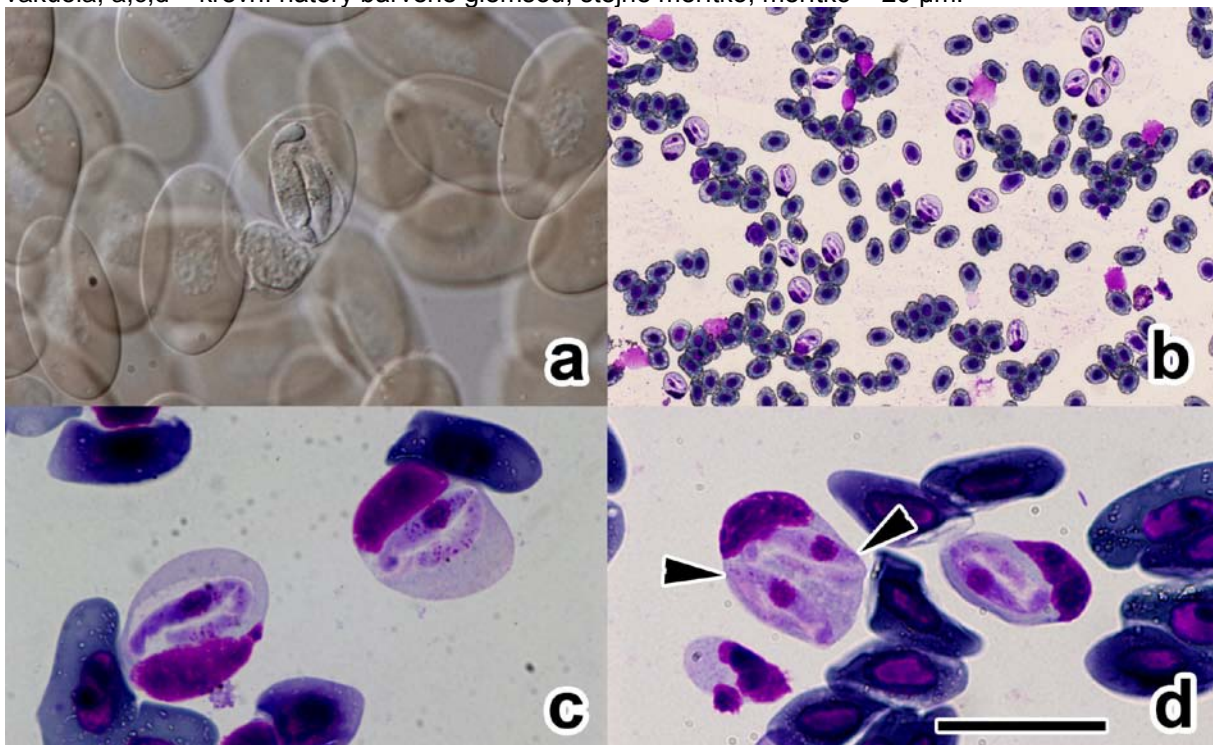


Většina těchto gamontů navíc měla jedno až tři výrazná refraktilní tělíška o průměru kolem 1  $\mu\text{m}$  u jednoho nebo obou pólů buňky (Obr. 7 b,d,e). Gamonty druhého typu (Obr. 7 f-g) byly tvarově nepravidelné a jejich jádro se jevílo jakoby rozdělené na dvě části tvořené shluky chromatinu, z nichž každá byla nahloučena v husté vrstvě podél protilehlých stěn buňky. Mezi těmito dvěma shluky chromatinu se obvykle nacházela zóna, kde koncentrace chromatinu byla výrazně řidší (Obr. 7). V jednom erythrocytu se většinou nacházel jeden, nebo dva, velmi výjimečně tři gamonti. Sporadicky (zřejmě šlo o artefakt) byly pozorovány gamonty mimo erythrocyty – na nich bylo možné pozorovat záhyb buňky (Obr. 7 c), naznačující, že zdánlivě kompaktní gamonti *H. hortai* jsou přehnutí, byť díky svým proporcím ne tak výrazně jako *H. magna*.

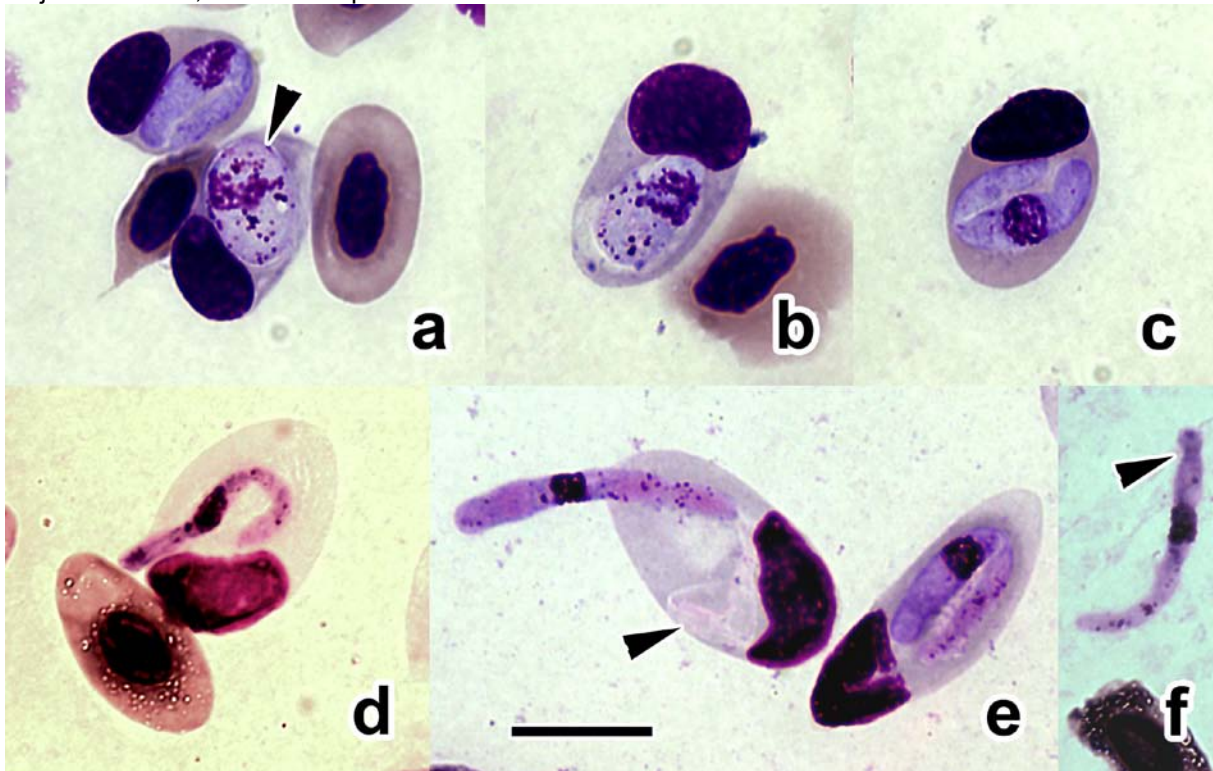
Druhá pozorovaná hemogregarina byla *H. magna* (Obr. 8 a 9) s charakteristickými velkými, typicky stočenými (přehnutými) intraerythrocytárními gamonty uloženými v často velmi výrazné parazitoforní vakuole. Průměrná velikost parazitoforní vakuoly vyplněné gamontem byla  $16.5 \times 9.5 \mu\text{m}$ . V krevních nátěrech z léta byli pozorováni volní gamonti v krevní plazmě  $22 \times 2.5 \mu\text{m}$ . Gamonti byli navíc poměrně často pozorováni při opouštění erythrocytů. Vnitřní morfologie intra- a extra-erythrocytárních gamontů byla identická – velké jádro v  $\sim 4/10$  délky gamonta a několik jemných granul koncentrovaných zejména v posteriorní části gamonta. Extraerythrocytární gamonti nebyli započítáni do výpočtu parazitémie, neboť nebylo možné je vztáhnout na objem krve.

Kromě typických intra- a extra-erythrocytárních gamontů byla zjištěna též velká oválná intraerythrocytární stádia, která by mohla představovat nedospělé gamonty v procesu diference (Obr. 9 a,b).

**Obr. 8.** Obecné aspekty infekce *Heamogregarina magna*, a – infikovaný erythrocyt v nativním preparátu, b – intraerythrocytární gamonty dobře viditelné i při malém zvětšení, c – obvykle erythrocyty obsahují jeden gamont, výjimečně (d) dva (šipky); na obrázcích a,c je dobře patrná parazitoforní vakuola; a,c,d – krevní nátěry barvené giemsoou, stejné měřítko, měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .



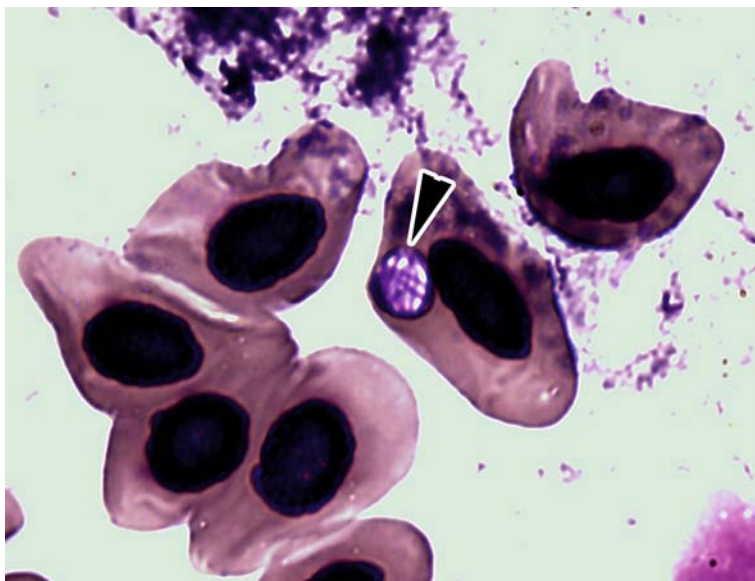
**Obr. 9.** Předpokládaný vývoj gamontů *Heamogregarina magna*, a (šipka) – předpokládaný nedospělý gamont oválného tvaru, b – nedospělý gamont mírně prodloužený – již je patrný jeho zahnutý konec (vlevo), c – dospělý gamont, d-e – gamonti vylézající z erythrocytu – šipka označuje zhroutčenou parazitoformní vakuolu, f – volný extraerythrocytární gamont. Krevní nátěry barvené giemsou, vše ve stejném měřítku, měřítko = 9 μm.



### 5.1.3. *Aegyptianella bacterifera*

U jednoho z vyšetřených skokanů byl zaznamenán výskyt cytoplasmatických intraerythrocytárních inkluzí obsahujících tyčinkovitá, giemsou silně obarvená tělíska (Obr.10).

Pravděpodobně se jedná o rickettsii *A. bacterifera*.



**Obr. 10.** Erythrocyt obsahující oválnou inkluzi (šipka) s rickettsiemi *Aegyptianella bacterifera*, jež jsou v cystě poskládány jakoby ve dvou vzájemně překřížených vrstvách.

## 5.2. Prevalence

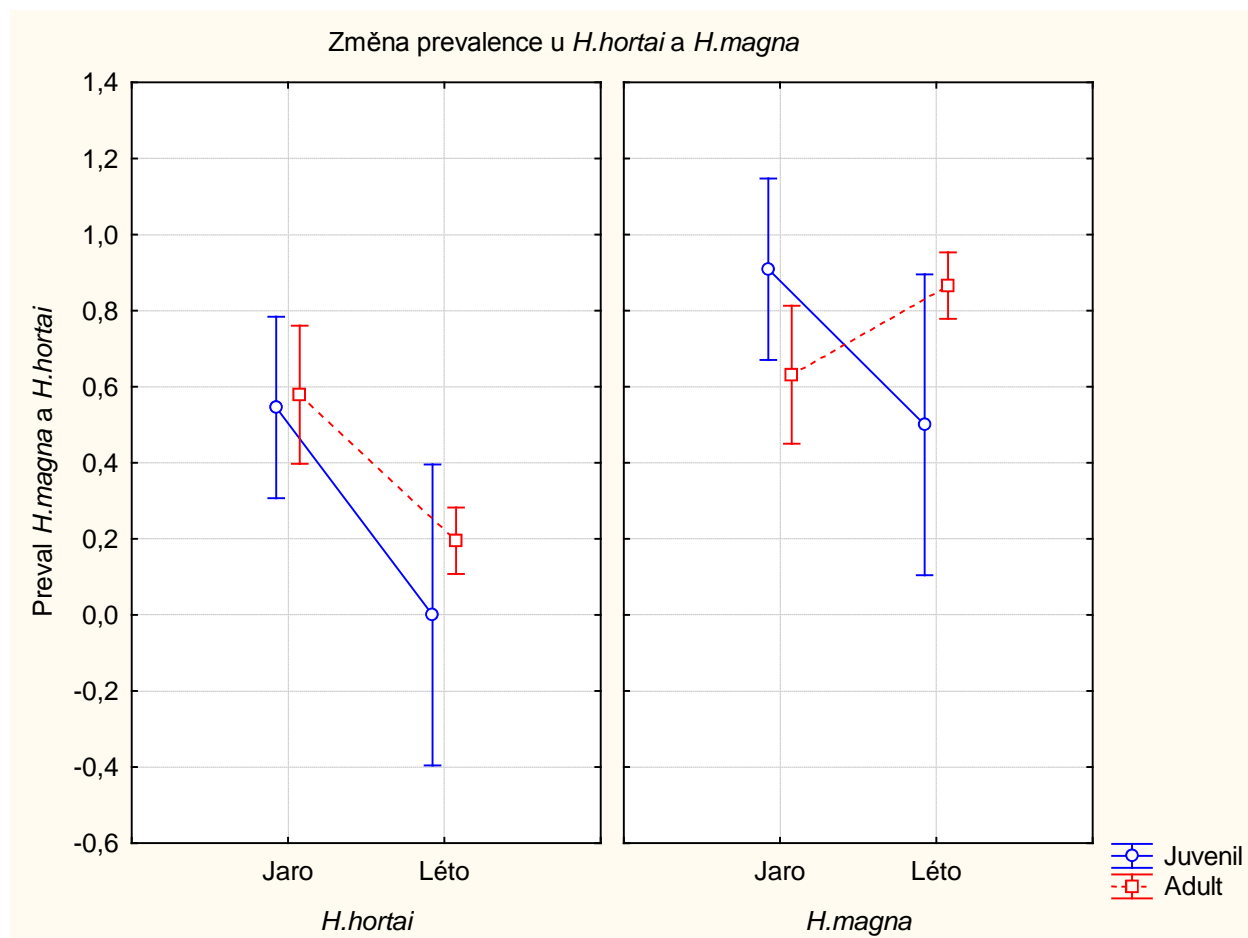
Prevalence *H.hortai* a *H.magna* se u skokanů liší jak mezi věkovými skupinami (Tabulky 4 a 5), tak v závislosti na ročním období (Tabulka 6.). V letním období prevalence *H.hortai* u obou věkových kategorií poklesla, zatím co prevalence *H.magna* vzrostla u adultů a poklesla u juvenilů (Graf 1.).

**Tabulka 4.** Prevalence na jaře. Symboly: Juv – juvenil; Ad – adult; ♂ - samec; ♀ - samice.

Jaro 2007		Juv	Ad	♂	♀	Total
Jedinci		14	16	6	10	30
Infikovaní	<i>H.hortai</i>	11	6	2	4	17
	<i>H.magna</i>	11	12	4	8	23
Prevalence	<i>H.hortai</i>	79%	37%	33%	40%	57%
	<i>H.magna</i>	79%	75%	66%	80%	77%

**Tabulka 5.** Prevalence v létě. Symboly: Juv – juvenil; Ad – adult; ♂ - samec; ♀ - samice.

Léto 2007		Juv	Ad	♂	♀	Total
Jedinci		4	82	10	72	86
Infikovaní	<i>H.hortai</i>	0	16	5	11	17
	<i>H.magna</i>	2	71	10	61	23
Prevalence	<i>H.hortai</i>	0%	20%	50%	15%	57%
	<i>H.magna</i>	50%	87%	100%	84,72%	77%



**Graf 1.** Změna prevalence *H. hortai* a *H. magna* v závislosti na věk. kategorii hostitele a roč. období.

**Tabulka 4.** Změna prevalence *H. hortai* a *H. magna* v závislosti na věkové kategorii hostitele a ročním období. Symboly: \* - Signifikantní, H.h – *Haemogregarina hortai*, H.m – *Haemogregarina magna*.

	SS	DF	MS	F	p	Sign
Nulový model	22,009	1,000	22,009	136,596	10*10 <sup>-6</sup>	
H.m a H.h	3,104	1,000	3,104	19,263	10*10 <sup>-6</sup>	*
Období	1,502	1,000	1,502	9,324	0,003	*
Věkové kategorie	0,124	1,000	0,124	0,768	0,382	
H.m a H.h*Období	0,701	1,000	0,701	4,354	0,038	*
H.m a H.h*Věkové kategorie	0,024	1,000	0,024	0,150	0,698	
Období*Věkové kategorie	0,799	1,000	0,799	4,956	0,027	*
H.m a H.h*season*age	0,286	1,000	0,286	1,775	0,184	
Error	36,091	224,000	0,161			

### 5.3. Parazitémie

**Tabulka 5.** Parazitémie *H. hortai* na jaře v %: Ad – Adult; ♂ - samec; ♀ - samice.

H.hortai		rozmezí P	
T		0.02%	17.26%
J		0.02%	17.26%
A	TA	0.02%	2.42%
	♂	0.13%	2.42%
	♀	0.02%	0.09%

**Tabulka 6.** parazitémie *H. magna* na jaře v %: Ad – Adult; ♂ - samec; ♀ - samice

<i>H.magna</i>		rozmezí P	
T		0.09%	8.74%
J		0.13%	3.69%
A	TA	0.09%	8.74%
	♂	0.25%	2.28%
	♀	0.09%	8.74%

**Tabulka 7.** Parazitémie *H. hortai* v létě v %: Ad – Adult; ♂ - samec; ♀ - samice

H.hortai		rozmezí P	
T		0.02%	2.21%
J		0%	0%
A	TA	0.02%	2.21%
	♂	0.02%	2.21%
	♀	0.02%	0.47%

**Tabulka 8.** parazitémie *H. magna* v létě v %: Ad – Adult; ♂ - samec; ♀ - samice

<i>H.magna</i>		rozmezí P	
T		0.02%	11.92%
J		0.11%	0.9%
A	TA	0.02%	11.92%
	♂	0.02%	11.92%
	♀	0.02%	11.63%

**Tabulka 9.** Závislost parazitémie na SVL *H.magna*.

	SS	DF	MS	F	P	Sign
Nulový model	0,042	1	0,042	5,082	0,026	
SVL	0,003	1	0,003	0,346	0,558	
Error	0,941	114	0,008			

**Tabulka 10.** Závislost parazitémie na SVL *H. hortai*. Symboly: \* - signifikantní.

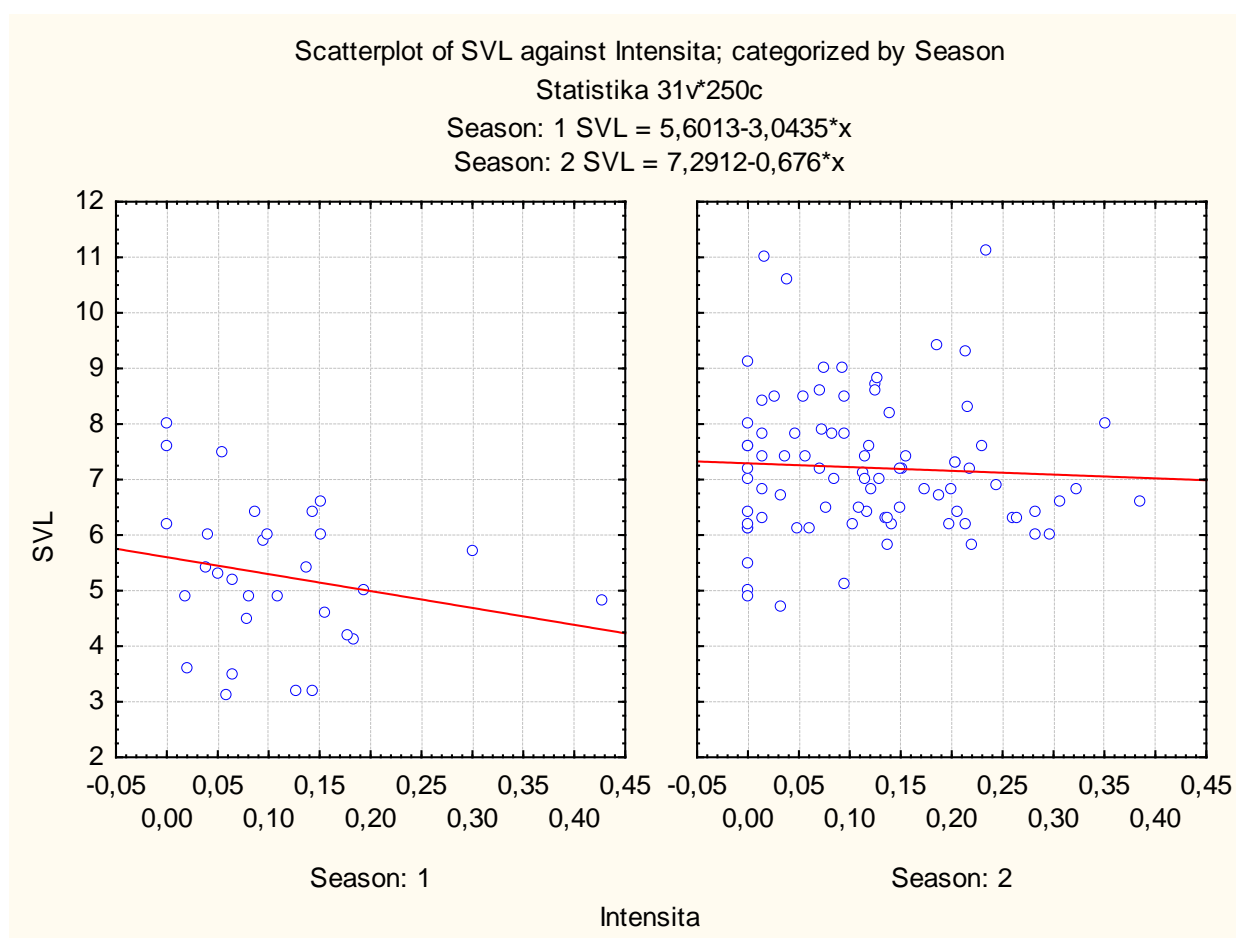
	SS	DF	MS	F	P	Sign
Nulový model	0,029	1	0,029	13,071	0,0004	
SVL	0,018	1	0,018	8,172	0,005	*
Error	0,255	114	0,002			

**Tabulka 11.** Závislost parazitémie na hmotnosti u *H. magna*.

	SS	DF	MS	F	P	Sign
Nulový model	0,363	1	0,363	44,040	$10 \cdot 10^{-6}$	
Hmotnost	0,003	1	0,003	0,406	0,525	
Error	0,941	114	0,008			

**Tabulka 12.** Závislost parazitémie na hmotnosti u *H. hortai*.

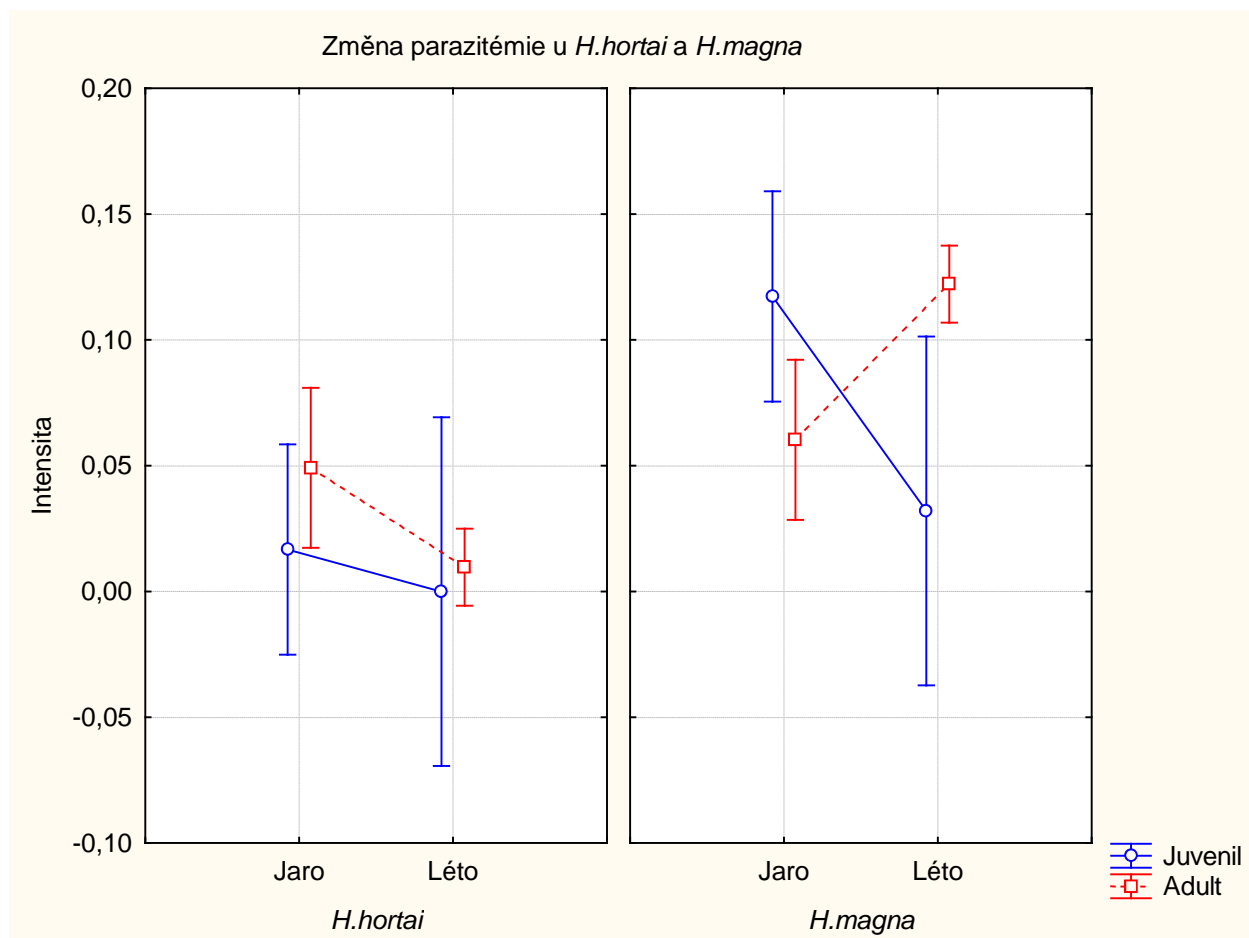
	SS	DF	MS	F	P	Sign
Nulový model	0,016	1	0,016	6,915	0,010	
Hmotnost	0,003	1	0,003	1,058	0,306	
Error	0,271	114	0,002			



**Graf 2.** Závislost velikosti v cm (SVL) na parazitémii na jaře (sezona 1) a v létě (sezona 2).



**Graf 3.** Změna parazitémie *H. magna* a *H. hortai* v závislosti na ročním období a věkové kategorii hostitele.

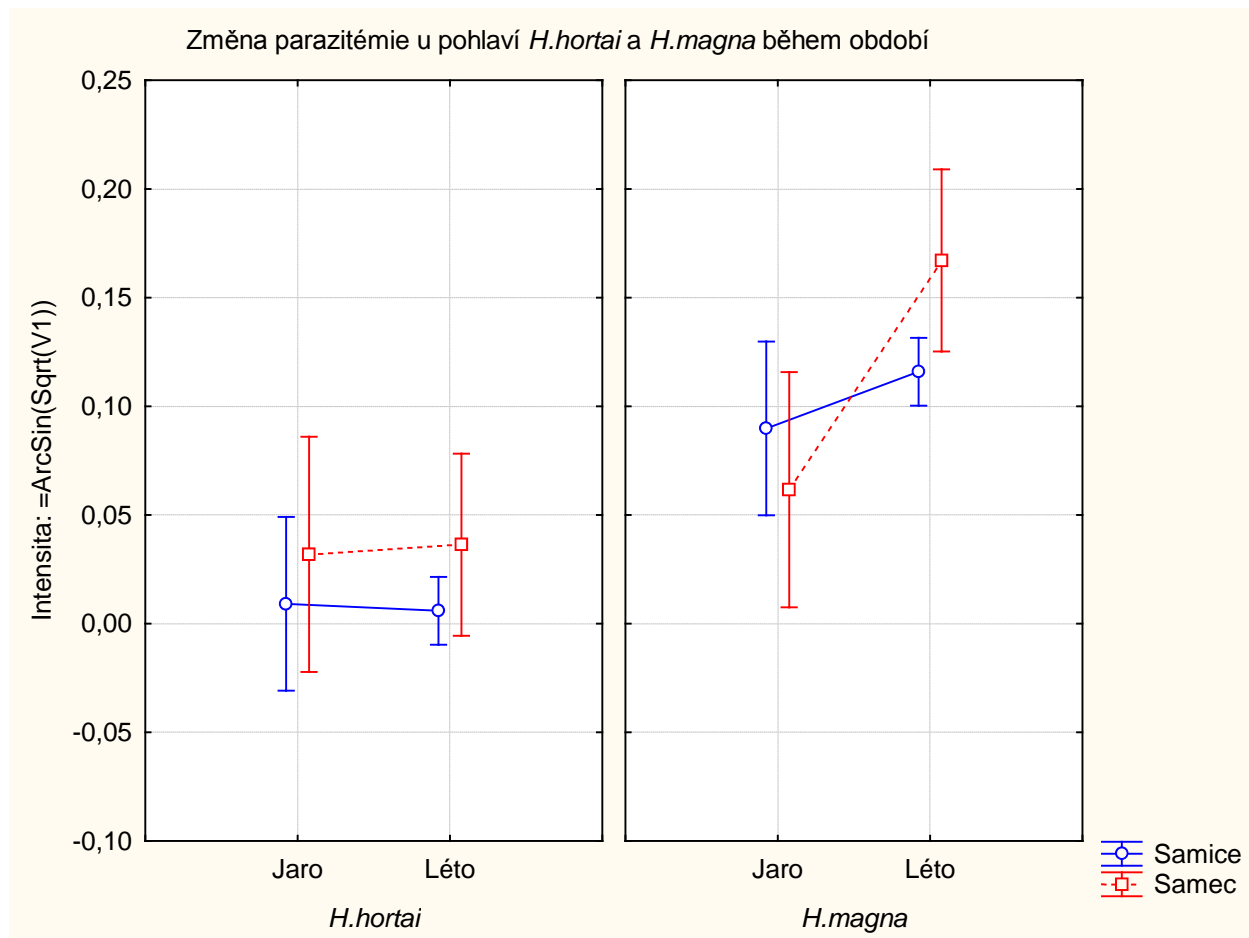


**Tabulka 13.** Změna parazitémie u *H. magna* a *H. hortai* v závislosti na ročním období a věkové kategorii.

Symbols: \* - Signifikantní, H.h – *Haemogregarina hortai*, H.m – *Haemogregarina magna*.

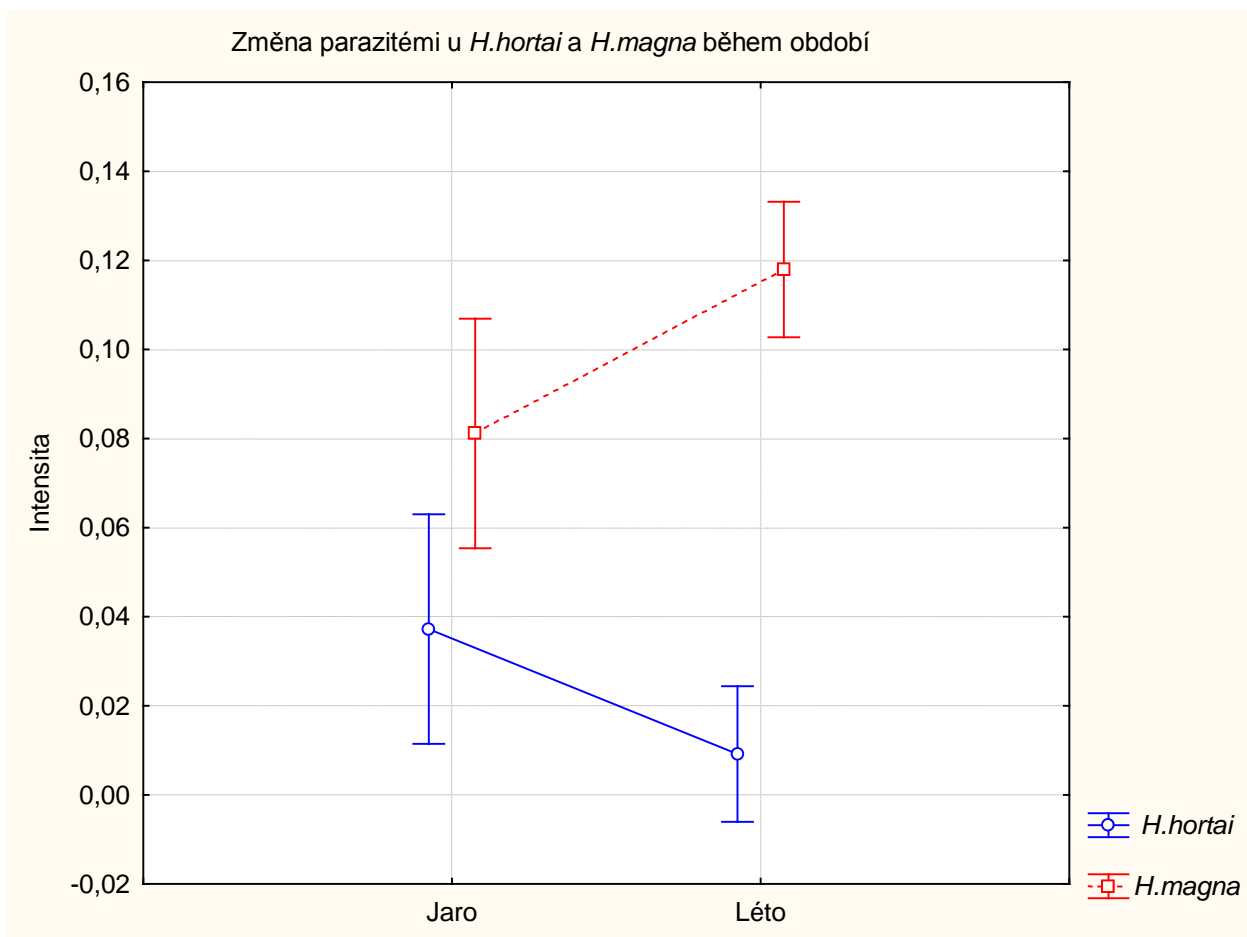
	SS	DF	MS	F	p	Sign
Nulový model	0,2048	1	0,2048	41,3736	0,0000	
H.m a H.h	0,0810	1	0,0810	16,3584	0,0001	*
Období	0,0078	1	0,0078	1,5772	0,2105	
Věkové kategorie	0,0070	1	0,0070	1,4134	0,2358	
H.m a H.h*Období	0,0013	1	0,0013	0,2692	0,6044	
H.m a H.h*Věkové kategorie	0,0001	1	0,0001	0,0205	0,8863	
Období*Věkové kategorie	0,0191	1	0,0191	3,8516	0,0509	
H.m a H.h*season*age	0,0356	1	0,0356	7,1912	0,0079	*
Error	1,1086	224	0,0049			

**Graf 4.** Změna parazitémie *H. hortai* a *H. magna* v závislosti na pohlaví hostitele a ročním období.



**Tabulka 14.** Změna parazitémie u pohlaví *H.hortai* a *H.magna* během období. Symboly: \* - Signifikantní.

	SS	DF	MS	F	p	Sign
Nulový model	0,362	1	0,362	80,125	0,000	
Pohlaví	0,008	1	0,008	1,731	0,190	
Období	0,024	1	0,024	5,256	0,023	*
H.h a H.m	0,166	1	0,166	36,773	$10 \cdot 10^{-6}$	
Pohlaví*Období	0,010	1	0,010	2,259	0,134	
Pohlaví*H. h a H.m	0,001	1	0,001	0,270	0,604	
Období*H. h a H. m	0,023	1	0,023	5,067	0,026	*
Pohlaví*Období*H. h a H. m	0,007	1	0,007	1,536	0,217	
Error	0,858	190	0,005			



**Graf 5.** Změna parazitémie během období u *H.hortai* a *H.magna*.

**Tabulka 15.** Změna parazitémie během období u *H.hortai* a *H.magna*. Symboly: \* - Signifikantní.

	SS	DF	MS	F	p	Sign
Nulový model	0,672	1,000	0,672	130,966	$10 \cdot 10^{-6}$	
H.m a H.h	0,259	1,000	0,259	50,532	$10 \cdot 10^{-6}$	*
Období	0,001	1,000	0,001	0,166	0,684	
H.m a H.h*Období	0,047	1,000	0,047	9,115	0,003	*
Error	1,170	228,000	0,005			

#### 5.4. Laboratorní vyšetření krevních nátěrů a výpočet parazitémie

Laboratorní odběr byl proveden 8.6.2007 v Českých Budějovicích. Ve vzorcích byli nalezeni intra- a extra-erytrocytární gamonti *H. magna*.

Podle statistického vyhodnocení parazitémie nezávisí na době odběru, tj. odběr na jaře, v létě a v laboratoři (Tabulka 16.).

**Tabulka 16.** Změna intenzity parazitémie během jara, léta a laboratorního odběru. Symboly: \* - Signifikantní.

	SS	DF	MS	F	P	Sign
Nulový model	0.572	1	0.572	63.941	$10 \cdot 10^{-6}$	
Období odběru	0.019	2	0.010	1.075	0.345	
Error	1.047	117	0.009			



## 6. DISKUSE

Naše výsledky ukázaly ve sledované populaci na vzácný výskyt krevních euglenozoi. Vizualně a rozměr je neodlišitelná od *Trypanosoma neveuilemairei*, jak ji popisuje Barta et al. (1989) ze skokanů zelených z Korsiky. Vzhledem k tomu, že jak zjištěná euglenozoa z Histrie, tak organismy zobrazené Bartou et al. (1989) mají volný bičík na obou pólech, je pravděpodobné, že se v obou případech jedná o dosud nerozlišený druh rodu *Trypanoplasma*. Zástupci tohoto rodu parazitují v krvi ryb a byl prokázán též sporadický výskyt u ocasatých obojživelníků (Barta 2000). Jejich omezený výskyt na sledované lokalitě by mohl být způsoben nízkou abundancí skokanů, nebo definitivního hostitele (vektora), zřejmě pijavky. V případě, že by vektorem byla pijavka, jak se u trypanoplasm obecně předpokládá, dalo by se očekávat, že podobnou prevalenci budou vykazovat i jiní pijavkami přenášené parazité. To je v rozporu se zjištěnou vysokou prevalencí *Haemogregarina* spp. v Histrii. Zde je však důležité zmínit, že pijavka jako definitivní hostitel a vektor se sice u hemogregarin obojživelníků obecně předpokládá, ale pravdou zůstává, že vývojový cyklus žádné *Haemogregarina* spp. z obojživelníků dosud nebyl objasněn. Kromě distribuce hostitelů může být výskyt ovlivněn vlastními životními cykly parazita během sezón a dne, kdy se trypanosomy v zimních měsících stáhnou do cévního řečiště vnitřních orgánů a až v teplejším období se rozšíří také do periferních cév. Podobný průběh lze např. u trypanosom možno sledovat také během dne a noci. Tyto cykly trypanosom jsou zřejmě spojeny s aktivitou přenašečů. K vyloučení možnosti že námi zjištěné nízké prevalence nejsou artefakt způsobené nevhodnou dobou odběrů by však bylo zapotřebí provést paralelně denní i noční odběry.

V této souvislosti je zajímavá absence dalšího krevního parazita pravděpodobně běžného ve vlastní sladkovodní deltě Dunaje. Je jím *Lankesterella minima* známá z pilotní studie z okolí Sfintu Gheorghie 44°53'45"N, 29°35'47"E (Jirků et al. unpubl. data). Zejména ve světle skutečnosti, že jeho intraerytrocytární stádia (soprozoity) nemají možnost ovlivňovat svou lokalizaci v rámci těla obratlovčího hostitele a odběry byly prováděny v době předpokládaného nejčastějšího výskytu sporozoitů v krvi žab, lze usoudit na skutečnou absenci *L. minima* na lokalitě Histria.

Jako signifikantní se dle našich výsledků jeví závislost prevalence hemogregarin na sezóně (jaro/léto) a věku (dospělý/nedospělý) skokanů (Tab. 4). Závislost na věku však může být u juvenilů náhodně zkreslena malým počtem v létě vyšetřených jedinců, kdy dva z (pouhých) čtyř byli nakažení. Takže zatímco u juvenilních jedinců parazitémie v létě poklesla, u dospělců došlo k jejímu zvýšení (Graf 1). Na tomto místě je potřeba připomenout, že zvířata námi označovaná jako juvenilní je nutné brát *de-facto* jako subadulty, neboť již mají před sebou druhou hibernaci a dosahují i poloviční velikosti dospělce (viz Tabulka 2). Zatímco pokles prevalence u juvenilů je tedy sporný, nárůst u dospělců je zřejmě očekávanější vzhledem k možnému merogoniálnímu množení v erythrocytech, příp. endotelu cév jak je to známo u *Haemogregarina balli* z vodních želv, ovšem za předpokladu, že oba druhy jsou skutečně příbuzné, což nelze vzhledem k absenci molekulárně fylogenetických, morfologických a biologických informací potvrdit.

Závislost parazitémie na délce a hmotnosti zkoumaných skokanů Tabulky 9-12 nebyla prokázána. Podle Amo (2004) na jaře BMI nekoreluje s intenzitou parazita, ale v létě je korelace patrná. V mých zpracovaných odběrech odpovídají zjištění Amo (2004) pouze vzorky získané na jaře, vzorky odebrané v létě však korelaci nevykazují. U skokanů odchycených v Rumunsku na jaře nebyla

zjištěna žádná závislost mezi parazitérií a jejich délkou a hmotností. Stejný výsledek jsem zjistil i v létě, kdy také nebyla závislost zjištěna.

Ve vzorcích z laboratorního odběru skokanů odchycených na jaře byli nalezeni i volní zoiti v krvi. To může ukazovat na namnožení gamontů či merontů v erytrocytech a jejich následné uvolnění do krevního řečiště, kde mohou napadat další erytrocyty nebo být nasáti bezobratlým přenašečem.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andresen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kurgens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, MCCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Sharer CA, Smirnov AV, Spegel FW and TAYLOR MFJR 2005. The new higher level classification of eucaryotes with emphasis on the taxonomy of Protist. *Journal of Eucaryotic Microbiology*. 52(5): 399 – 451

Amo L., López P. and Martín J. (2004). Prevalence and intensity of haemogregarinid blood parasites in a population of the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. 94: 290 - 293

Barta JR, Boulard Y, and Desser SS 1989. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society*. 108: 6–20

Barta JR 2000. Kapitola. Suborder Adeleorina Léger, 1911 In: Lee JJ (ed), Leedale GF, Bradbury P. An Illustrated Guide to the Protozoa, Second edition:.. Society of Protologists, 305 - 339

Baruš V 1992. Obojživelníci Amphibia, Academia Praha 1992

Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, and Parkes H 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-9036

Blaustein AR, Romansic, J, Kiesecker, M., and Hatch AC. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity & Distributions* [print] 9:123-140.

Bosch J, Martinez-Solano I, and Garcia-Paris M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* 97: 331-337.

Carey C, and Alexander MA, 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions* 9:111-121.

Caudell JN, Whittier J, Conover MR 2002. The effects of haemegregarine – like parasites on brown tree snakes (*Boiga irregularis*) and slatey – grey snakes (*Stegonotus cucullatus*) in Queensland, Australia. *Int Biodet Biodegrad* 49: 113 – 119

Cavalier-Smith T (August 1998). "A revised six-kingdom system of life". *Biol Rev Camb Philos Soc* 73 (3): 203–66

Cunningham AA, Langton TES, Bennett PM, Lewin JF, Drury SEN, Gough RE, and Macgregor SK 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 351: 1539-1557.

Daszak, P, Cunningham A A, and Hyatt AD 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity & Distributions* [print] 9:141-150.

Desser SS, and Barta JR 1984. An intraerythrocytic virus and rickettsia of frogs from Algonquin Park, Ontario. *Can. J. Zool.*, 62: 1521 – 1524

Desser SS and Yekutieli D 1987. Blood parasite of amphibians and reptiles in Israel. *Israel J. Zool.*, 34: 77 – 90

Desser SS 2001. The blood parasite of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of the trypanosomes. *J. Parasitology* 87: 152 – 160

Duellman WE and Trueb L 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York, 492

Franca C 1910. Notes sur les Hématozoaires de la Guinée Portugaise. *Proc. Cal. Acad. Sci.* 1, 1-72

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, and Vonk A 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5476-5480.

Hegner RW 1921. *Cytamoeba bacterifera* in the red blood cells of the frog. *J. Parasitol.* 7: 157

Hoare CA 1972. *The trypanosomes of mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford U.K., p 30 – 56

Kats LB, and Ferrer RP 2003. Alien predators and amphibian declines: Review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity & Distributions* [print] 9:99-110.

Kiesecker, JM, Blaustein AR, and Belden LK 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681-684.

Lehmann DL 1961. *Cytamoeba bacterifera* Labbé, 1894. I. Morphology and host incidence of the parasites in California. *J. Protozool* 8(1), 29 – 33 (1961)

Levine ND 1988. The protozoan phylum Apicomplexa. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 351

Margolls L, Esch GW, Holmes JC, Kuris AM, and Schal GA 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *J. Parasitol.*, 68(1): 131 – 133

Marsh DM, and Trenham PC 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology* 15:40-49.

Martin DS, Wright ADG, Barta JR, Desser SS 2002. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallasi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveuilemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *J. Parasitol.*, 88(3): 566–571

Møller AP, Christ P, Lux E 1999. Parasitism, host immune function, and sexual selection. *Q Rev Biol* 74: 3 – 20

O'Dwyer LH, Moco TC, da Silva RJ 2004. Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Parasitol Res* 92: 110 – 112

Olsson M, Wapstra E, Madsen T, Silverin B (2000). Testosterone, tick and travels? A test of the immunocompetence – handicap hypothesis in free – ranging male sand lizards. *Proc R Soc Lond B* 267:2339 – 2343

Paterson WB, Desser SS, and Barta JR 1988. Ultrastructural features of the apical complex, pellicle, and membranes investing the gamonts of *Haemogregarina magna* (Apicomplexa: Adeleina). *J Protozool.*, 35(1): 73 – 80

Pounds A, Fogden M and Campbell J 1999. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398:611-614.

Přívora M 1948: Sporozoa z krve *Rana esculenta*. *Věst. Čs. Zool. Spol.*, 12:141 – 149

Salvador A, Veiga JP, Martín J, López P, Abelenda M, Puerta M (1996). The cost of producing a sexual signal: testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasitic infestation. *Behav Ecol* 7: 145 -150

Scholtz 1979. Fine structure of parasitic protozoa: an atlas of micrographs, drawings and diagrams. Springer 1979

Sheldon BC and Verhulst S 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 11: 317 – 321

Siddall ME and Desser SS 1990. Gametogenesis and sporogonic development of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the leech *Placobdella ornata*. *J. Protozool.* 37: 511 – 520

Siddall ME and Desser SS 1991. Merogonic development of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the leech *Placobdella ornata* (Glossiphoniidae), its transmission to a chelonian intermediate host and phylogenetic implications. *J. Parasitol.* 77: 426 – 436

Siddall ME 1995. Phylogeny of Adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the Haemogregarine complex. *J. Euk. Microbiol.*, 42(2): 116 – 125

Stuart S, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fishman DL and Waller RW 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. - *Science* 306: 1783-1786.

Svahn K 1974. Incidence of blood parasites of the genus *Karyolysus* (Coccidia) in Scandinavian lizards. *Oikos* 25: 43 – 53

Chutmongkonkul W, Khonsue TM, Pariyanonth P 2006. Blood parasites of six species of wild amphibians from Khun Mae Kuang forest area, *Chulalongkorn Uni. Fac. of Vet. Sc., Bangkok, Thailand*, 26-29

Veiga JP, Salvador A, Merino S, Puerta M 1998. Reproductive effort affects immune response and parasite infection in a lizard: a phenotypic manipulation using testosterone. *Oikos* 82: 312 – 318

Vojtková L and Roca V 1993. Parasites of the Fris and tors in Europe. Part I: Protozoa. *Rev. Esp. Herp.* 7: 37 – 45

Vredenburg VT 2004. Reversing introduced species effects: Experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of declining frog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(20):7646-7650.

Werner JK. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. *Journal of Parasitology.*;79(3):356-363.

Wolf P and Horák P et al. 2007: Paraziti a jejich biologie, Tritoton 2007

[www.amphibiaweb.org](http://www.amphibiaweb.org)

Yilmaz N, Kutrup B, Cobanoçlu Ü, And Özoran Y 2005. Age determinativ and some growth parameters of a *Rana ridibunda* population in Turkey. Acta Zoologica Academiae Scintiarum hugaricae 51: 67 – 74

Zwach I 2009. Obojživelníci a plazi České republiky. Grada Publishing, a.s. 2009

Žičkus T 2002. The frist data on the fauna and distribution of blood parasite sof amphebians in Lithuania. Acta Zoologica Lituanica, Volume 12(2): 197-202

## 8. PŘÍLOHA – tabulka získaných dat

Symboly			
<b>m</b>	hmotnost (g)	<b>H.m</b>	<i>H. magna</i>
<b>SVL</b>	délka (cm)	<b>H.h</b>	<i>H. hortai</i>
<b>sex</b>	0 = samice; 1 = samec; J = juvenil	<b>V</b>	volní zoit
<b>Eryt</b>	počet erytrocytů z krevního nátěru	<b>Int H.m</b>	Parazitémie <i>H. magna</i>
<b>*</b>	<i>Euglenozoa</i> ve vzorku	<b>Int H.h</b>	Parazitémie <i>H. hortai</i>

Jarní odběr									
Vzorek	m	SVL	Sex	Eryt	H.m	H.h	V	Int H.m	Int H.h
H 1 / 07	64	6,4	0	4173	86	0	0	0,0206	0,0000
2.	52	6	0	5279	122	0	0	0,0231	0,0000
4.	96	8	0	6835	0	0	0	0,0000	0,0000
5.	41	6,6	1	4006	91	0	0	0,0227	0,0000
6.	90	7,5	0	4705	10	4	0	0,0021	0,0009
7.	73	6,4	0	4581	35	0	0	0,0076	0,0000
8.	40	5,4	J	4663	15	74	0	0,0032	0,0159
9.	40	5,2	1	4604	19	0	0	0,0041	0,0000
10.	39	4,8	J	4398	0	759	0	0,0000	0,1726
11.	45	5,7	0	5582	488	1	0	0,0874	0,0002
12.	51	6	0	4606	4	4	0	0,0009	0,0009
13.	53	6,2	1	4211	0	0	0	0,0000	0,0000
14.	40	5,3	1	4316	11	0	0	0,0025	0,0000
15.	85	7,6	0	4182	0	0	0	0,0000	0,0000
16.	51	5,9	0	4599	41	1	0	0,0089	0,0002
17.	35	5	J	4396	162	2	0	0,0369	0,0005
18.	30	4,6	1	4256	0	103	0	0,0000	0,0242
19.	35	4,9	1	4713	51	6	0	0,0108	0,0013
20.	36	5,4	J	4661	6	1	0	0,0013	0,0002



21.	29	4,9	J	4470	29	0	0	0,0065	0,0000
22.	35	4,5	J	4220	26	0	0	0,0062	0,0000
23.	30	4,9	J	5369	0	2	0	0,0000	0,0004
24.	48	6	0	4653	45	0	0	0,0097	0,0000
25.	7	3,1	J	5301	0	19	0	0,0000	0,0036
26.	23	4,1	J	4416	149	0	0	0,0337	0,0000
27.	24	4,2	J	5413	166	3	0	0,0307	0,0006
28.	11	3,2	J	4238	52	17	0	0,0123	0,0040
29.	13	3,2	J	4274	84	4	0	0,0197	0,0009
30.*	15	3,5	J	4771	15	5	0	0,0031	0,0010
31.	16	3,6	J	4672	0	2	0	0,0000	0,0004

Letní odběr									
Vzorek	m	SVL	Sex	Eryt	H.m	H.h	V	Int H.m	Int H.h
Hi 1 / 07	35,1	6,8	0	4415	173	3	18	0,0392	0,0007
2.	33,9	6,4	0	4523	0	0	0	0,0000	0,0000
3.	24,1	6,2	0	4152	82	0	113	0,0197	0,0000
4.	33,1	7,1	0	4990	64	0	3	0,0128	0,0000
5.	27,2	6,4	0	4184	174	1	14	0,0416	0,0002
6.	38,2	6	1	4367	335	4	1	0,0767	0,0009
7.	30,9	6,1	0	4160	0	0	0	0,0000	0,0000
8.	41,9	7,4	0	4019	54	0	0	0,0134	0,0000
9.	24,1	5	J	4396	0	0	0	0,0000	0,0000
10.	31,7	6,3	0	4264	283	0	0	0,0664	0,0000
11.	39,5	7	0	4042	0	0	0	0,0000	0,0000
12.	31,5	6,7	0	4790	5	0	0	0,0010	0,0000
13.	34,2	7,6	0	5180	0	0	0	0,0000	0,0000
14.	57,9	8,2	0	4279	83	0	0	0,0194	0,0000
15.	33	7,4	1	4262	1	0	0	0,0002	0,0000
16.	35,8	6,2	1	4156	43	1	0	0,0103	0,0002

17.	33,1	6,1	0	4480	11	0	0	0,0025	0,0000
18.	38,7	7,2	0	4738	0	0	0	0,0000	0,0000
19.	49,6	8,4	0	5138	1	0	0	0,0002	0,0000
20.	56,3	8,7	0	4073	64	0	0	0,0157	0,0000
21.	68,2	8,8	0	4124	67	0	0	0,0162	0,0000
22.	80,3	9	0	4601	40	0	0	0,0087	0,0000
23.	76	8,3	0	4574	211	0	0	0,0461	0,0000
24.	87,3	9,3	0	4317	191	4	0	0,0442	0,0009
25.	56,8	8,5	0	4499	14	0	0	0,0031	0,0000
26.	30,2	6,8	1	4078	319	90	0	0,0782	0,0221
27.	56,4	8,5	0	4292	38	0	0	0,0089	0,0000
28.	40,6	7,4	0	4785	15	0	0	0,0031	0,0000
29.	35,9	7,6	0	4606	66	0	0	0,0143	0,0000
30.	27,1	7,2	0	4338	22	0	0	0,0051	0,0000
31.	27,7	7	0	4218	31	0	0	0,0073	0,0000
32.	37,3	6,8	0	4841	1	0	0	0,0002	0,0000
33.	48,4	8,6	0	4821	75	0	0	0,0156	0,0000
34.	37,4	7,6	0	4353	0	0	0	0,0000	0,0000
35.	36	7,4	0	4544	6	0	0	0,0013	0,0000
36.	77,5	9,4	0	4940	169	0	0	0,0342	0,0000
37.	66,2	9,1	0	4344	0	0	0	0,0000	0,0000
38.	88,2	10,6	0	4623	7	0	0	0,0015	0,0000
39.	29,8	6,4	0	4791	66	0	0	0,0138	0,0000
40.	128,8	11	0	4056	1	0	0	0,0002	0,0000
41.	23,5	6,8	0	4440	132	1	0	0,0297	0,0002
42.	30	7	1	4254	56	0	0	0,0132	0,0000
43.	36,7	7,3	0	4952	205	0	0	0,0414	0,0000
44.	46,2	8	0	4034	0	0	0	0,0000	0,0000
45.	25,8	6,7	0	4479	156	0	0	0,0348	0,0000
46.	55,9	8,5	0	4394	3	0	0	0,0007	0,0000

47.	34	7,3	0	4920	191	11	0	0,0388	0,0022
48.	43,8	7,9	0	4460	24	0	1	0,0054	0,0000
49.	124,1	11,1	0	4264	229	0	96	0,0537	0,0000
50.	65,7	9	0	4148	23	0	0	0,0055	0,0000
51.	55,9	8,6	0	4576	23	0	0	0,0050	0,0000
52.	54,8	8	0	4334	504	12	1	0,1163	0,0028
53.	27,9	6,3	1	4696	1	0	0	0,0002	0,0000
54.	47,7	7,8	0	4510	1	0	1	0,0002	0,0000
55.	36,2	7,4	0	4097	99	0	24	0,0242	0,0000
56.	40,6	7,6	0	4368	227	0	3	0,0520	0,0000
57.	32,7	7,2	0	4216	197	0	5	0,0467	0,0000
58.	33,1	6,6	1	4430	528	98	94	0,1192	0,0221
59.	13,7	4,7	J	4492	5	0	0	0,0011	0,0000
60.*	24,3	6,2	0	5330	218	25	36	0,0409	0,0047
61.	39,1	7,8	0	4124	29	0	4	0,0070	0,0000
62.	54,1	7,8	0	4648	10	0	0	0,0022	0,0000
63.	28,9	6,3	1	4400	81	0	3	0,0184	0,0000
64.	19,6	6	0	5142	435	8	5	0,0846	0,0016
66.	37,9	6,8	0	5016	68	6	14	0,0136	0,0012
67.	14,4	5,1	J	4116	37	0	9	0,0090	0,0000
68.	29,6	7	1	4952	82	0	2	0,0166	0,0000
69.	24,5	6,3	0	4358	292	8	21	0,0670	0,0018
70.	19,8	5,8	0	4228	79	0	0	0,0187	0,0000
71.	29,6	6,6	0	4750	419	17	21	0,0882	0,0036
72.	24,5	6,5	0	4666	28	0	2	0,0060	0,0000
73.	34,9	7,8	0	4059	36	0	14	0,0089	0,0000
74.	32,3	7,2	0	4914	113	0	6	0,0230	0,0000
75.	25,4	6,5	0	4260	51	0	8	0,0120	0,0000
76.	23,4	6,4	0	4512	350	0	2	0,0776	0,0000
77.	17,5	5,5	0	4254	0	0	0	0,0000	0,0000

78.	20,9	5,8	0	4175	199	0	10	0,0477	0,0000
79.	23	6,1	0	4758	0	0	0	0,0000	0,0000
80.	19,6	6,2	0	5124	199	0	13	0,0388	0,0000
81.	22,4	6,1	0	4702	17	0	0	0,0036	0,0000
82.	22,7	6,3	0	4758	89	0	6	0,0187	0,0000
83.	10,8	4,9	J	4576	0	0	0	0,0000	0,0000
84.	24,8	6,5	0	4746	105	0	10	0,0221	0,0000
85.	21,8	6,2	0	4160	0	0	0	0,0000	0,0000
86.	26,7	7,2	0	4038	89	0	6	0,0220	0,0000
87.	31,8	6,9	1	5090	296	2	9	0,0582	0,0004

Laboratorní odběr									
Vzorek	m	SVL	Sex	Eryt	H.m	H.h	V	Int H.m	Int H.h
L 27 /07	24	4,2	J	4301	150	0	1	0,0349	0,0000
29.	13	3,2	J	5369	353	0	0	0,0657	0,0000
30.	15	3,5	J	4111	100	0	4	0,0243	0,0000
31.	16	3,6	J	4721	75	0	0	0,0159	0,0000