



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Morfologicko-genetická studie populací  
mořského plže *Hexaplex trunculus* ze  
Středozemního moře**

Vypracoval: **Bc. Jiří Macík**

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Oldřich Nedvěd, CSc.**

Specialisté: **RNDr. Lenka Barčiová, Ph.D.**

**Mgr. Lubomír Piálek**

**Magisterská diplomová práce**

České Budějovice 2011

Jiří Macík (2011): Morfologicko-genetická studie populací mořského plže *Hexaplex trunculus* ze Středozemního moře. [Morphologic-genetic study of populations of salt-water gastropod *Hexaplex trunculus* from Mediterranean sea.] Mgr. Thesis, in Czech. 87 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Genetická a tvarová variabilita jedinců mořského plže *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) byla porovnána mezi populacemi tří lokalit chorvatského pobřeží, čtyř lokalit řeckého ostrova Lefkáda a dvou lokalit jižního pobřeží Francie o celkovém počtu 464 exemplářů. Z genetického hlediska nebyla nalezena kritéria pro oddělení jednotlivých populací. V mitochondriálním genu pro cytochrom c oxidázu, podjednotku jedna, (COI) nebyla nalezena variabilita v úseku dlouhém 683 bp. Rozdílnost populací nebyla geneticky průkazná ani ve spojení mých dat s daty z již proběhnuvší portugalské studie (sekvence z GenBank). Populační odchylky byly nalezené metodou geometrické morfometrie. Podle výsledků byly stanoveny morfotypy pro určité biotopy. Během této studie byla prokázána vysoká míra znečištění Středozemního moře tributylcínem (TBT) způsobující u tohoto druhu plže pohlavní malformace zvané fenomén imposex.

## **Annotation**

Variability in genes and shell shape of salt water gastropod *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) was compared among the samples from three Croatian coastline localities, four localities on Greek island Lefkada and two localities from south France coastline in total number of 464 specimens. Genetical criteria were not found for separating individual populations. No variability were found in 683 bp long fragment of gene for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit one (COI). Differences among populations were not significant, even in connection of my data with the data of recent portuguese study (sequences from GenBank). Differences among populations were found by the geometric morphometric method. Based on these results, morphotypes for certain habitats were determined. During the study, high level of tributyltin (TBT) pollution in the Mediterranean sea causing sexual malformation called imposex phenomenon, was proved in this species of gastropod.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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 jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 13. 12. 2011

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli a vedoucímu práce doc. RNDr. Oldřichu Nedvědovi, CSc. za jeho profesionální přístup, odbornou pomoc, vedení a ochotu. Dále pak specialistům v oboru RNDr. Lence Barčiové Ph.D. a Mgr. Lubomíru Piálkovi za ochotu, užitečné rady, pomoc v laboratoři a trpělivost. Velký dík patří mé rodině, přítelkyni a nejbližším přátelům a kamarádům za pomoc v terénu (Řecko, Francie) a podporu při vypracování této studie. Dále děkuji Studentské grantové agentuře (SGA) za její finanční podporu, kterou mi umožnili vycestovat do Řecka pro sběr vzorků.

# Obsah

<b>1. Úvod do problematiky .....</b>	<b>1</b>
1.1. Obecné údaje o mořském plži <i>Hexaplex trunculus</i> .....	1
1.2. Fenomén „imposex“ .....	3
1.2.1. Vliv TBT na plže <i>Hexaplex trunculus</i> a jiné měkkýše .....	3
1.2.2. Dumptonův syndrom .....	9
1.2.3. TBT globálně .....	10
1.3. Geometrická morfometrie na schránkách měkkýšů .....	13
1.4. Morfotypy a jejich určení .....	16
1.5. Molekulárně biologické analýzy u měkkýšů .....	19
1.5.1. Fylogenetické studie .....	19
1.5.2. Fylogeografické studie .....	19
1.5.3. Studie čeledi Muricidae .....	20
1.5.4. Léky z měkkýšů .....	21
1.6. Cíle práce .....	23
<b>2. Materiál a metody .....</b>	<b>24</b>
2.1. Popis lokalit sběru .....	24
2.1.1. Chorvatsko .....	28
2.1.1.1. Zambratija .....	28
2.1.1.2. Sovlje .....	28
2.1.1.3. Sumartin .....	29
2.1.2. Řecko .....	30
2.1.2.1. Lefkáda .....	30
2.1.2.2. Nikiana .....	31
2.1.2.3. Meganisi .....	31
2.1.2.4. Vasiliki .....	31
2.1.3. Francie .....	32
2.1.3.1. La Ciotat .....	32
2.1.3.2. Six-Fours les Plages .....	33
2.2. Metody použité v terénním výzkumu a laboratoři .....	34
2.2.1. Sběr vzorků .....	34
2.2.2. Konzervace a čištění .....	34

2.2.3. Geometrická morfometrie .....	35
2.2.4. Molekulární analýza .....	37
2.2.4.1. Izolace DNA .....	37
2.2.4.2. PCR .....	37
2.2.4.3. Gelová elektroforéza .....	38
2.2.4.4. Sekvenace, alignment .....	39
2.2.5. Statistické zhodnocení .....	39
<b>3. Výsledky .....</b>	<b>41</b>
3.1. Geometricko-morfometrická analýza .....	41
3.2. Morfotypové určení .....	44
3.3. Vztah morfotypů k prostředí .....	53
3.4. Molekulární analýza populací .....	55
3.5. Úroveň postižení .....	57
<b>4. Diskuse .....</b>	<b>58</b>
4.1. Rozdíly mezi populacemi a morfotypové určení .....	58
4.2. Genetická variabilita <i>H. trunculus</i> .....	61
4.3. Znečištění Středozemního moře a dodržování legislativy .....	65
<b>5. Závěr .....</b>	<b>67</b>
<b>6. Použitá literatura .....</b>	<b>68</b>
<b>7. Přílohy .....</b>	<b>79</b>

# 1. Úvod do problematiky

## 1.1. Obecné údaje o mořském plži *Hexaplex trunculus*

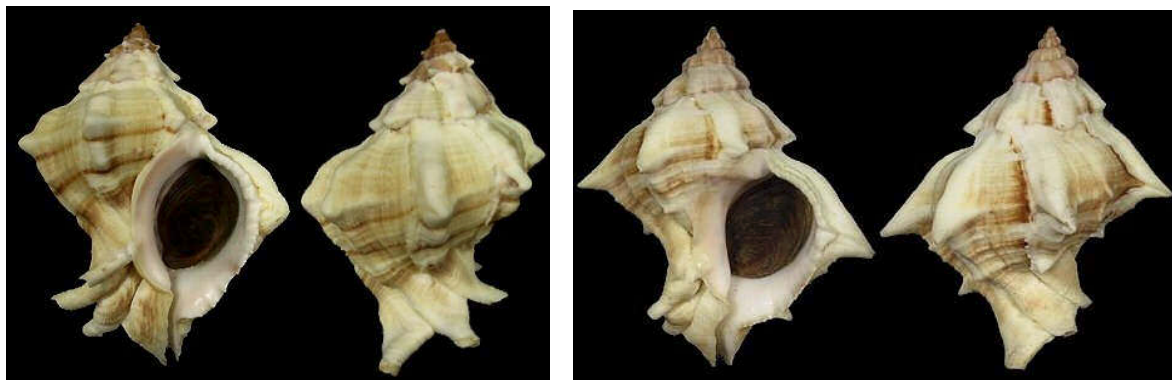
Ostranka *Hexaplex* (synonyma *Murex*, *Phyllonotus*, *Trunculariopsis*) *trunculus* (Linné, 1758) (anglický název „banded murex“) je mořský plž vyskytující se téměř striktně ve Středozezemním moři. Západní hranicí výskytu tohoto plže je jižní Portugalsko a východní Kanárské ostrovy (Poppe & Gotto, 1991). Nedávno však byla objevena stálá populace *H. trunculus* v O Grove v Galicii na severozápadním pobřeží Španělska (Rolán & Banon-Díaz, 2007). Tato nová populace vznikla pravděpodobně lidským přičiněním při rozšiřování chovu ústřic za účelem potravinářského obchodu (Quintas et al., 2005). Jde o jednoho z nejběžnějších muricidních plžů ve Středozezemním moři. Čeleď Muricidae (ostrankovití) je celosvětově rozšířena a má více než 2000 druhů a poddruhů (Poppe & Gotto, 1991).

Šesti až osmi let dožívající se ostranka (El Hamdani et al., 1998) dorůstá do osmi až devíti centimetrů, výjimečně až jedenácti centimetrů, což je pravděpodobně maximální velikost druhu (Poppe & Gotto, 1991). V dospělosti se růst ostranek zpomaluje, což bylo prokázáno u více druhů metodou „capture mark recapture“ (Spight et al., 1974 ex Vasconcelos et al., 2006,b). Základní abiotické faktory Středozezemního moře jako průměrná zimní teplota, průměrná letní teplota a průměrná salinita, tudíž prostředí, ve kterém *H. trunculus* žije, znázorňují obrázky (obr. 3.; 4.; 5.). *H. trunculus* žije jen pod úrovní odlivu v hloubkách od 1 do 100 m na skalnatém i bahnitém dně (Poppe & Gotto, 1991; Chiavarini et al., 2003), v klidnějších pobřežních vodách (mělké zátoky a laguny nebo hlubší místa bez vlivu vlnobití) (Rilov et al., 2004). Největší populační hustota je zaznamenávána v hloubkách mezi 0,3 – 30 metrů (Houart, 2001 ex González-Tizón et al., 2008). Jelikož plž má nižší rezistenci k vysušení, než žije v přílivové zóně. Často je nacházen zahrabaný do sedimentu (Rilov et al., 2004). Potravní preference jsou rozmanité, jedná se o omnivora, avšak převážného carnivora a saprofága (El Hamdani et al., 1998).

Plži řádu Neogastropoda jsou gonochoristé, s vnitřním oplozením. Samice jsou větší než samci a počet samic v populaci je vyšší než počet samců, což je běžné u všech gonochoristických měkkýšů (Fretter & Graham, 1994). Tvarová a barevnostní variabilita ulit je u tohoto druhu obrovská (příloha 1.–9.), což poukazuje na možnost existence kryptických

druhů. Tato variabilita je velice patrná i v rámci čeledi Muricidae. Tvary a barvy této čeledi jsou velmi různorodé. Pro porovnání je možné nahlédnout do obrazových encyklopedií od Abbotta & Dance (1986) a nebo novější publikace od Robina (2008). Barva měkkého těla je tmavě hnědá s šedým mramorováním (Gibbs, 1999; Vasconcelos et al., 2006). Plži postrádají vnější rozlišovací znak pro pohlaví (Vasconcelos et al., 2006). Podle geometricko-morfometrické analýzy se rozdíly našly, ale pouze tak malé, že nejsou použitelným kritériem (Macík, 2009). Normálním jevem u muricidních druhů je zvětšování penisu v reprodukčním období (u druhů ze středomoří v létě) a zmenšování v období klidu (srpen až říjen) (Ramón & Amor, 2002).

V dnešní době jsou ostranky *H. trunculus* součástí potravinářského průmyslu. V období starověku se také používaly jako zdroj purpurového barviva společně s *Bolinus brandaris* (Linné, 1758), *Thais haemastoma* (Linné, 1758); barvivo se vyvažovalo zlatem (Poppe & Gotto, 1991). Jediným dalším zástupcem rodu *Hexaplex* ve Středoziemním moři (jižní pobřeží Turecka) je *Hexaplex pecchiolianus* (d'Ancona, 1871) dorůstající šesti až devíti centimetrů (obr. 1., 2.).



**Obr. 1., 2.:** *Hexaplex pecchiolianus* z Levantského moře ([http://www.gastropods.com/9/Shell\\_11069.shtml](http://www.gastropods.com/9/Shell_11069.shtml)).



## 1.2. Fenomén „imposex“

### 1.2.1. Vliv TBT na plže *Hexaplex trunculus* a jiné měkkýše

Znečišťováním životního prostředí trpí živočichové po celém světě, ať už se jedná o bezobratlé nebo obratlovce. Nejinak je tomu v případě mořského plže *Hexaplex trunculus*. Na samice této ostranky neblaze působí znečištění moře tributylcínem (TBT) (Gibbs et al., 1987), který u nich způsobuje růstovou vadu na genitáliích, maskulinizaci. Hlavním zdrojem TBT ve vodě jsou antikoroziční nátěrové hmoty (Gibbs & Bryan, 1986).

O těchto maskulinizacích se ve vědeckém světě ví už čtyřicet let. Tento fenomén změny pohlaví ze samice na samce byl nazván „imposex“ (Smith, 1971). Dalším použitelným termínem pro tuto změnu samice v samce je „pseudohermafroditismus“ (Jenner, 1979). Slovo imposex bylo vytvořeno jako zkratka pro „superimposition of males genital organs onto females“ a poprvé bylo použito ve studii *Nassarius obsoletus* (Say, 1822) na Long Island v USA (Smith, 1971).

*H. trunculus* byl poprvé podroben studii, zda se u něj vyskytuje maskulinizace samic (imposex), v roce 1988 ve Francii (Martoja & Bouquegneau, 1988). Posléze následovaly studie v jiných státech Evropy, a to na Maltě (Axiak et al., 1995), ve Španělsku (El Hamdani et al., 1998), v Itálii (Terlizzi et al., 1999; Chiavarini et al., 2003; Garaventa et al., 2006), v Izraeli (Rilov et al., 2000), na Istrii (Garaventa et al., 2006), na celkovém pobřeží Chorvatska (Prime et al., 2006) a v Portugalsku (Vasconcelos et al., 2006). Imposex, tedy maskulinizace samic, byl prokázán i u jiných středomořských ostranek. Studie byly provedené na *Bolinus brandaris* (Ramón & Amor, 2001; 2002), *Nucella lapillus* a *Ocenebra erinaceus* (Linné, 1758) (Stroben et al., 1996). Imposex postihuje i druhy jiných čeledí mořských plžů, nejen ty z čeledi Muricidae, ale i z čeledi Nassariidae – *Ilyanassa obsoleta* (*Nassarius obsoletus*) (Say, 1822) (Bryan et al., 1989), *Nassarius reticulatus* (Linné, 1758), *Nassarius incrassatus* (Ström, 1768) a Trividae – *Trivia arctica* (Montague, 1803) (Stroben et al., 1996).

Jak již bylo řečeno, imposex je způsobován tributylcínem (TBT) a jeho deriváty (Gibbs & Bryan, 1987). Tato látka byla odhalena poté, co bylo zjištěno, že fenomén imposex nekoreluje s arsenem, kadmiem, mědí, olovem, stříbrem ani zinkem, ale je v pozitivní korelaci s cínem (Bryan & Gibbs, 1986). Deriváty TBT jsou DBT (dibutylcín) a MBT (monobutylcín), které se

také v tělech živočichů ukládají, ale ne v takové míře (Axiak et al., 1995). Další zjištěnou látkou způsobující imposex je TPT (trifenylcín) a z ní odvozené DPT (difenylcín) a MPT (monofenylcín). Z TBT je možné odvodit třináct derivátů a z TPT sedm (Horiguchi et al., 1994).

Citlivost k jednotlivým látkám obsahujícím cín je různá podle druhu a i citlivost k určitým koncentracím je různá. Na druhy *Thais clavigera* (Küster, 1860) a *Thais brouni* (Dunker) (Muricidae) z indopacifické oblasti působí negativněji TPT, protože jej obtížněji metabolizují (Horiguchi, et al. 1994). *N. lapillus* je citlivější k tributylchloridu než k TBT (Gibbs, 1988), ale kritická koncentrace TBT způsobující imposex u tohoto druhu je 1 ng Sn/l mořské vody (Gibbs & Bryan, 1987). *H. trunculus* je citlivější než předchozí druh, protože koncentrace způsobující imposex je u něj 0,1 ng Sn/l mořské vody (Gibbs, 1999). Koncentrace nutná pro vznik imposexu u *N. lapillus* byla zjištěna tak, že nepostížení jedinci byli v laboratorních podmínkách koncentrací 1 ng Sn/l vystaveni (Gibbs & Bryan, 1987). Úroveň imposexu koreluje s množstvím TBT v mořské vodě. Čím vyšší je koncentrace TBT, tím vyšší je úroveň imposexu (Bryan & Gibbs, 1986). Hraniční fází imposexu je samičí sterilita, která je způsobována vysokou koncentrací TBT ve vodě. U citlivějších druhů (bioindikátorů) snižuje reprodukční schopnost, ale u méně citlivých druhů nedochází k tak drastickým somatickým změnám (Bryan et al., 1986). Při koncentraci 2 ng Sn/l mořské vody nastává sterilita u druhu *N. lapillus*. Potlačení oogeneze nastává při koncentraci 3–5 ng Sn/l mořské vody. Následně u bývalých samic startuje spermatogeneze (Gibbs, 1988). Stejná koncentrace TBT v mořské vodě způsobující sterilitu byla zjištěna i u plže *Ilyanassa obsoleta* (Nassariidae) v USA (Bryan et al., 1989). V oblastech s vysokou koncentrací TBT v mořské vodě dochází u samic druhu *H. trunculus* k vyšší akumulaci této látky v těle než u samců (Axiak et al., 1995).

Ve vodách se TBT nejvíce vyskytuje v přístavech, docích (Gibbs & Bryan, 1986), na lodních trasách (Ten Hallers et al., 1994) ale i na rybích farmách (Gibbs et al., 1987). Z toho vyplývá, že zamoření mořské vody TBT se týká pouze oblastí s antropogenními vlivy. Koncentrace TBT na otevřeném oceánu jsou neměřitelné. Ke snižování hodnot koncentrace TBT ve vodě dochází již několik kilometrů od nejbližšího lidského vlivu (Evans et al., 1995). V přístavech je často koncentrace 2 ng Sn/l mořské vody a více, přičemž mluvíme o masivním zamoření (Gibbs, 1993). Jak již bylo řečeno, vyšší koncentrace TBT byly zjištěny i na lodních trasách a to při studiu imposexu na *Buccinum undatum* (Linné, 1758) (Buccinidae). Tento druh žije na plochem a bahnitém dně na otevřeném moři, tudíž mimo přístavy (Ten Hallers et al., 1994).

Před dvaceti lety druh *B. undatum* nevykazoval žádné známky imposexu, ale se vzrůstající lodní dopravou se u něj fenomén imposex objevil (Ten Hallers et al., 1994). Další důkaz imposexu mimo přístavní oblasti byl objeven v Severním moři na druhu *N. lapillus* (Evans et al., 1996). Hlavním uložištěm TBT v mořích jsou sedimenty a teprve poté otevřená voda (El Hamdani et al., 1998). Vysoké koncentrace TBT v sedimentech byly prokázány v Hong Kongu (až 53000 ng Sn/g sedimentu) (Ko et al., 1995), Japonsku a Indii (Ten Hallers et al., 1994). Nejvíce se v sedimentech ukládá TBT, poté DBT, a dále MPT (Ko et al., 1995). V Tunisu bylo během biomonitoringu zjištěno stoprocentní postižení samic malformacemi v loďmi vysoce frekventovaných oblastech (El-Menif et al., 2007). Koncentrace TBT ve tkáni *H. trunculus* se shoduje s koncentrací TBT v sedimentech (Axiak et al., 1995). Možnost vzniku imposexu jinými polutanty není vyloučena (Matthiessen & Gibbs, 1998), ale bylo zjištěno, že jiné těžké kovy (As, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn) fenomén imposex nezpůsobují (María-Cervantes et al., 2009).

Středomořská ostranka *H. trunculus* byla poprvé použita jako bioindikátor znečištění moře tributylcínem v devadesátých letech minulého století na Maltě (Axiak et al., 1995). Díky této studii a zjištění extrémní citlivosti této ostranky na TBT byl tento druh stanoven jako bioindikátor znečištění Středozemního moře tributylcínem (Axiak et al., 1995; Chiavarini et al., 2003). Následný biomonitoring na Maltě prokázal zvýšení koncentrace TBT v mořské vodě (1,6–12,3  $\mu\text{g Sn g}^{-1}$ ) oproti prvním měřením, což poukazuje na nedodržování legislativy EU (Axiak et al., 2003). Tento negativní trend byl prokázán i při biomonitoringu v Portugalsku (Santos et al., 2002). První biomonitoring znečištění vod okolo pobřeží Tunisu za využití ostranky *H. trunculus* byl proveden teprve v roce 2007 (El-Menif et al., 2007). Ve vodách Španělska se také jako bioindikátor znečištění moře TBT používá *Thais haemastoma* (Linné, 1758) (El Hamdani et al., 1998). Při testech, který z těchto dvou druhů je lepším bioindikátorem se zjistilo, že je jím *H. trunculus*, protože imposex se u něj začal projevovat při nižších koncentracích (El Hamdani et al., 1998). Od té doby se jako bioindikátor používá jen *H. trunculus* (Terlizzi et al., 1999; Ramón & Amor, 2001). Podobné porovnání bylo provedeno mezi druhy *H. trunculus* a *B. brandaris* v Tunisu. Výsledky studie prokázaly vyšší citlivost *H. trunculus* k TBT a to podle všech indexů založených na rozvoji chámovodu (Abidli et al., 2009). Zároveň byl *H. trunculus* navržen jako bioindikátor těžkých kovů v mořské vodě, protože na něj též působí a ukládají se v jeho těle (María-Cervantes et al., 2009). Jiné příklady bioindikátorů na znečištění moře TBT jsou v oblasti Britských ostrovů a přilehlém Atlantickém oceánu *N. lapillus* (Gibbs, 1993), u Thajska *Thais distinguenda*

(Röding, 1798) (Bech, 1999) a u Singapuru *Thais jubilaea* (Tan & Sigurdsson, 1990) (Tan, 1997). Podle Barroso & Moreira (2002) by každý biomonitoring měl být prováděn za pomoci dvou bioindikátorů znečištění TBT, jelikož zkoumané oblasti na celém svém území nevykazují stejné abiotické a biotické podmínky, z čehož vyplývá, že druh na tomto území nemusí mít zcela spojitý areál rozšíření. Druhý druh by mělo být možné nalézt tam, kde se první druh nevyskytuje. Tudíž tento druh by měl využívat niku nevyužívanou druhem prvním.

U druhu *N. lapillus* byla prokázána vyšší mortalita dospělých jedinců postižených imposexem, tedy samic. Docházelo u nich kablokování vejcovodu a následnou akumulací vajec došlo k protržení stěny vejcovodu. Dále bylo prokázáno, že sterilita maskulinizovaných samic nebyla způsobena růstem penisu, ale růstem nově se zakládajícího chámovodu z paliálního epitelu (Gibbs & Bryan, 1986). Extrémní fází maskulinizace je tvorba varlat a start spermatogeneze (Gibbs & Bryan, 1986; Gibbs et al., 1988). Podrobné popisy pohlavních ústrojí jednotlivých kategorií pohlaví (samec, samice, maskulinizovaná samice) jsou uvedeny ve studii Axiak et al., 1995.

Samčí kopulační orgán a tedy i ten nově rostoucí u samic postižených imposexem se nachází vždy za pravým tykadlem (Gibbs & Bryan, 1986) a je esovitě prohnutý se stejným zbarvením, jako je svalnatá noha plže. Imposex postižené samice však mají penis menší a světlejší než samci (Gibbs, 1999). Velikost penisu u samců roste s věkem (Ramón & Amor, 2002), tudíž zde existuje pozitivní korelace mezi délkou ulity a délkou penisu, což u samic s maskulinizací neplatí (Gibbs et al., 1987). Během narkózy hexahydrátem chloridu hořečnatého používaného k relaxaci svalů studovaných jedinců dochází k prodloužení penisu jak u samců, tak u maskulinizovaných samic, což ale nebrání správnému určení pohlaví. Sezónní kolísání velikosti penisu u *H. trunculus* se projevuje jen malou chybou v měření (Vasconcelos et al., 2006). U postižených samic k tomuto kolísání nedochází (Stroben et al., 1996). Velikost penisu u samic postižených imposexem nekoreluje s věkem nýbrž s koncentrací tributylcínů v mořské vodě (Gibbs, 1999). Navíc bylo zjištěno, že koncentrace TBT v mořské vodě je v pozitivní korelaci s indexem VDSI, který udává míru postižení imposex na základě rozvinutí chámovodu (Pellizzato et al., 2004). Tvar, barva a velikost samčího kopulačního orgánu je variabilní mezi druhy v rámci skupiny Neogastropoda (Gibbs, 1999).

Fenomén imposex nastává u plžů po endokrinním zhroucení (Matthiessen & Gibbs, 1997). Testosteron, který se akumuluje a u samic způsobuje maskulinizaci (Matthiessen & Gibbs,

1997), je produkován kvůli inhibici cytochrom P-450 dependentní aromatázy (Gibbs, 1993). Identické pochody byly prokázány i u druhů *Ocenebra erinacea* a *Buccinum undatum* (Matthiessen & Gibbs, 1997). Existují dvě hypotézy způsobu akumulace testosteronu ve tkáních (Nishikawa, 2006). První hypotéza praví, že tributylcín snižuje hladinu enzymů ve tkáni, které metabolizují testosteron (Nishikawa, 2006). Druhá hypotéza staví TBT do role toxinu poškozující nervovou tkáň. Začne docházet k abnormálnímu uvolňování peptidického hormonu s názvem “penis morphogenic factor“ (PMF) (Féral & Le Gall, 1983). PMF sice způsobuje vývoj samčích pohlavních znaků následně po externím podnětu jako je vystavení TBT, ale PMF nemůže být primárním faktorem v dosažení imposex symptomů TBT. Musí existovat něco dalšího, co je faktorem, který se přímo ovlivňuje s TBT v počátečním kroku vzniku imposex postižení (Oberdörster & McClellan-Green, 2000; 2002). Hlubší studií endokrinního zhroucení bylo zjištěno, že trifenylicín a tributylcín mají blízký vztah k lidskému ligandu “retinoid X receptor“ RXR (Kanayama et al., 2005). Navázání RXR k 9-cis kyselině retinové bylo experimentálně potvrzeno. To znamená, že imposex je způsoben RXR. Ve studii bylo toto tvrzení podloženo pozorováním 9-cis kyseliny retinové, která navodila maskulinizaci samic stejně jako TPT (Nishikawa et al. 2004). U plžů existuje funkční homolog k RXR. Odhalení důležitosti RXR při rozvoji fenoménu imposex bylo zjištěno na muricidních plžích rodu *Thais* (Nishikawa, 2006).

Samice většího věku jsou častěji postižené imposexem, protože mají více času na vývin deformací. Všechny kategorie pohlaví byly větší v oblastech s výskytem TBT ve vodě. To může znamenat pokles počtu jedinců v populaci a zvětšení somatického růstu („trade off“ – vkládají více energie do růstu než do rozmnožování) (Axiak et al., 1995).

Úroveň postižení jedince imposexem se určuje několika způsoby. RPSI (relative penis size index) a RPLI (relative penis length index) jsou vyjádřeny v procentech (Gibbs et al., 1987). Rozdělení do stupňů postižení je ve škále 1–5 a jednotlivé fyziologické stavy pro RPSI i pro RPLI jsou stejné (Gibbs et al., 1987). Jedinci v rozmezí stupňů 3–5 jsou sterilní (Gibbs et al., 1987). Anuální kolísání velikosti je pro RPSI a RPLI zanedbatelné (Ramón & Amor, 2002). RPSI nebo RPLI metoda je však nepoužitelná pro druhy s vyšším počtem stádií imposexu bez penisu. Pro druh *H. trunculus* toto omezení neplatí (Stroben et al., 1996). Při porovnání těchto metod určení úrovně postižení bylo zjištěno, že RPLI vykazuje menší chybu, protože variabilita nekonstantní velikosti penisu je menší než u RPSI (není umocněna na třetí) (Stroben et al., 1996).

Dalším způsobem určení úrovně postižení (imposex) je VDSI (vas deferens sequence index) jehož úroveň se stanovuje vizuálně (Gibbs et al., 1991; Axiak et al., 1995), a ne výpočtem jako u předešlých dvou způsobů. Jednotlivé úrovně postižení jsou popsány ve studii Gibbs et al. (1991). Ve chvíli, kdy se jedná o stupeň postižení VDSI 0 a 1, musí být provedena pitva, protože u těchto postižených samic není vyvinut penis nebo je velmi malý. Na druhou stranu lze úroveň zjistit z již vytvořeného chámovodu (Gibbs, 1999). Při stupni 5 a 6 podle VDSI nastává sterilita (Gibbs, 1999). Úroveň 4 byla rozčleněna na další podsekce, kvůli přesnějšímu stanovení postižení, na 4,3 a 4,7 (Stroben et al., 1992).

V západofrancouzském zálivu Arcachon byl zjištěn vliv TBT na atlantský druh ústřice *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Alzieu, 1986). Tento vliv se projevoval jak u nedospělých stádií (veligerů), tak u dospělců. U larev i dospělců dochází k morfologickým změnám. Růstové vady veligerů, způsobující snížení jejich schopnosti přežití, byly pozorovány během jejich pelagického období života (Alzieu, 1986; 1991; Claisse & Alzieu, 1993). Projevy vlivu TBT u dospělých ústřic byly malformace lastur jak v kvalitě, tak tvaru (Alzieu, 1986; 1991). U ústřic z vod s vyšší koncentrací TBT byly provedeny kontroly kvality jejich lastur a bylo zjištěno, že se na příčném průřezu vyskytují komůrky vyplněné slizovou hmotou (Claisse & Alzieu, 1993), která byla poprvé u ústřic popsána v roce 1974 (Alzieu, 1986). V těchto komůrkách dochází k inhibici kalcifikačního proteinu konchyolinu a tudíž má horší vaznost k aminokyselinám (kyselina asparagová, glycin a serin), které poskytují spojení s  $\text{Ca}^{2+}$ . Při koncentraci pod 2 ng Sn/l dochází k této snížené schopnosti kalcifikace (Alzieu, 1991). Zvyšující se koncentrace TBT ve vodě má horší dopad na populaci (Alzieu, 1986), na růst a reprodukci jedinců. Kritickou koncentrací TBT způsobující růstové anomálie na larvách je 5 ng Sn/l mořské vody (Alzieu, 1986). Zvýšení mortality veligerů v prvních dnech vývoje způsobuje koncentrace 20 ng Sn/l mořské vody (Alzieu, 1991).

Fenomén imposex byl dlouhou dobu považován za nevratnou morfologickou změnu u postižených jedinců, avšak později byla tato domněnka vyvrácena nalezením genetické mutace známé jako Dumptonův syndrom (Gibbs, 2005). Schopnost reprodukce a s tím související populační dynamika druhu *H. trunculus* je negativně ovlivňována tributylcínem (Axiak et al., 1995). V dnešní době je v katalogu druhů postihující imposex více jak sto dvacet druhů plžů ze skupiny Neogastropoda a stále se tento seznam zvětšuje (Stroben et al., 1996).

### 1.2.2. Dumptonův syndrom

Jde o další problém v určování pohlaví vedle imposexu, ale zatím byl pozorován pouze u ostranky *Nucella lapillus* (Gibbs, 1993). U druhu *H. trunculus* nebyl dosud pozorován (Terlizzi et al., 1999). Byl pojmenován podle jména zálivu, kde byl poprvé pozorován (Gibbs et al., 1991). Byl také pozorován při výzkumu při severním břehu ústí řeky Temže (Gibbs, 1993). Dumptonův syndrom byl pokaždé zjištěn v místech, kde byla vysoká koncentrace TBT ve vodě, a to pouze v ostrůvkovitých populacích (Gibbs, 1993).

Dumptonův syndrom je vzácná genetická mutace (Gibbs, 2005), která způsobuje demaskulinizaci samců a samic postižených imposexem (Gibbs, 1993), jde o inhibitor imposexu (Gibbs, 2005). Samci postižení Dumptonovým syndromem už nikdy nebudou schopni reprodukce, zatímco pro samice je to pozitivní, neboť jim poskytuje imunitu proti imposexu (Gibbs, 1993). Tato mutace způsobuje inhibici testosteronu (Gibbs, 1993), ale mechanismus je zatím neznámý (Gibbs, 2005). Ve chvíli, kdy je imposex maximálně rozvinut, což znamená úroveň VDSI = 5 a 6, je demaskulinizace ireverzibilní, ale u nižších úrovní VDSI reverzibilní je (Gibbs, 2005). Za oba dva tyto jevy způsobující problémy v určování pohlaví není zodpovědná zvýšenou úrovní predace či parazitace (Gibbs, 1993). Fenomén imposex je způsoben abiotickým vlivem (znečištění mořské vody tributylcínem nebo trifenylcínem) a Dumptonův syndrom je způsoben genetickou mutací (Gibbs, 1993). Tato mutace je však pro populace ve vodách s vysokou koncentrací TBT či TPT výhodná. Umožňuje lepší přežití druhu (Gibbs, 1999). Dumptonův syndrom je způsobován recesivní alelou a projeví se tedy jen u recesivních homozygotů (Gibbs, 2005).

Inhibicí testosteronu je postižen celý samčí rozmnožovací aparát, proto dojde k samčí sterilitě (Gibbs, 1993; 2005). Dochází k nedokonalému růstu penisu a ten proto nedosahuje dostatečné velikosti potřebné pro kopulaci (minimální velikost u dospělých samců je 3,4 mm) (Gibbs, 2005). Dochází i ke špatnému vývinu testes a absenci poslední fáze spermatogeneze (Gibbs, 2005). Pohlavní ústrojí samců s Dumptonovým syndromem je podrobně popsáno ve studii Gibbse z roku 1993. Maskulinizací postižené samice s Dumptonovým syndromem jsou potentní, kromě úrovně VDSI = 5 a 6. Ty jsou pak sterilní. Samci jsou potentní pouze ve chvíli, kdy se u nich nevyskytuje Dumptonův syndrom (Gibbs, 2005). Když je při koncentraci 2 ng Sn/l mořské vody samec i samice s penisem, jedná se o normální populaci s imposexem

postiženými samicemi, ale když při této koncentraci penis samcům a samicím chybí, jedná se o populaci dumptonovu (Gibbs, 2005).

### 1.2.3. TBT globálně

Tributylcín (TBT) a trifenylcín (TPT) působí různým způsobem a různou měrou nejen na měkkýše, ale i ostatní zástupce živočišné říše. Deset let před tím, než byl fenomén imposex odhalen, tedy v roce 1960, se začaly používat antikoroziční nátěrové hmoty s obsahem TBT (Axiak et al., 1995). Francie byla prvním státem světa, která ustanovila zákaz na používání antikorozičních nátěrových hmot s obsahem TBT pro lodě menší než dvacet pět metrů. Stalo se tak následně po zjištění negativního vlivu TBT na životní prostředí. Zákaz byl vydán v roce 1982 (Terlizzi et al., 2001). Francie byla v tomto počínu následována v roce 1986 Spojenými státy americkými, v roce 1987 Velkou Británií, Kanadou a Novým Zélandem, v roce 1989 Japonskem, v roce 1990 Španělskem a v roce 1992 Hong Kongem (Horiguchi et al., 1994; Ko et al., 1995; Ramón & Amor, 2001). Mezinárodní námořní organizace (IMO) a Výbor námořní ochrany životního prostředí (MEPC) převzali tuto smlouvu pro celosvětový zákaz používání TBT, který vyšel v lednu roku 2003. Zákaz byl dále převzat do směrnice Evropské unie 1. července roku 2003 s regulačním (CE) číslem 782/2003 (Garaventa et al., 2006). Bylo odsouhlaseno pětileté období (od roku 2003 do roku 2008), kdy mělo dojít k odstranění starých antikorozičních nátěrových hmot s obsahem TBT a ty měli být nahrazeny netoxickými nátěrovými hmotami (Bech, 1999; 2002).

Jako jedním z míst pro kontrolu legislativy byl zvolen Arcachonský záliv v západní Francii. Koncentrace TBT v mořské vodě se zde po třiceti letech snížila na hranici 1 ng Sn/l (Ruiz et al., 1996). Nejkritičtějším obdobím na tomto území z hlediska koncentrace TBT v mořské vodě byl rok 1982, kdy zde byla naměřena koncentrace vyšší než 100 ng Sn/l mořské vody (Ruiz et al., 1996). Bioindikátorem byla pro tuto oblast stanovena ostranka *Ocenebra erinacea* (Linné, 1758) (Ruiz et al., 1996). I když byl zaveden zákaz na používání antikorozičních nátěrových hmot s obsahem TBT, bylo prokázáno, že v oblasti britských ostrovů došlo k úbytku počtu jedinců v populaci a dokonce i k vymizení některých populací druhu *N. lapillus* (Evans et al., 1996). Stejný úbytek jedinců v populaci i zánik celých populací byl prokázán v Portugalsku, kde v silně zamořených oblastech (přístavy) samice tohoto druhu vykazují stoprocentní postižení imposexem. Mezi léty 1997 až 2000 zde docházelo ke zvyšování koncentrace TBT. Došlo tedy k porušení legislativy EC directive



89/677/EEC, což je starší vyhláška pro zákaz užívání antikoročních nátěrových hmot s obsahem TBT pro lodě menší dvacet pět metrů (Barroso & Moreira, 2002). Objevuje se zde mezera v zákonech, protože právo zakazuje používání antikoročních nátěrových hmot s obsahem TBT, ale porušení tohoto zákazu se nepostihuje (Vasconcelos et al., 2006). Nedodržování legislativy bylo zjištěno i při biomonitoringu na Maltě (Axiak et al., 2003), v Itálii v Benátkách (Pellizzato et al., 2004) a v Portugalsku, kde byl vzrůstající trend koncentrace TBT ve vodě vyšší v malých přístavech než ve velkých (Santos et al., 2002). Například v Chorvatsku nebo Thajsku nebyl tento zákaz dlouhou dobu zaveden (Bech, 2002; Garaventa et al., 2006). Středomořské ostranky nečelí jen nebezpečí ze znečišťování moře cínem, ale i nadměrnému a nekontrolovatelnému odlovu pro potravinářské účely. Pro druhy *H. trunculus* a *B. brandaris* neexistují odchytové velikostní normy běžné pro jiné živočichy používané v potravinářství a díky tomu jsou metody lovu drastické ve smyslu dopadu na početnost populací. Na mnoha místech v Portugalsku díky těmto drancujícím metodám lovu dochází k velmi znatelnému úbytku jedinců v populaci (Vasconcelos et al., 2008). Jde také o dostupnost tohoto druhu. Například v Ria Formosa lagoon v Portugalsku jsou tyto ostranky velmi běžné v přílivové zóně, proto také dochází k nadměrnému sběru. Cena *H. trunculus* na rybím trhu se v Portugalsku pohybuje mezi 10 až 15 euro za kilogram živé váhy. Oblíbenost pokrmů, snadnost sběru a vysoká cena jsou faktory, které značně lákají prodejce, kteří místní populace druhu dosti drancují (Vasconcelos et al., 2006,b).

Na druhou stranu existují i státy a oblasti, kde k dodržování zákona dochází. Projevuje se to snížením koncentrace TBT v mořské vodě a tím i snížením úrovně imposexu či snížením počtu samic postižených malformacemi (Evans et al., 1995). U plžů byla tato pozitivní tvrzení prokázána v Japonsku (CEFIC, 1994 ex Evans et al., 1995), v jihozápadní Anglii (Cleary, 1991 ex Evans et al., 1995) a v jihovýchodní Anglii (Dowson et al., 1993 ex Evans et al., 1995). U mlžů se prokázalo snížení malformací lastur v Mexickém zálivu a to u místních ústřic (Wade et al., 1991 ex Evans et al., 1995). Během první studie imposexu na Tichomořském pobřeží Kostariky byla zjištěna o několik řádů nižší koncentrace TBT v mořské vodě než je běžná hodnota v Evropě a Severní Americe. Můžeme se však jen dohadovat o tom, zda se jedná o dodržování celosvětové legislativy na používání antikoročních nátěrových hmot s obsahem TBT pro lodě menší než 25 metrů a nebo jde o jeho nedodržování ve smyslu, že nemáme údaje o předešlých koncentracích a proto nevíme, jestli se tato koncentrace zvýšila či snížila (Gravel et al., 2006).

Francie jako první zavedla tento zákaz nejen pro ochranu životního prostředí francouzského pobřeží, ale také pro ochranu svých zisků v potravinářského průmyslu, protože tím zamezila úbytku výtěžnosti ústřic (Alzieu, 1991). Ke snížení koncentrace TBT ve vodách Arcachonského zálivu došlo okamžitě (Alzieu, 1986). Následně došlo ke zvýšení počtu jedinců ústřic na normál, což je průměrně mezi 10000 až 15000 tunami ročně. Množství ústřic před zavedením zákazu se pohybovalo mezi 6000 až 10000 tunami ročně, což je dvoutřetinová výtěžnost (Claisse & Alzieu, 1993). Mezi léty 1979 až 1991 došlo v Arcachonském zálivu ke kontrolám kvality vody s novým zjištěním. Lidé zabývající se v této oblasti ústřičným potravinářským průmyslem přešli zpět na používání antikoročních nátěrových hmot s obsahem mědi (Cu). Koncentrace Cu se ve vodách Arcachonského zálivu zvýšila na hodnoty před rokem 1960, kdy se používaly tyto barvy s měďnatými oxidy (Claisse & Alzieu, 1993). Mezi látky biotoxické patří mimo cínu i olovo, arsen, rtuť a měď (Terlizzi et al., 2001).

Vliv TBT byl pozorován i na obratlovcích. Byla prokázána vyšší mortalita delfínů *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), u kterých dochází vlivem tributylcínu k potlačení imunitního systému (Kannan et al., 1996). Ukládání TBT a jeho derivátů v jaterních, ledvinných a svalových tkáních bylo prokázáno u tuňáků *Thunnus thynnus* (Linné, 1758) a žraloků *Prionace glauca* (Linné, 1758) (Kannan et al., 1996).

### 1.3. Geometrická morfometrie na schránkách měkkýšů

Poměrně novou metodou, jak analyzovat informaci o tvaru, je geometrická morfometrie (Rohlf, 1993). Jedná se o soubor metod schopných zachytit informaci o geometrii studovaného tvaru a zachovat ji během statistické analýzy. Nedochozí tak ke ztrátám informace mezi proměnnými. Změny ve tvaru můžeme potvrdit nejen matematicky, ale i přesnou vizualizací (Rohlf, 1993). V přírodovědných oborech jde hlavně o geometrii biologických struktur. Užívaná data jsou často reprezentována formou kartézských souřadnic, které popisují určité body zvané „landmarks“. Souřadnice jsou užitečnější pro modelování tvaru (2D a 3D) než tradiční měření a navíc vzdálenosti lze ze souřadnic vypočítat (Rohlf, 1993). „Landmarks“ jsou body s biologickým významem, které můžeme přesně lokalizovat na jednom studovaném objektu a také nalézt homologické body pro ostatní studované objekty (Bookstein, 1991). Ve chvíli, kdy nelze landmarky na daném místě nalézt (např. u zubů, které mají opotřebenou sklovinu), musí se použít „pseudolandmarky“. Jsou to body lokalizované v koncích struktur, nebo se používají, když dochází k zakřivení obrysu struktury (Rohlf, 1993). Prokrustovská superpozice je v geometricko-morfometrických postupech používána k odstranění rozdílů v poloze, velikosti a orientaci studovaných objektů ze souboru dat (Rohlf, 1993). Tato technika funguje tak, že pomocí izometrické změny velikosti a posunem na sebe skládá objekty tak, aby součet druhých mocnin vzdáleností všech landmarků jednotlivých objektů od příslušných bodů konsenzuální konfigurace byl minimální (Bookstein, 1996).

Vizualizace tvarových změn se zakládá na metodě TPS (Thin plate spline), která porovnává dva studované subjekty. Jedná se o převrstvení objektu pravoúhlou souřadnicovou sítí, kterou tvarujeme tak dlouho, dokud umístění jeho bodů není shodné se studovaným objektem (Bookstein, 1996). Deformační energie vyjadřuje změny poloh landmarků. Je to energie potřebná k deformaci referenční konfigurace bodů umístěných na nekonečně velké a nekonečně tenké kovové desce tak, aby se dosáhlo žádoucího posunutí (Bookstein, 1996). Jedná-li se o naklánění a přetáčení desky, mluvíme o uniformní transformaci. Pro uniformní transformaci není třeba žádná deformační energie (Bookstein, 1996). Neuniformní změny v tvaru jsou vyjadřovány jako vektory matice deformační energie „partial warps“. Vlastní hodnoty „partial warp scores“ vyjadřují polohu objektu v tangenciálním prostoru (Bookstein, 1996). Tato data se dále používají ve statistických mnohorozměrných metodách jako jsou často používané PCA a DFA (Bookstein, 1996).

Geometrická morfometrie je matematická a vizualizační metoda používaná napříč širokým spektrem vědních oborů. Uplatňuje se například ve vývojové biologii (Stone, 1998), genetice, oborech týkajících se vlivu životního prostředí (Rohlf, 1993), antropologii (Gómez et al., 2007), systematice a paleontologii (Cardini A. & Elton S., 2007). Problém je ale s paleontologickými vzorky. Je jich často malý počet, jsou špatně dostupné, a statistické výpočty nejsou tolik přesné (Cardini A. & Elton S., 2007).

Metody geometrické morfometrie se používají i pro nalezení morfometrických kritérií na schránkách měkkýšů. Mají například usnadnit určení dvou velice podobných druhů. Morfometrické metody byly schváleny pro konchyliologii jako použitelné mnohorozměrné statistické techniky k popisování nových druhů organismů (Stone, 1998). V rámci čeledi Volutidae byl tento typ studie použit. Jednalo se o nalezení morfometrických kritérií k rozlišení druhů *Adelomelon ancilla* (Lightfoot, 1786) a *Odontocymbiola magellanica* (Gmelin, 1791) z jižního Chile (Urrea et al., 2007). *A. ancilla* a *O. magellanica* mají ekonomický význam pro chilské rybářství. Jedním z možných způsobů rozlišení těchto dvou druhů je porovnání radulární morfologie, což je pro rybáře nemožný úkol. Vnější charakteristické rysy jsou u těchto druhů velmi podobné, a proto jsou oba shrnuty pod národním jménem “piquilhue“. Díky tomu jsou v národních chilských rybářských statistikách registrovány pouze pod druhem *A. ancilla* (Urrea et al., 2007). Radulární morfologie a charakteristické rysy ulit těchto dvou druhů byly analyzovány pomocí geometricko-morfometrických metod. Výsledkem této studie bylo zjištění, že druhy lze rozlišit na základě celkového tvaru ulit a tělesné hmotnosti. Na ulitách byla zjištěna určující druhová morfometrická kritéria. *A. ancilla* disponuje vyšší spirální oblastí a menší plochou obústí. *O. magellanica* má celkově kulovitější tvar a je těžší (Urrea et al., 2007). Tradiční morfometrie ukázala, že rozdíly tvarů ulit jsou hlavně mezi délkou obústí ulit a spirální délkou, která je větší u *A. ancilla*. Externí nalezené rozdíly jsou dostačující k tomu, aby byly druhy rozlišitelné (Urrea et al., 2007).

Podobná studie byla provedena na třech druzích z čeledi Littorinidae na severním a severozápadním pobřeží Evropy. Jednalo se o velmi podobné druhy *Littorina saxatilis* (Olivi, 1792), *L. compressa* (Jeffreys, 1865) a *L. arcana*, u kterých se hledala determinační morfometrická kritéria (Hannaford & Ellis, 1978). Morfologie těchto tří druhů plžů je velmi podobná, a proto představovala velký problém pro jejich druhovou determinaci. Podobnost ve tvaru se možná vztahuje k jejich stejnému způsobu života. Žijí v přílivové zóně na kamenech v oblasti silného

příboje. Výsledné matice z geometricko-morfometrických analýz byly podrobeny výpočtu DFA (Discriminant factor analysis). Metoda DFA dokázala velmi spolehlivě (na 96 %) druhy od sebe rozlišit (Conde-Padin P. et al., 2007).

#### 1.4. Morfotypy a jejich určení

V rámci kmene měkkýši jsou morfotypy = ekotypy (morfologicky odlišní jedinci téhož druhu, přičemž tvarová variabilita je podmíněna abiotickými a biotickými faktory, nikoliv geneticky) určovány velmi často. Jedná se většinou o hledání důvodu, proč je morfologie tohoto druhu právě taková v daných podmínkách. Jedna z recentních studií (Holomuzki & Biggs, 2006) se zabývala fenotypickou variabilitou sladkovodního plže *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) z Nového Zélandu, který je invazním druhem v České republice. Jedná se o malého plže, který obývá jak stojaté, tak mírně tekoucí vody. Fenotypická variabilita byla studována na morfologii ulit tohoto druhu plže a porovnávaly se rozdíly mezi populacemi. Byly určeny dva morfotypy (hladký a trnitý), u kterých se zkoumal „trade off“, zda je výhodou či nevýhodou vlastnit na ulitě trny v tekoucích a ve stojatých vodách jako obranný mechanismus proti predaci. Z výsledků byl patrný rozdílný selekční tlak pro existenci jednoho z morfotypů v daném biotopu. V říčních biotopech převládal morfotyp hladký (70%) a v jezerních morfotyp trnitý (80%). Při pokusech v laboratoři bylo zjištěno, že trnitý vykazuje nižší rezistenci vůči odplavení proudem, což vysvětluje převahu hladkého morfotypu v tocích. Během testů obranné účinnosti trnů proti predaci bylo zjištěno, že hlavní predátor tohoto druhu plže, ryba hlavačka *Gobiomorphus cotidianus* (McDowall, 1975), preferuje morfotyp hladký jako svou potravu před trnitým. Tím by se však nevysvětlila převaha jezerního trnitého morfotypu (hlavačka žije v tekoucí vodě). Další myšlenkou bylo, že trny jsou podmíněny také abiotickým vlivem, kterým je vyšší teplota vody v jezerech (Holomuzki & Biggs, 2006).

Předešlá studie je však pouze morfologicky zaměřená. Existují i studie kombinující morfologii vybraného druhu a jeho genetickou variabilitu. Jedním z mnoha příkladů je práce zabývající se taxonomií a fylogenezí (genetická variabilita podle mt DNA) založenou na morfologii sladkovodní jehlinky *Brotia pagodula* (Gould, 1847) z Thajska. Tento druh je morfologicky i geneticky velmi variabilní. Ve studii byly stanoveny dva morfotypy (kónický a ulita s protaženou spirální částí). Podle sekvenace mitochondriálních genů pro COI a 16S bylo zjištěno pět haplotypů. Autoři se dohadovali, jak je možné, že je genetická variabilita tohoto druhu tak vysoká. Vysvětlovali si to tím, že se pravděpodobně nejedná o jediný druh, nebo že dochází k introgresi, ke které se více přiklání. Spekuluje o toku genů mezi haplotypy a zpětném křížení, což se mohlo stát díky tomu, že druhy dříve alopatrické blízce příbuzné začaly pronikat na území druhu sousedního. Nedošlo k dostatečně dlouhé izolaci, aby se nově

vznikající druhy nemohly mezi sebou, po zániku geografické bariéry, znovu křížit (Köhler & Deein, 2010).

V poslední době je v hledáčku vědců, zabývajících se morfotypy, druh mořského antarktického mlže *Nacella concinna* (Strebel, 1908) (Aranzamendi et al., 2010; Hoffman et al., 2010; González-Wevar et al., 2011). *N.concinna* je dominantní v počtu mezi bezobratlými v přílivové zóně i v hlubších vodách Antarktidy (González-Wevar et al., 2011). U tohoto mlže byly stanoveny dva morfotypy; nejprve však metodou klasické morfometrie bez hmatatelného popisu tvaru jednotlivých morfotypů. Teprve nedávno byly oba morfotypy podrobeny mnohem citlivější a sofistikovanější metodě pro výzkum tvarové variability, a to geometrické morfometrii. Morfotypy byly analyzovány pomocí EFA (Elliptic Fourier Analysis), která potvrdila již tedy známou věc, že se jedná o dva morfotypy (litorální a sublitorální), kde je tvar lastur podmíněn hloubkovým gradientem (Aranzamendi et al., 2010). Stejného výsledku se dobrala i studie Hoffman et al. (2010), kteří tento trend dobře popsali díky metodice sběru vzorků (4 hloubky – zóna příboje, 6, 15 a 25 metrů). Prokázali tak postupnou změnu tvaru lastur od zóny příboje po 25 metrů. Identického výsledku geometrické morfometrie se dobrali i González-Wevar et al. (2011). V následné genetické analýze (AFLP) prokázali homogenitu tohoto druhu. Jedná se tedy o vysokou fenotypickou variabilitu podmíněnou jiným než genetickým faktorem (Hoffman et al., 2010; González-Wevar et al., 2011). Nízká genetická (haplotypová a nukleotidová) variabilita byla zjištěna i pro mt COI (663 bp) na pobřeží o délce 800 kilometrů (González-Wevar et al., 2011). Dochází zde k protichůdnému efektu, protože tento druh disponuje pelagickou dobře dispergující larvou, což by mělo jeho genetickou variabilitu zvýšit (Hoffman et al., 2010). Sezónní migrace litorálního morfotypu, který se na zimní období stahuje do hlubších vod, tento problém nevyřeší. V tuto chvíli nemůže dojít k toku genů mezi morfotypy, protože se nejedná o reprodukční období (Walker, 1972 ex Aranzamendi et al., 2010). Snížení genetického fondu bylo vysvětleno drastickým úbytkem jedinců v populaci vlivem přechodu doby ledové a meziledové před 7500 až 22000 lety, což byl výsledek demografické části studie (González-Wevar et al., 2011).

Jedním z velkých příkladů určování forem (morfotypů) je druh *Liguus fasciatus* (Müller, 1774), stromový plž žijící v jižní části Floridy a přilehlých ostrovech Keys až po Kubu. Patří do čeledi Orthalicidae (Abbott, 1989) a čítá padesát devět tvarových a barevných forem specifických pro určité biotopy a lokality výskytu tohoto druhu. Tyto formy jsou mezi sebou volně křížitelné za vzniku nových hybridů. Nikdy však u tohoto druhu nebyla provedená

genetická analýza, která by prokázala, že se jedná o formy s rozdílnou genetickou informací nebo morfotypy se stejnou genetickou informací. V dobách, kdy byly tyto formy určovány, nebyla známá molekulární biologie. Barvy některých forem se mění během ontogeneze. Jedním zdůvodněním je pravděpodobná inhibice barviv vlivem zvýšené produkce pohlavních hormonů při dospívání (Torre, 1938 ex Close, 2000). Nikdo však neví zda jde o správné tvrzení (Close, 2000). Tvary se mění ve smyslu poměru délky ku šířce ulity. Ostrovní formy jsou užší a protáhlejší než pevninské. Tvarové změny jsou dále patrné v oblasti obústí ulity, přesněji ve tvaru columelly. Tyto tvarové odlišnosti columelly mezi formami jsou dobře znatelné u forem *Liguus fasciatus f. crassus* (Simpson, 1920), *L. f. f. marmoratus* (Pilsbry, 1912), *L. f. f. septentrionalis* (Pilsbry, 1912), *L. f. f. solidus* (Say, 1825), *L. f. f. subcrenatus* (Pilsbry, 1912) a dalších. Columellární tvarové změny mohou být jak genetického, tak environmentálního původu. Nejde však o hlavní rozlišovací znak pro formy druhu *L. fasciatus* (Pilsbry, 1946 ex Close, 2000). U ostrovních forem se často vyskytuje hrbolek či návalek v oblasti obústí, což je další určující znak (Close, 2000). Tato oblast je pro determinaci druhů plžů nejvýhodnější a proto jsem si ji vybral také společně s náhledem na celou ulitu pro rozlišení populací *H. trunculus*. Tvarová a barevnostní variabilita druhu *L. fasciatus* je zobrazena v publikacích Parkinson et al. (1987), Abbott (1989) a Close (2000).



## 1.5. Molekulárně biologické analýzy u měkkýšů

### 1.5.1. *Fylogenetické studie*

Poslední dobou se stále častěji setkáváme s kompletními molekulárně fylogenetickými analýzami vyšších taxonomických celků. Příkladem je fylogenetická analýza čeledi Strombidae – křídlatcovití (Mesogastropoda) (Latiolais et al., 2006). Tato čeleď vykazuje vysokou míru morfologické variability druhů a i dosavadní fylogenetický strom této čeledi byl na těchto morfologických znacích stavěn. Molekulárně genetická analýza se opírala o sekvenaci jaderného histonu H3 a mitochondriální cytochrom c oxidázy podjednotky jedna (COI). Ve výsledcích autoři porovnávali hlavně dvě velké rodové větve, a to rody *Strombus* a *Lambis*. Rod *Strombus* pro oblasti východní Pacifik a západní Atlantik vycházel monofyleticky, zatímco druhy z Indo-západopacifické oblasti parafyleticky. Rod *Lambis* byl celý monofyletický. Pro morfologickou analýzu (geometrická morfometrie) zkoumaných druhů autoři použili metodu EFA (elliptical fourier analysis) (Latiolais et al., 2006).

Molekulárně genetický přístup se často používá pro revizi taxonomie určitého rodu; řeší se, zda opravdu druhy v něm zahrnuté jsou vlastními druhy nebo se jedná o méně druhů s vyšší morfologickou variabilitou. Pro tento účel je často využívána metoda DNA barcoding. Jedná se o taxonomickou metodu využívající krátký genetický marker v DNA organismu jako identifikátor určitého druhu. Využívá se například u neznámého vzorku DNA pro jeho druhovou identifikaci (Kress et al., 2005) nebo k určování nových druhů (Koch, 2010). Pro DNA barcoding u zvířat je doporučeno používat mitochondriální gen pro cytochrom c oxidázu podjednotku jedna (COI) (Hebert et al., 2003). Příkladem takto založených studií je revize rodu *Meretrix* (Veneridae – Bivalvia) v Číně, kdy byla COI použita. Na základě analýzy bylo zjištěno, že by z původních patnácti druhů mělo být několik druhů zrušeno pro jejich stejnou COI sekvenci (pouze synonyma) (Chen et al., 2009).

### 1.5.2. *Fylogeografické studie*

Dalším typem studie je analýza genetické diverzity populací v rámci jednoho či dvou druhů měřená přes nukleotidovou nebo haplotypovou variabilitu. Příkladem může být studie ohroženého druhu středomořského mlže *Pinna nobilis* – Kyjovka šupinatá (Linné, 1758), která v rámci populací vykazovala vysokou nukleotidovou i haplotypovou variabilitu COI.

Tento výsledek autoři vysvětlovali existencí pelagické vysoce disperzibilní larvy, která zvyšuje míru genového toku mezi populacemi (Katsares et al., 2008). Stejný závěr měla i studie na Indo-Pacifickém druhu homolice *Conus ebraeus* (Linné, 1758) (Duda et al., 2009).

Genetická studie na populacích plže *Patella rustica* (Linné, 1758) (Patellidae – Archaeogastropoda) prokázala nízkou genetickou vnitropopulační variabilitu pro COI na dvou od sebe vzdálených lokalitách (mezera tímto druhem neobydlená činí 300 kilometrů) i přes existenci dlouho žijící vysoce disperzibilní larvy. Příčinou tohoto jevu je podle autorů krátká doba existence nově vzniklé populace, tudíž krátký čas na vnik mutací v COI (Ribeiro et al., 2010). Pro živočichy s nízkou disperzní schopností (přímý vývoj – absence pelagické larvy, neschopnost plavat) všeobecně platí, že COI vykazuje nízkou genetickou vnitropopulační variabilitu (Samadi et al., 2006; Iguchi et al., 2007).

### 1.5.3. Studie čeledi Muricidae

Díky vědeckému zájmu, využití v potravinářství a využitím v kontrole dodržování legislativy ochrany moří před znečišťováním se stala čeleď Muricidae značně probádanou skupinou mořských bezobratlých živočichů. Tato čeleď byla dříve taxonomicky rozšiřována pouze na základě morfologických studií. Vycházely hlavně z morfologie ulity a raduly.

První velkou fylogenetickou studií je práce od Barco et al. (2010), která se zaměřuje na devět hlavních podčeledí. Jako genetické markery byly stanoveny tři mitochondriální (12S, 16S a COI) a jeden jaderný marker (28S). Pro cytochrom oxidázu podjednotku jedna byly použity univerzální primery pro tento gen, a to LCO1490 a HCO2198 (Folmer et al., 1994). Z analýzy vyšlo šest podčeledí jako monofyletických a tři polyfyletické (Muricinae, Trophoninae, Muricopsinae) (Barco et al., 2010).

Další recentní studií v rámci čeledi Muricidae byla biogeografická analýza druhu *Concholepas concholepas* (Bruguiera, 1789) na západním pobřeží Jižní Ameriky. Na pobřeží o délce 4200 kilometrů byla nalezena vysoká haplotypová variabilita (179 haplotypů) pro mitochondriální COI (658 bp) (Cárdenas et al. 2009). Využity byly opět univerzální primery pro COI (Folmer et al., 1994). Díky vysoké genetické variabilitě spojené s vysokou morfologickou variabilitou se autoři domnívají, že se mezi haplotypy můžou vyskytovat kryptické druhy. Tato vysoká genetická variabilita byla autory vysvětlována

biogeografickými bariérami, abiotickými vlivy na populace (mořské proudy, ENSO, „upwellingy“ a další) a historickým vývojem oblasti (doby ledové a meziledové). Navíc zde existuje tři měsíce přežívající dobře dispergující pelagická larva zvyšující genetickou variabilitu díky genovému toku (Cárdenas et al. 2009).

Ostranka *H. trunculus* nebyla podrobena jen studiím taxonomickým, environmentálním a morfologickým, ale v roce 2008 vyšla první práce genetického zaměření (González-Tizón et al., 2008). Jednalo se o studii genetické variability populací *H. trunculus* z jižního Portugalska a jižního Španělska ze zátoky Ria Formosa lagoon. Analýza byla provedena za pomoci tří mitochondriálních genů (12S, 16S a COI) a jednoho jaderného markeru (5S) (González-Tizón et al., 2008). Pro COI byly opět použity univerzální primery (Folmer et al., 1994). Genetická variabilita mezi populacemi byla měřena přes nukleotidovou diverzitu (průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi dvěma populacemi), která byla nesignifikantní pro COI ( $\pi = 0-0,004$ ) na úrovni 658 bp. Nukleotidová diverzita pro zbylé geny byla také nesignifikantní. Genetický materiál byl následně analyzován pomocí RFLP, která odhalila odlišnost jedné lokality ze tří (González-Tizón et al., 2008). Polymorfismus délky restričních fragmentů neboli RFLP (Restriction fragment length polymorphism) je analýza často využívaná k nalezení genetických rozdílů mezi jedinci stejného druhu a často v jedné populaci. Rozštěpením genomové DNA pomocí enzymů (restričních endonukleáz) zjistíme rozdíly v délkách takto vzniklých fragmentů u různých jedinců. Rozdíly jsou dány sekvencí nukleotidů v restričním místě (Šmarda et al., 2005). Nízkou genetickou variabilitu si autoři vysvětlují nedostatečnou vzdáleností vybraných lokalit sběru vzorků a tím, že tento druh plže nedisponuje pelagickou larvou a proto nedochází k toku genů mezi populacemi, který by genetickou variabilitu zvýšil (González-Tizón et al., 2008)

#### 1.5.4. Léky z měkkýšů

Trendem posledních let jsou studie využívající měkkýše jako zdroj nových medikamentů v oboru medicíny. Příkladem jsou nová analgetika nalezená v homoliciích (Conidae), která se využívají pro léčbu pacientů s HIV nebo rakovinou (Hannah et al., 2009). Tento nový zdroj pro farmakologii se stal tak úspěšným, že další studie na jiných příbuzných čeledích brzo následovaly. Například čeleď Terebridae (nadčeleď Conoidea) byla další zkoumanou skupinou (Puillandre et al., 2010). Tato farmakologicky využívaná analgetika jsou získávána

z jedů těchto zvířat, u homolic se jedná o conotoxiny a u „tereber“ o teretoxiny (Hannah et al., 2009; Puillandre et al., 2010).

## 1.6. Cíle práce

Pomocí geometrické morfometrie, molekulární analýzy a statistických výpočtů jsem porovnal 464 jedinců mořského plže *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) z celkově deseti lokalit (tři z chorvatského pobřeží, čtyř z řeckého ostrova Lefkáda, dvou z jižního pobřeží Francie a jedné z Ria Formosa lagoon z jižního pobřeží Portugalska). Cílem studie bylo:

- geometricko–morfometrickými postupy stanovit tvarové rozdíly ulit v populacích ostrova Lefkáda (Řecko), dvou lokalit z Francie a porovnat je se vzorky z chorvatského pobřeží analyzované v bakalářské práci;
- z výsledků geometricko-morfometrické analýzy stanovit morfotypy pro jednotlivé biotopy;
- stanovit, jak se na tvarových rozdílech ulit plžů podílí dědičná složka; porovnat mezipopulační rozdíly v sekvencích DNA s výsledky z geometrické morfometrie;
- určit úroveň postižení (imposex) jedinců z Chorvatska, Řecka, Francie a porovnat je mezi sebou.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Popis lokalit sběru

Lokality sběru byly vybrány v dostupných vzdálenostech s přihlédnutím na finanční stránku věci a dále pak, aby vyhovovaly mým cílům práce. Místa sběru se nacházela ve Středozezemním moři a jeho úmořích, Jaderském moři a Jónském moři (obr. 6.).

Jednalo se o tři chorvatské lokality (Zambratija, Sovlje a Sumartin) (obr. 7.), čtyři z řeckého ostrova Lefkáda (Lefkáda, Nikiana, Meganisi a Vasiliki) (obr. 8.) a dvě z jižního pobřeží Francie (La Ciotat a Six-Fours les Plages) (obr. 9.). Jedinci z chorvatských lokalit byli studováni v mojí bakalářské práci (Macík, 2009) a výsledky byly přejaty i pro magisterskou práci. Místa sběru v Chorvatsku byla záměrně vybrána tak, aby byla od sebe dostatečně vzdálena, jelikož šlo o prokázání rozdílnosti populací z těchto lokalit. Lefkáda v původním návrhu figurovala jako jedna lokalita, ale posléze byla rozdělena na čtyři, protože místa sběru se od sebe značně biotopově lišila. Vzdálenosti mezi jednotlivými místy sběru nepřesahovaly dvacet kilometrů. Francouzské lokality byly vybrány tak, aby byly blízko u sebe, do padesáti kilometrů, ale s rozdílnými biotopy, z důvodu prokázání rozdílnosti populací na malém území. Další podmínkou bylo, aby se biotopově shodovaly s chorvatskými nebo řeckými lokalitami. Záměrem bylo prokázat tvarovou podobnost vzdálených populací na stejných biotopech, tedy určit morfotypy.

Do molekulární analýzy byla dále přejata data ze studie z Ria Formosa lagoon, která se nachází zhruba dvě stě kilometrů západně za Gibraltarským průlivem za hranicí Portugalska se Španělskem na Portugalském pobřeží. Jedná se tedy o téměř nejzápadnější místo výskytu plže *H. trunculus* (obr. 6.). Pro představu, vzdálenost Ria Formosa lagoon od řeckého ostrova Lefkáda je přes dva tisíce kilometrů. Tato vzdálenost byla ideální pro genetickou analýzu rozdílnosti populací plže *H. trunculus* mezi touto portugalskou lokalitou a mými místy sběru. Z hlediska doby existence Středozezemního moře (5,5 milionu let – dnešní podoba s charakterem moře mírného pásu a s nižším kolísáním jeho hladiny – do osmdesáti metrů) (Bianchi & Morri, 2000; Mojetta, 2005), jeho členitosti a mobility tohoto druhu plže s přihlédnutím na délku života jednoho jedince (6–8 let) (El Hamdani et al., 1998) a

neschopnosti šířit se za pomoci veligerové larvy (přímý vývoj v kokonu) (Vasconcelos et. al., 2004 ex Gonzáles-Tizón et al., 2008), jde o přirozeně těžko překonatelnou vzdálenost.

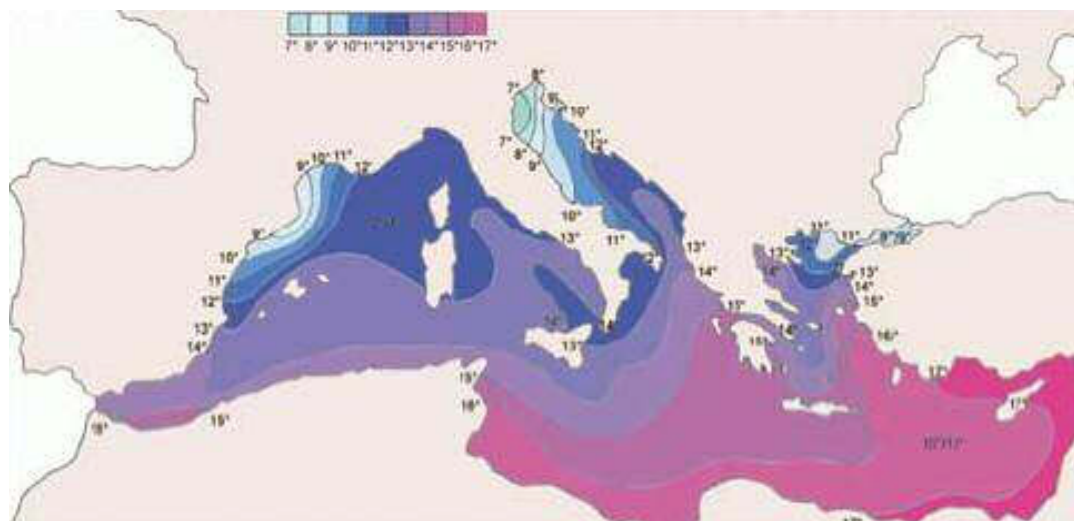
Středozemní moře, jak již bylo řečeno, je velmi členité, za což vděčí své bohaté geologické historii. Prvotní vznik a formování nejprve tropického moře Tethys spadá až do raných druhohor, kdy bylo kolébkou rozvoje mořského života. Postupně vlivem posunu litosferických desek a změn klimatu na planetě Zemi došlo k vytvoření Středozemního moře tak, jak ho známe dnes. K nejdramatičtějším změnám, ve smyslu kolísání hladiny vody a tím i vysychání obrovských území a oddělení od Atlantického oceánu, docházelo před dvaceti až deseti milióny let. V dnešní době se jedná o moře mírného pásma s rozlohou 2,6 milionu kilometrů čtverečních, což ho řadí mezi moře menší, s maximální hloubkou 5121 metrů (jihozápadní oblast Peloponésu) (Mojetta, 2005). Podmínky se v něm mění v závislosti na průměrné hloubce a proudech dané oblasti a také na zeměpisné poloze. Obecně však platí že teplota vody jak v zimních (obr. 3.), tak v letních měsících (obr. 4.) stoupá od západu k východu. Průměrná teplota vody v zimě v západní části činí 11 °C a ve východní 16 °C v létě pak je na západě 20 °C a na východě 28 °C. Tento západovýchodní trend platí celoročně i pro salinitu (obr. 5.), která je na západě 36 ‰ a na východě až 40 ‰. Příliv a odliv je nízký. Jedná se pouze o půlmetrové rozdíly ve výšce mořské hladiny (Mojetta, 2005). V tabulce (tab. 1., 2.) jsou vypsány všechny základní abiotické faktory reprezentující biotopy na jednotlivých lokalitách sběru (řešeno podle obrázků 3.–5., geologie oblasti a úrovně členitosti reliéfu dna).

**Tab. 1.:** Průměrné hodnoty zimních a letních teplot společně se salinitou na jednotlivých lokalitách sběru.

<b>Stát</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Teplota Z. (°C)</b>	<b>Teplota L. (°C)</b>	<b>Salinita (‰)</b>
<i>Chorvatsko</i>	<i>Zambratija</i>	9	24	37,5
	<i>Sovlje</i>	12	22	38
	<i>Sumartin</i>	13	24	38
<i>Řecko</i>	<i>Lefkáda</i>	12	26	39
	<i>Nikiana</i>	15	25	38,5
	<i>Meganisi</i>	15	25	38,5
	<i>Vasiliki</i>	15	25	38,5
<i>Francie</i>	<i>La Ciotat</i>	12	22	38
	<i>Six-Fours les Plages</i>	12	22	38

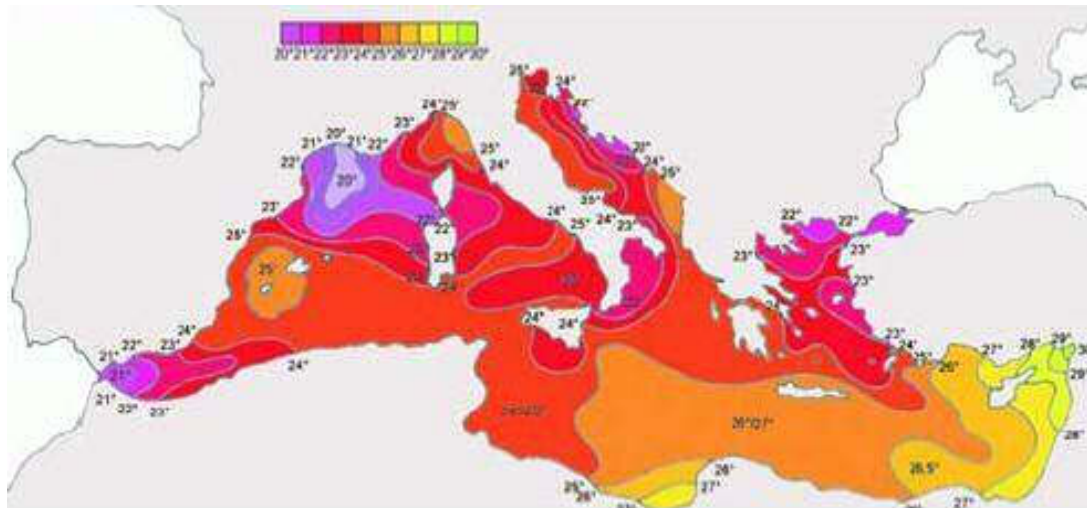
**Tab. 2.:** Typ geologie a úroveň členitosti reliéfu dna pro jednotlivé lokality sběru (VS = vápencová skála; JBPS-V = jemný bahnito-písčítý sediment – vápenec; PS-V = písčítý sediment – vápenec; KS+PS = křemičitý slepenec + písčítý sediment; O = ne; X = ano).

Stát	Lokalita	Geologie lokalit				Členitost reliéfu dna		
		VS	JBPS-V	PS-V	KS+PS	Nížká	Střední	Vysoká
Chorvatsko	Zambratija	O	O	X	O	X	O	O
	Sovlje	X	O	X	O	O	X	O
	Sumartin	X	O	X	O	O	O	X
Řecko	Lefkada	O	X	O	O	X	O	O
	Nikiana	X	O	X	O	O	X	O
	Meganisi	X	O	X	O	O	X	O
	Vasiliki	X	O	X	O	O	X	O
Francie	La Ciotat	O	O	O	X	O	O	X
	Six-Fours les Plages	X	O	X	O	O	O	X

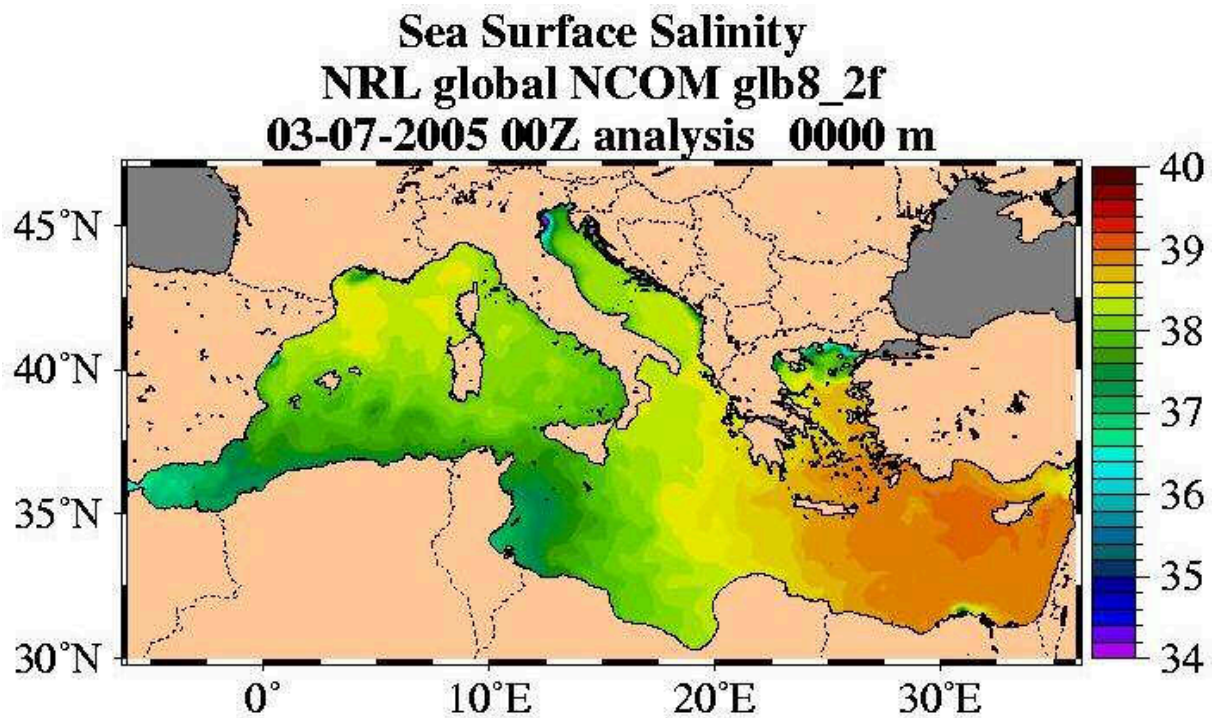


**Obr. 3.:** Mapa Středozemního moře s vyznačenými liniemi teplotních změn při hladině (průměrné zimní teploty ve stupních Celsia) – upraveno v programu GIMP 2 (GNU Image Manipulation Program, 2008).

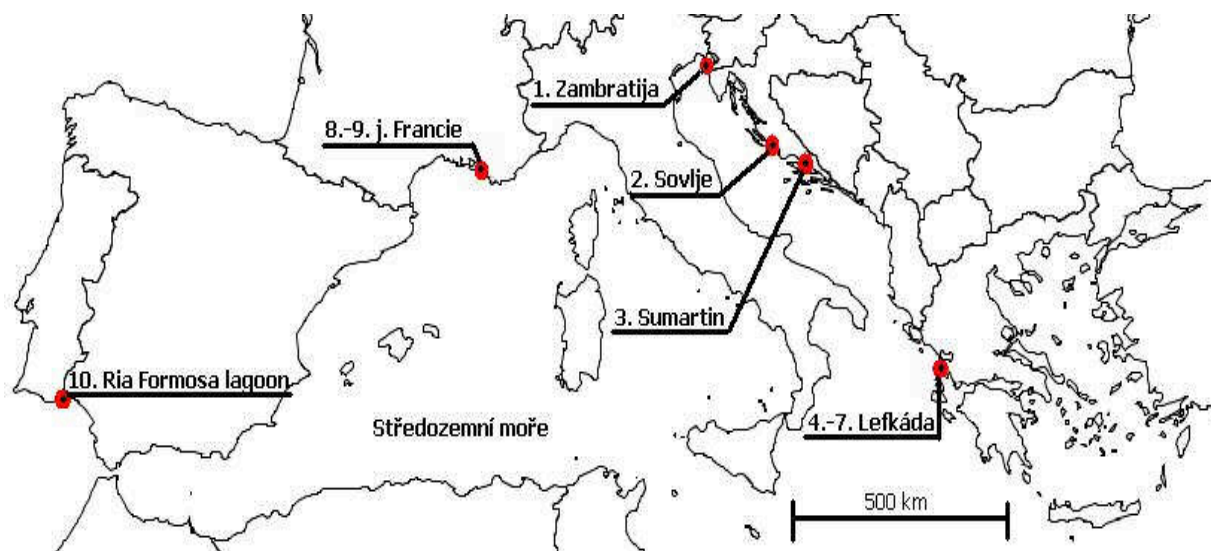




**Obr. 4.:** Mapa Středozemního moře s vyznačenými liniemi teplotních změn při hladině (průměrné letní teploty ve stupních Celsia) – upraveno v programu GIMP 2 (GNU Image Manipulation Program, 2008) .



**Obr. 5.:** Mapa Středozemního moře s vyznačenými liniemi změn salinity při hladině (<http://www.vialattea.net/esperti/php/risposta.php?num=7249>).



**Obr. 6.:** Mapa Středozevního moře s vyznačenými lokalitami sběru vzorků *H. trunculus*. Desátá lokalita Ria Formosa lagoon je místem sběru vzorků ve studii Gonzáles-Tizón et al., 2008 (data z GenBank).

### 2.1.1. Chorvatsko

#### 2.1.1.1. Zambratija

První lokalita sběru byla Zambratija, ležící pět kilometrů jižně od nejsevernějšího mysu Istrie (obr. 7.). Nízká členitost reliéfu dna i souše se shodují. Plynule přechází jeden v druhý. Příliv je nízký stejně jako v celém Jaderském moři. Geologické podloží je vápencové s písčítým sedimentem. Sběr byl prováděn od 13.4. do 16.4.2007, kdy bylo jasno s teplotou vzduchu 23–26 °C. Viditelnost pod vodou byla zhruba deset metrů, teplota hladinové vrstvy vody byla 15 °C s termoklinou ve třech metrech. Základní průměrné abiotické faktory jsou vypsány v tabulce (tab. 1.). Sběr byl prováděn v zálivu místní pláže od přílivové zóny do hloubky osmi metrů. Ve větších hloubkách už nebyly ostranky nacházeny. Od třech do osmi metrů se svažuje písčina, která je chudší na život.

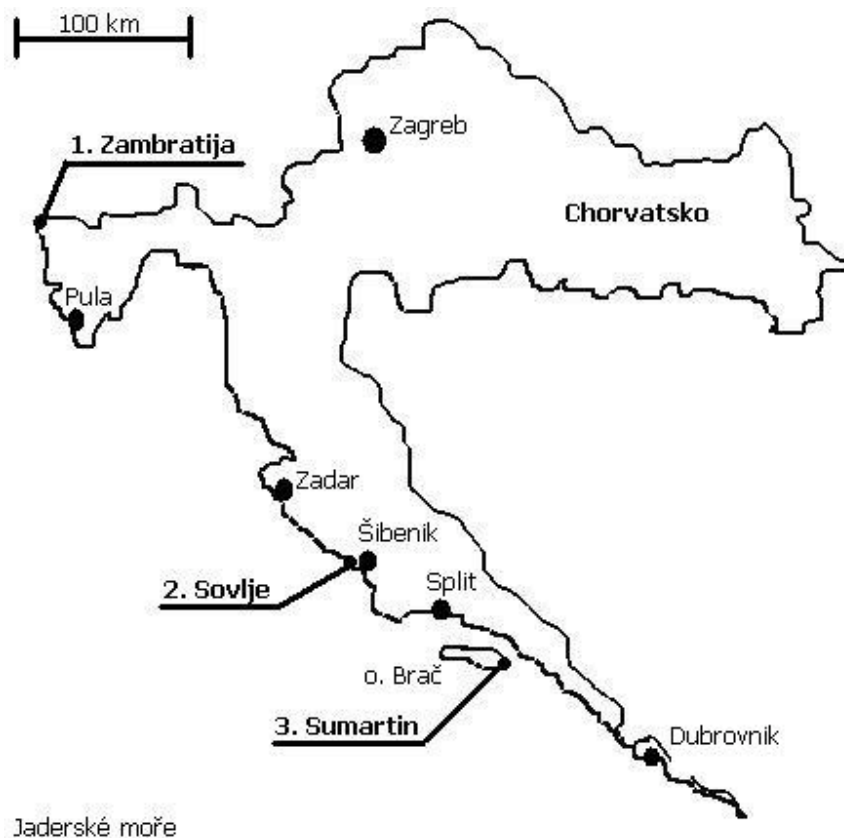
#### 2.1.1.2. Sovlje

Pět kilometrů severně od města Vodice ve střední Dalmácii se nachází druhá lokalita sběru. Jedná se o zátoku v Sovlje na Šibenické riviéře (obr. 7.). Sběr zde byl prováděn od 14.7. do 21.7.2007. Reliéf dna je kaskádovitě prudce svažité do hloubky dvacet metrů a jde o homogenní vápencovou skálu s malými ostrůvky písčítých usazenin. Celkově je reliéf dna středně členitý. Kaskádu dna tvoří tři plošiny. První je ve třech metrech, druhá v deseti metrech a poslední tvoří dno, které je porostlé posidonii (*Posidonia oceanica*). V době sběru

bylo jasno a maximální teplota vzduchu se pohybovala od 30 do 35 °C. Proudění je zde dosti silné, z důvodu vtoku a odtoku vody do zátoky vlivem přílivu a odlivu. Teplota moře byla 25 °C a viditelnost patnáct metrů. Průměrné zimní a letní teploty vody s průměrnou salinitou jsou uvedeny v tabulce (tab. 1.). *H. trunculus* se vyskytoval od sto padesáti centimetrů do osmnácti metrů hloubky, a to téměř výhradně na plošinkách, kde se zahrabával do půlky ulity do písku.

#### 2.1.1.3. Sumartin

Nejčlenitější a druhově nejbohatší lokalitou sběru srovnatelnou s francouzskými lokalitami byla poslední chorvatská lokalita na ostrově Brač, Sumartin (obr. 7.). Sběr byl započat 22.9.2007 a dokončen 1.10.2007. V období sběru nebylo možné tři dny sběry provádět, protože oblast byla vystavena bouřkám a silnému větru. Za přijatelného počasí pro sběr teploty dosahovaly ke 25 °C a při bouřce bylo 18 °C. Teplota moře se pohybovala od 17 do 20 °C. Viditelnost byla dvacetimetrová a proud žádný. Abiotické faktory typické pro oblast východního pobřeží ostrova Brač jsou vypsány v tabulce (tab. 1.). Kamenité dno se rychle svažuje a volně přechází v písčité dno. Boky zátoky tvoří vápencové stěny nebo prudké svahy poseté velkými kameny. Flora i fauna je zde velice rozmanitá. *H. trunculus* se zde hojně vyskytoval od dvou do patnácti metrů.



**Obr. 7.:** Mapa Chorvatska s vyznačenými lokalitami sběru vzorků.

## 2.1.2. Řecko

### 2.1.2.1. Lefkáda

V lokalitě u hlavního města Lefkády v místě městského odkaliště, které je propojeno s mořem jen úzkým průplavem sloužícím jako přístav (kotviště) pro malé lodě, byl sběr proveden 20.9.2009 (obr. 8.). Teplota vzduchu přesahovala 30 °C a teplota vody se též blížila teplotě vzduchu, protože hloubka odkaliště činila pouze jeden metr. Na této lokalitě jsem se nepotápěl, protože znečištění vody zde vyhovuje ke koupání jen pro odvážlivce. Při pohledu na průměrné teploty a salinitu v tabulce (tab. 1.) musím konstatovat, že realita v odkališti zdaleka neodpovídá průměru ostrova Lefkáda. Hodnoty teploty a salinity zde mají během roku mnohem větší výkyvy než v okolí, mimo odkaliště, díky malé hloubce lokality. V létě zde dochází k přehřátí vody a díky odparu ke zvýšení salinity a v zimě k prochlazení vody a k rapidnímu snížení salinity vlivem většího úhrnu srážek během zimních měsíců. Členitost reliéfu je zde velmi nízká, jedná se pouze o homogenní bahnito-písčité substrát. Jedinci byli sesbíráni v nulové hloubce na okraji jižní části odkaliště. Nízké druhové bohatství této

lokality bylo zarážející. Z okem viditelných druhů živočichů zde byli k zastižení jen ostranky *H. trunculus* a krabi.

#### 2.1.2.2. Nikiana

Nikiana je lokalita vzdálená deset kilometrů od města Lefkáda a nachází se na východním pobřeží ostrova Lefkáda poblíž města Nydri (obr. 8.). Jedná se o průliv mezi ostrovem Lefkáda a řeckou pevninou. Reliéf dna vykazuje střední členitost díky homogennímu písčitému sedimentu a řídkce roztroušeným vápencovým skalkám. Vzorky byly nasbírány 21.9.2009, kdy se teplota vzduchu vyšplhala až na 32 °C a teplota vody dosahovala 25 °C. Roční průměrné teploty a salinita jsou vypsány v tabulce (tab. 1.). Dohlednost zde byla snížena pod deset metrů díky silnějšímu proudu, který způsoboval zvýšenou úroveň turbidity. Druhová bohatost této lokality byla vyšší než na lokalitě Lefkáda, ale nevyrovnala se následujícím místům sběru.

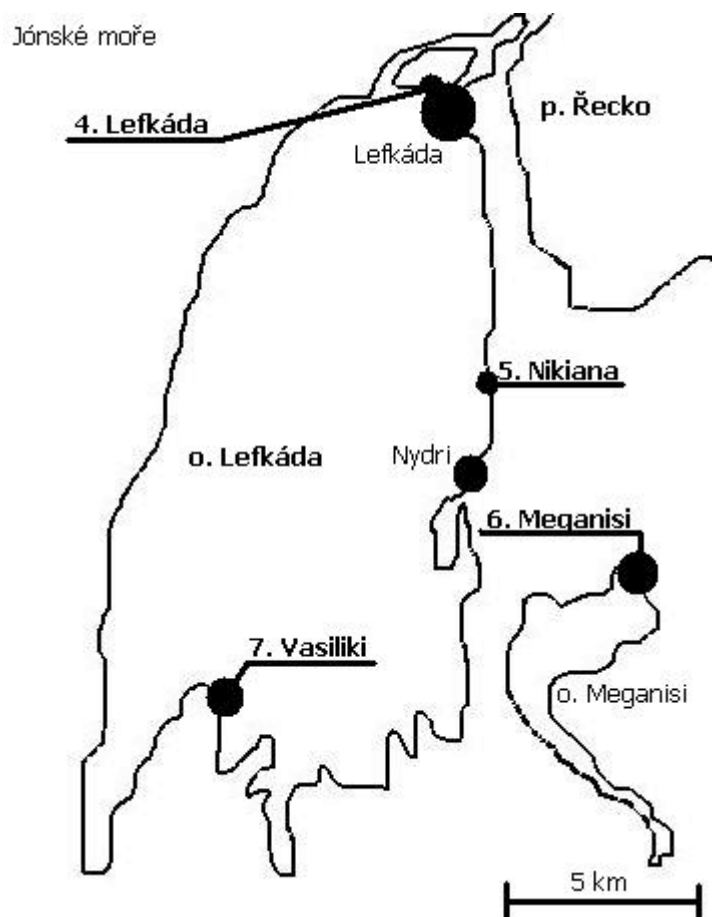
#### 2.1.2.3. Meganisi

Šestá lokalita sběru *H. trunculus* byla vybrána na ostrově Meganisi v nejsevernějším zálivu pro střední úroveň členitosti reliéfu dna. Tento záliv se nachází pět kilometrů na jihovýchod od Nydri v průlivu mezi ostrovem Lefkáda a řeckou pevninou. Jedná se však územně o součást Lefkády, jakési souostroví Lefkáda (obr. 8.). Sběr byl proveden 23.9.2009. Teplota vody i vzduchu odpovídala předchozí lokalitě Nikiana, stejně tak i průměrné roční teploty a salinita (tab. 1.). Díky nízké úrovni turbidity a slabým proudům zde byla dobrá viditelnost (více než dvacet metrů). Reliéf dna byl tvořen vápencovými skalkami různých velikostí s častými převisy, ale i tak bylo dno poměrně ploché. Tyto skalky byly přerušovány porosty posidonii a časté zde byly i ostrůvky písčitých usazenin. Tato lokalita byla velmi bohatá na život, jak na bezobratlé živočichy, tak na obratlovce.

#### 2.1.2.4. Vasiliki

Vasiliky se nachází dvacet kilometrů jihozápadně od města Lefkáda napříč přes celý ostrov v zálivu, který je celodenně vystaven silnému větru a vysokým vlnám, které utvářejí ráz zdejšího pobřeží (obr. 8.). Reliéf dna je středně členitý, jedná se pouze o vápencovou málo členitou skálu s občasnými písčinami. Vzorky byly nasbírány 25.9.2009 za teploty vzduchu 30 °C a teploty vody 24 °C. Průměrné roční teploty a salinita je identická s dvěma

předchozími lokalitami (tab. 1.). Druhové bohatství živočichů je zde vysoké, ale liší se tím, že se jedná převážně o pelagické druhy, které sem byly s největší pravděpodobností doneseny proudy (medúzy), protože záliv je na návětrné straně ostrova. Druhů bentických živočichů zde bylo méně, ale nechyběl zde všudypřítomný *H. trunculus*.



**Obr. 8.:** Mapa řeckého ostrova Lefkáda s vyznačenými lokalitami sběru vzorků.

### 2.1.3. Francie

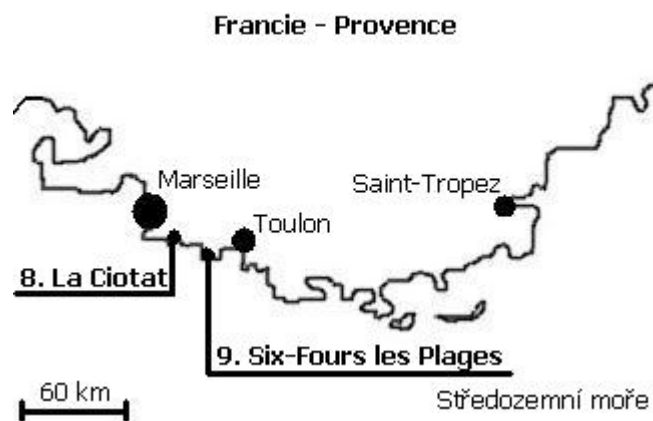
#### 2.1.3.1. La Ciotat

Osmá lokalita sběru se nacházela na jihozápadním pobřeží městečka La Ciotat v Jižní Francii dvacet kilometrů východně od Marseille (obr. 9.). Sběr byl proveden 5.8.2011, kdy se denní teplota vyšplhala až na 34 °C a teplota moře byla 25 °C s viditelností přes dvacet metrů. Průměrné teploty a salinita jsou v tabulce (tab. 1.). Vysoce členitý reliéf dna byl tvořen kolmými stěnami křemencového slepence s homogenním písčitém dnem přerušovaným

častými skalkami a porosty posidonii. Pobřeží bylo jak na druhy, tak na počty jedinců v populaci velmi chudé.

#### 2.1.3.2. Six-Fours les Plages

Tato poslední devátá lokalita se nacházela dvacet kilometrů východně od předešlé lokality sběru na deskovitých vápencových skalách s písčitymi lavicemi s celkově vysokou členitostí reliéfu dna a se stejně chudou faunou a florou jako na osmé lokalitě (obr. 9.). Sběr byl proveden 7.8.2011 za stejných povětrnostních podmínek jako sběr u La Ciotat. Dohlednost ve vodě však byla rozdílná, dosahovala pouze deset metrů. Díky tomu, že se jednalo o návětrnou stranu zátoky, bylo skalnaté pobřeží silně narušováno větrem a příbojem. Průměrné abiotické faktory této oblasti jsou vypsány v tabulce (tab. 1.).



**Obr. 9.:** Mapa jižní Francie s vyznačenými lokalitami sběru vzorků.

## 2.2. Metody použité v terénním výzkumu a laboratoři

### 2.2.1. Sběr vzorků

Všech 464 jedinců mořského plže druhu *H. trunculus* bylo postupně sesbíráno z devíti lokalit Středozemního moře. Odchyt byl prováděn přístrojovým (Scuba diving) a volným potápěním (Freediving). Jedinci byli posléze uspáni v roztoku chloridu hořečnatého ( $MgCl_2$ ) ve sladké vodě. Bylo použito 75 gramů hexahydrátu chloridu hořečnatého na jeden litr sladké vody (Gibbs, 1999). Po dvou hodinách pobytu v uspávacím roztoku plži vykazují plnou relaxaci svalové tkáně a tudíž je lze snadno vytáhnout z ulity, zjistit tak pohlaví a v případě samic postižených maskulinizací provést pitvu pro zjištění úrovně postižení „imposex“ (což jsem nezjišťoval). Pokud k relaxaci svalů nedojde, narkóza se prodlužuje na dobu nezbytně nutnou (Gibbs, 1999). Dále jsem zajistil genetický materiál pro molekulární analýzu, a to tak, že jsem odřízl část svalnaté nohy z oblasti hlavy a zafixoval ji v etanolu (96 %). Pro následující analýzy bylo nezbytné jedince usmrtit. Zbylé ulity jsem dále zpracovával v laboratoři.

### 2.2.2. Konzervace a čištění

Narkóza byla prováděna za účelem zjištění pohlaví, aniž bych narušil či nějak jinak znehodnotil ulity (Gibbs, 1999; Vasconcelos et al., 2006), které byly využívány pro analýzu geometrické morfometriky. Narkóza tohoto typu se poprvé na mořském plži *H. trunculus* prováděla v roce 1999 (Gibbs, 1999). Byla též prováděna i na jiném druhu ostranky *Nucella lapillus* (Gibbs, 1999; 2005). Tato velmi humánní metoda uspání a následného usmrcení byla velmi úspěšná a druh *H. trunculus* vykazuje vysokou snášenlivost k tomuto způsobu narkotizování (Vasconcelos et al., 2006). Srovnáním metod určení pohlaví bylo zjištěno, že výsledky se nemění. Oběma dvěma způsoby (usmrcení, uspání) bylo dosaženo 95 procentního správného určení pohlaví. Dnes už se tedy používá pouze uspávací metoda (Vasconcelos et al., 2006).

V laboratoři, po převozu z terénu, byly ulity dočištěny macerací od zbylých měkkých částí těl plžů a následně byly čištěny ulity z vnější strany od vápenatých nánosů, řas, houbovců a schránek kroužkoců. Tito živočichové a řasy využívají ulity *H. trunculus* jako substrát, oporu pro růst (Vasconcelos et al., 2007). Pro vnější čištění byl používán osmiprocentní potravinářský ocet a sladká voda. Za pomoci malých kartáčků a nožičků se ulity dočišťují.

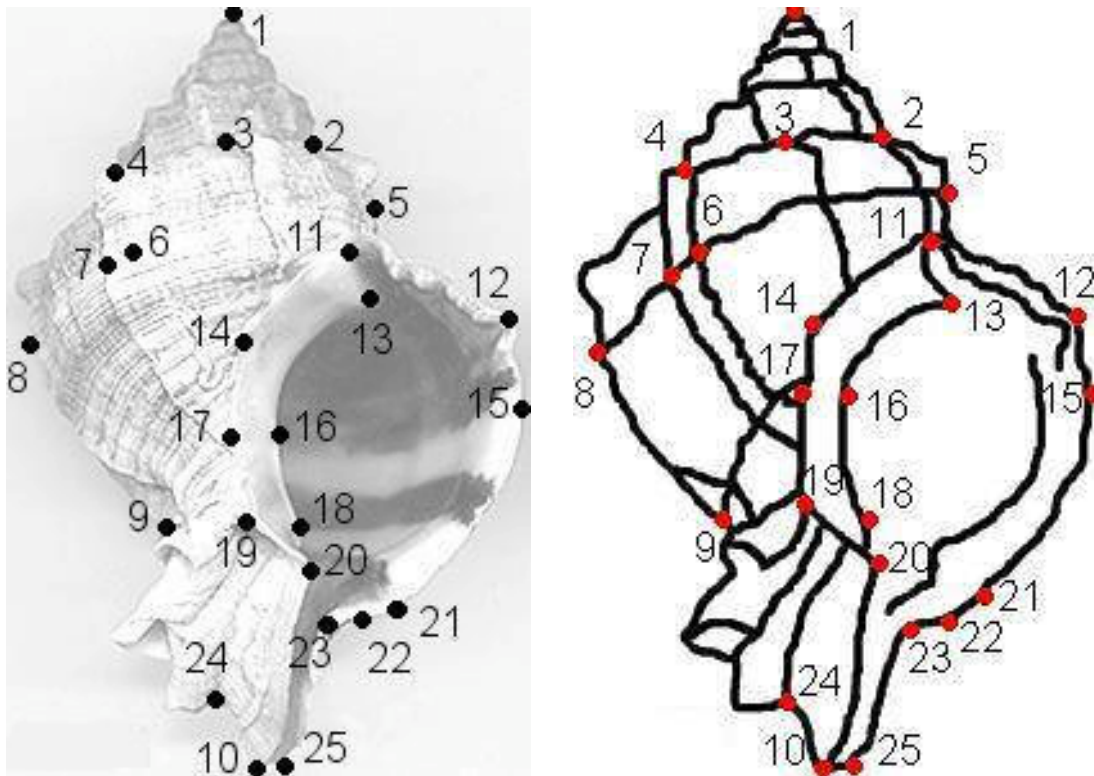


Čištění ulit je důležité pro přesnost geometricko-morfometrického měření, aby nedocházelo k chybám. U ulit značně znečištěných schránkami mnohoštětinatců někdy docházelo ke zborcení vrchní části spirály, ale nikdy ne tak, aby nemohla být použita v geometrické morfometrii.

### *2.2.3. Geometrická morfometrie*

Pro stanovení tvarových rozdílů na ulitách po jejich důkladném vyčištění byla použita geometrická morfometrie, která byla již úspěšně použita v mojí bakalářské práci (Macík, 2009). Tato metoda měla určit tvarové rozdíly ulit v mnou zkoumaných populacích, tedy je oddělit anebo odhalit populace tvarově podobné (morfotypy).

Ulita každého jedince byla vyfotografována z ventrálního pohledu (pohled kolmý na oblast obústí). Použit byl fotoaparát Olympus  $\mu$  780 a výsledné fotografie byly uloženy ve formátu JPEG. S pomocí geometricko-morfometrických programů tpsUtil (Rohlf, 2008), tpsDig (Rohlf, 2006), Relative warps (Rohlf, 2007a) a tpsRegr (Rohlf, 2007b) byly analyzovány všechny ulity. Pomocí programu tpsDig byla získána souřadnicová data (x,y) použitých landmarků (obr. 10.) (Rohlf, 2006). Program Relative warps umožňuje upravení souřadnicových dat stanovením průměrné tangenciální konfigurace prokrustovskou superpozicí. Tentýž program vypočetl matice deformačních energií a uniformní změny tvaru: Uni X; Uni Y (Rohlf, 2007a). Pomocí programu tpsRegr byly zjištěny geometrické velikosti ulit (Rohlf, 2007b). Mnohorozměrná matice deformačních energií a uniformní změny tvaru byla dále analyzována v programu STATISTICA 8 (StatSoft, 2007). Tvarové vizualizace byly provedeny v programu tpsRegr (Rohlf, 2007b).



**Obr. 10.:** Vlevo = Použité landmarky na ventrální straně ulity u plže *H. trunculus*. **1** = vrchol ulity; **2** = dotek starší a mladší části spirály 360° od vnějšího pysku; **3** = dotek starší a mladší části spirály (dotek starého vnějšího pysku, který je v intervalu (180°,360°) od vnějšího pysku); **4** = dotek starší a mladší části spirály 180° od vnějšího pysku; **5** = hrbol na třetím spirálním žebře 360° od vnějšího pysku; **6** = pozice na hrbolu starého vnějšího pysku, kde prochází třetí spirální žebro (interval (180°,360°) od vnějšího pysku); **7** = pozice na starém vnějším pysku, kde prochází třetí spirální žebro (interval (180°,360°) od vnějšího pysku); **8** = hrbol na třetím spirálním žebře 180° od vnějšího pysku; **9** = oblast báze ulity za starým sifonálním kanálkem a prvním bazálním hrbolem; **10** = vrchol cívkového úseku obústí (columella); **11** = vrchol análního kanálku; **12** = největší výstupek na vnějším pysku; **13** = výstupek parietálního pysku, který sousedí s análním kanálkem; **14** = okraj patrového návalku v oblasti báze; **15** = nejvzdálenější část vnějšího pysku od osy ulity\* (tvar bez výstupku); **16** = vnitřní okraj patrového návalku, který vytváří úsečku s landmarkem 17 (úsečka je kolmá k ose ulity); **17** = vnější okraj patrového návalku, který se spirálně shoduje s landmarkem 9; **18** = vrchol patrového návalku, který blíže sousedí sází ulity; **19** = okraj patrového návalku, který je v tomto místě spojen se starým sifonálním kanálkem; **20** = vrchol hrbolu na patrovém návalku, který blíže sousedí se sifonálním kanálkem; **21** = dno žlábků na vnějším pysku, který sousedí se srpkem na vnějším pysku; **22** = vrchol srpku na vnějším pysku, který sousedí se žlábkem na vnějším pysku; **23** = vrchol srpku na vnějším pysku, který sousedí se začátkem sifonálního kanálku; **24** = píštěl (umbilicus) nejvzdálenější část, dotek nového a starého sifonálního kanálku; **25** = vrchol sifonálního kanálku, který vychází z části vnějšího pysku. \*Osa ulity je úsek mezi vrcholem ulity a koncem sifonálního kanálku.; Vpravo = Použité landmarky na schématickém nákresu tvaru ventrální strany ulity u plže *H. trunculus*. Převzato ze studie Macík, 2009.

## 2.2.4. Molekulární analýza

### 2.2.4.1. Izolace DNA

Pro molekulární analýzu bylo připraveno 464 vzorků z devíti lokalit ve Středozemním moři. Vzorky měkkého těla (přední část nohy) byly zakonzervovány v etanolu (96%) v 1,5 ml uzavíratelné zkumavce (Eppendorf) a uchovány v chladícím boxu před dalším zpracováním. Následně bylo z každého vzorku, který byl použit na izolaci DNA, odříznuta malá část. Poté byla ponechána několik minut na vzduchu, aby došlo k odpaření etanolu. Vše bylo prováděno ve sterilním laboratorním prostředí. Izolace DNA byla provedena z vybraných vzorků z jednotlivých lokalit (tři vzorky z každé). Čtyři řecké lokality byly považovány za jedinou z důvodu nepříteliš velkých geografických vzdáleností (>10 km). V součtu bylo vyizolováno 18 vzorků (6 lokalit) s tím, že izolace třetí chorvatské lokality Sumartin musela být opakována, protože při kontrole pomocí gelové elektroforézy nebyl zaznamenán signál (obr. 32.). Celý proces izolace byl proveden za použití „izolačního kitu“ (JETQUICK Tissue DNA Spin Kit – Genomed) podle postupu izolačního protokolu (část A) přiloženého uvnitř (Bowtell, 1987).

### 2.2.4.2. PCR

Metoda PCR „Polymerase chain reaction“ (Polymerázová řetězová reakce) slouží k rychlému namnožení (amplifikaci) námi vybraného úseku DNA. Díky tomu lze i ze vzorku s nízkou koncentrací analyzovat DNA. Aby došlo k amplifikaci úseku o který máme zájem, musíme k izolátu DNA přimíchat krátké oligonukleotidové úseky DNA zvané „primer“. Dále se přidává Master Mix. Tato směs obsahuje všechny zbylé komponenty reakční směsi – reakční pufr, aditiva (přímá gelová elektroforéza amplifikovaného produktu – bez nutnosti vkládacího pufu), anti-Taq monoklonální protilátku specifickou pro Taq DNA polymerázu, barvivo pro snadnější manipulaci se vzorky a vizuální kontrolu vzorků při gelové elektroforéze (barvivo je na gelu pohyblivější než PCR produkt), Taq-Purple DNA polymerázu a stabilizátory. Anti-Taq protilátka blokuje enzymatickou aktivitu Taq-Purple DNA polymerázy, díky čemuž je znemožněno zahájení polymerázové reakce dříve než při PCR. Při denuraci, během PCR, dojde k nevratné inaktivaci protilátky. DNA polymeráza je tak odblokována a stane se enzymaticky aktivní. Naposledy se přidává voda. PCR amplifikace předtím vyizolované DNA probíhá v přístroji zvaný „Termocycler“, který je zkonstruovaný tak, aby dokázal během několika sekund upravit teplotu reakční směsi podle předem stanoveného protokolu. Výsledným produktem PCR jsou miliony kopií námi vybraného úseku DNA. Délka úseků

může dosahovat od 2500 bází párů (bp) do 30000 bp podle použité polymerázy. PCR produkt je dále pomocí GE (gelová elektroforéza) testován na homogenitu amplifikované DNA a též se jedná o kontrolu úspěšnosti izolace DNA. Následuje sekvenace úseku DNA a další analýzy (Šmarda et al., 2005).

Celý proces amplifikace DNA (v mojí práci cytochrom c oxidáza podjednotka jedna = COI) se skládá ze tří kroků. Prvním je denaturace, při které dochází k narušení vodíkových můstků v DNA a tím se rozvolní dvoušroubovice. V dalším kroku dochází k nasednutí primerů na jednovláknovou DNA. Poté se na komplex DNA + primer naváže DNA polymeráza. V posledním třetím kroku dochází k samotné syntéze DNA a to ve směru od 5' konce k 3' konci. Dochází k přirůstání komplementárního vlákna k původní molekule jednovláknové DNA. Proces se několikrát opakuje (30krát až 40krát) a tím dojde k amplifikaci úseku, který zkoumáme (Šmarda et al., 2005).

Pro mojí reakční směs na PCR amplifikaci byly použity univerzální primery pro mitochondriální cytochrom c oxidázu podjednotku jedna (COI) a to LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3') o objemu 1,5 µl, HCO2198 (5'-TAAAC TTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 3') o objemu 1,5 µl (Folmer et al., 1994), které jsou často používány (Samadi et al., 2006; Iguchi et al., 2007; Duda et al., 2009; Duda et al., 2009b; Chen et al., 2009), voda o objemu 8,5 µl a Combi PPP Master Mix (Top-Bio, 2001) o objemu 12,5 µl na každý izolát. PCR reakce byla provedena v termocycleru (BIOER, XPCycler). Prvním krokem byla denaturace reakční směsi při 94 °C na 3 minuty, po které následovalo 35 opakování 94 °C na 1 minutu, 40 °C na 1 minutu a 72 °C na 1,5 minuty a závěrečná extenze reakční směsi byla 5minutová při 72 °C.

#### 2.2.4.3. Gelová elektroforéza

K dělení látek podle jejich pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli slouží gelová elektroforéza (GE). Pro naše účely byla použita horizontální gelová elektroforéza (HGE). Ta se hlavně používá pro velké molekuly jako sacharidy, proteiny a nukleové kyseliny. Jako médium se nejčastěji používá agarový gel, ve kterém dochází k separaci molekul. Gel je jakási třídímenzionální síť, která slouží jako „sítka“, přičemž velikost pórů odpovídá bílkovinám a nukleovým kyselinám. Rychlosti molekul jsou závislé na jejich náboji, velikosti, molekulové hmotnosti a pohyblivosti gelu (Šmarda et al., 2005).

Pro GE byl použit TAE pufr a agarózový gel (1%) v poměru 0,75 g agarózy na 75 ml TAE. PCR produktu bylo nanášeno vždy 5  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala 30 minut za stálého napětí 120 V. Výsledky GE byly vizualizovány modrým světlem (Herolab, UltraCAM-UVT-20BE), protože PCR produkt byl obarven barvivem SybrGreen 1 (výrobce In Vitro Gen). Fotografie byly pořízeny fotoaparátem Canon PowerShot A620.

#### 2.2.4.4. Sekvence, alignment

Cílem sekvenace je určit primární strukturu DNA, tedy zjistit pořadí nukleotidů v molekule DNA. Produkt polymerázové řetězcové reakce byl odeslán na sekvenaci (MacroGen Inc., Soul, Korea). PCR produkt byl sekvenován „Sangerovým sekvenováním“ (specifická inhibice enzymové syntézy řetězců DNA) (Šmarda et al., 2005). Výsledné „chromatogramy“ byly „zkontigovány“ dohromady v programu Seqman (DNASTar). Následně byly FASTA soubory „alignovány“ v programu BioEdit (Hall, 1999). Navíc byly pro analýzu použity data z GenBank (ACA62688.1) ze studie na *H. trunculus* z Portugalského pobřeží (González-Tizón et al., 2008).

#### 2.2.5. Statistické zhodnocení

Pomocí programu STATISTICA 8 (StatSoft, 2007) byla analyzována mnohorozměrná data a dále byly zhotoveny grafy. Obrázky a přílohy použité v této práci byly vytvořené či upravené v programu GIMP 2 (GNU Image Manipulation Program, 2008).

Mnohorozměrná data byla analyzována pomocí Discriminant function analysis (DFA) při níž bylo nutné provést Bonferroniho korekci hladiny významnosti pro vícečetná párová srovnání. Počáteční hodnota přijatelné chyby 1. druhu byla vydělena počtem párových srovnání (pro devět lokalit sběru  $\alpha = 0,05/36 = 0,0014$ ). Tato metoda měla prokázat či vyvrátit hypotézu o tvarové rozdílnosti jednotlivých mnou zkoumaných lokalit. Pro zjištění podobnosti jednotlivých lokalit byly použity Mahalanobisovy distance ( $D^2$ ), díky kterým jsem schopen určit morfotypy tvarově podobných jedinců. Morfotypy byly také analyzovány pomocí DFA (Bonferroniho korekce pro 6 morfotypů  $\alpha = 0,05/15 = 0,0033$ ). Vizualizace pomocí dendrogramu, který vyobrazuje vztahy mezi morfotypy skrze tvarové rozdíly či podobnosti byla zhotovena v programu STATISTICA 8 - UPGMA (StatSoft, 2007). Tento dendrogram byl zhotoven z Mahalanobisových distancí mezi morfotypy.

Pro zjištění úrovně postižení (imposex) plžů *H. trunculus* z jednotlivých lokalit a států byla použita STATISTICA 8 (StatSoft, 2007). V programu Canoco (Braak & Šmilauer, 1998) byl vizualizován vztah vybraných abiotických faktorů k tvarovým rozdílům ulit mezi morfotypy mořských plžů *H. trunculus* tak, že abiotické faktory byly vyneseny jako „supplementary variables“ do prostoru prvních dvou diskriminačních os. Data poskytující informace o počtech jedinců s pohlavím samčím, samičím a maskulinizované samice (imposex) na jednotlivých lokalitách jsou v tabulce (tab. 3.).

**Tab. 3.:** Počty jedinců jednotlivých kategorií pohlaví pro příslušné lokality.

<b>Stát</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Samci</b>	<b>Samice</b>	<b>Imposex</b>	<b>Celkem</b>
<i>Chorvatsko</i>	<i>Zambratija</i>	11	45	44	100
	<i>Sovlje</i>	37	0	63	100
	<i>Sumartin</i>	43	32	25	100
<i>Řecko</i>	<i>Lefkáda</i>	17	17	6	40
	<i>Nikiana</i>	8	4	22	34
	<i>Meganisi</i>	10	7	17	34
	<i>Vasiliki</i>	6	7	22	35
<i>Francie</i>	<i>La Ciotat</i>	5	2	3	10
	<i>Six-Fours les Plages</i>	4	1	6	11
<b>Celkem</b>	<b>9</b>	<b>141</b>	<b>115</b>	<b>208</b>	<b>464</b>

### 3. Výsledky

#### 3.1. Geometricko-morfometrická analýza

Za pomoci programu Relative warps (Rohlf 2007a) byla vypočtena matice deformačních energií, která byla použita jako mnohorozměrný geometrický parametr tvaru ulit plžů *H. trunculus*. Rozdíly mezi lokalitami ve tvaru ulit byly výrazné a signifikantní na hladině 5% významnosti (Bonferroniho korekce). Pro některé dvojice lokalit Nikiana, Meganisi, Vasiliky (Řecko) a La Ciotat, Six-Fours les Plages (Francie) byly hodnoty F-statistiky nižší (tab. 4.),  $P > 0,0014$  a Mahalanobisovy distance (tab. 5.) také nižší, což poukazuje na tvarovou podobnost jedinců mezi těmito lokalitami. Tito jedinci byli sloučeni do dvou morfotypů.

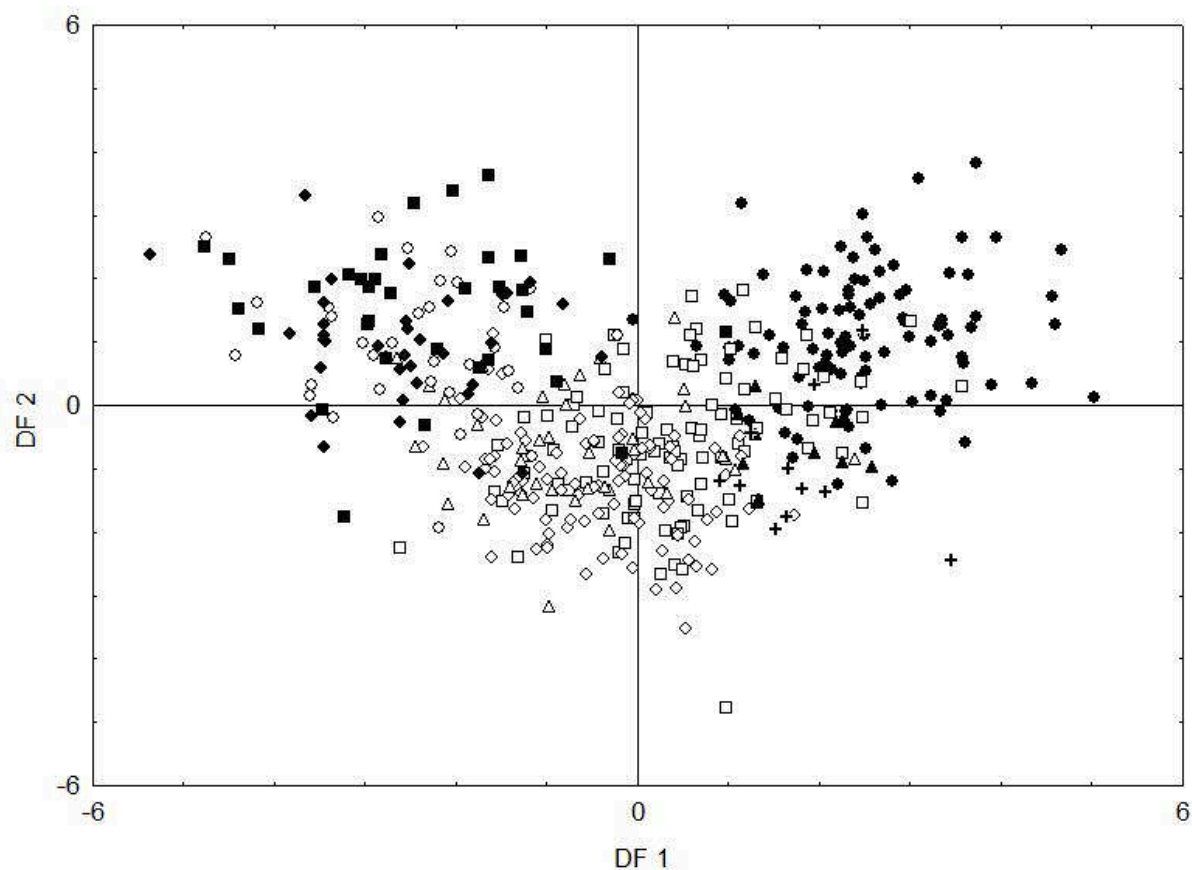
**Tab. 4.:** Rozdíly ve tvaru ulit mezi populacemi – výsledky testu statistické významnosti Mahalanobisových distancí. Uvedeny jsou hodnoty F-statistiky se zvýrazněnými nesignifikantními rozdíly (Bonferroniho korekce přijatelné chyby 1. druhu  $\alpha = 0,05/36 = 0,0014$ ).

Lokalita	Zambratija	Sovlje	Sumartin	Lefkáda	Nikiana	Meganisi	Vasiliki	La Ciotat
<i>Sovlje</i>	8,75	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sumartin</i>	13,80	3,68	-	-	-	-	-	-
<i>Lefkáda</i>	9,33	4,50	3,03	-	-	-	-	-
<i>Nikiana</i>	12,93	6,42	5,30	3,70	-	-	-	-
<i>Meganisi</i>	12,45	7,09	6,16	4,60	1,27	-	-	-
<i>Vasiliki</i>	14,22	7,18	6,06	4,70	1,55	1,55	-	-
<i>La Ciotat</i>	3,55	3,25	3,97	3,50	5,46	5,09	5,03	-
<i>Six-Fours les Plages</i>	3,84	3,36	4,18	4,00	6,09	5,73	5,57	0,95

**Tab. 5.:** Matice Mahalanobisových distancí mezi populacemi se zvýrazněnými nesignifikantními rozdíly na 5% hladině významnosti upravené Bonferroniho korekcí.

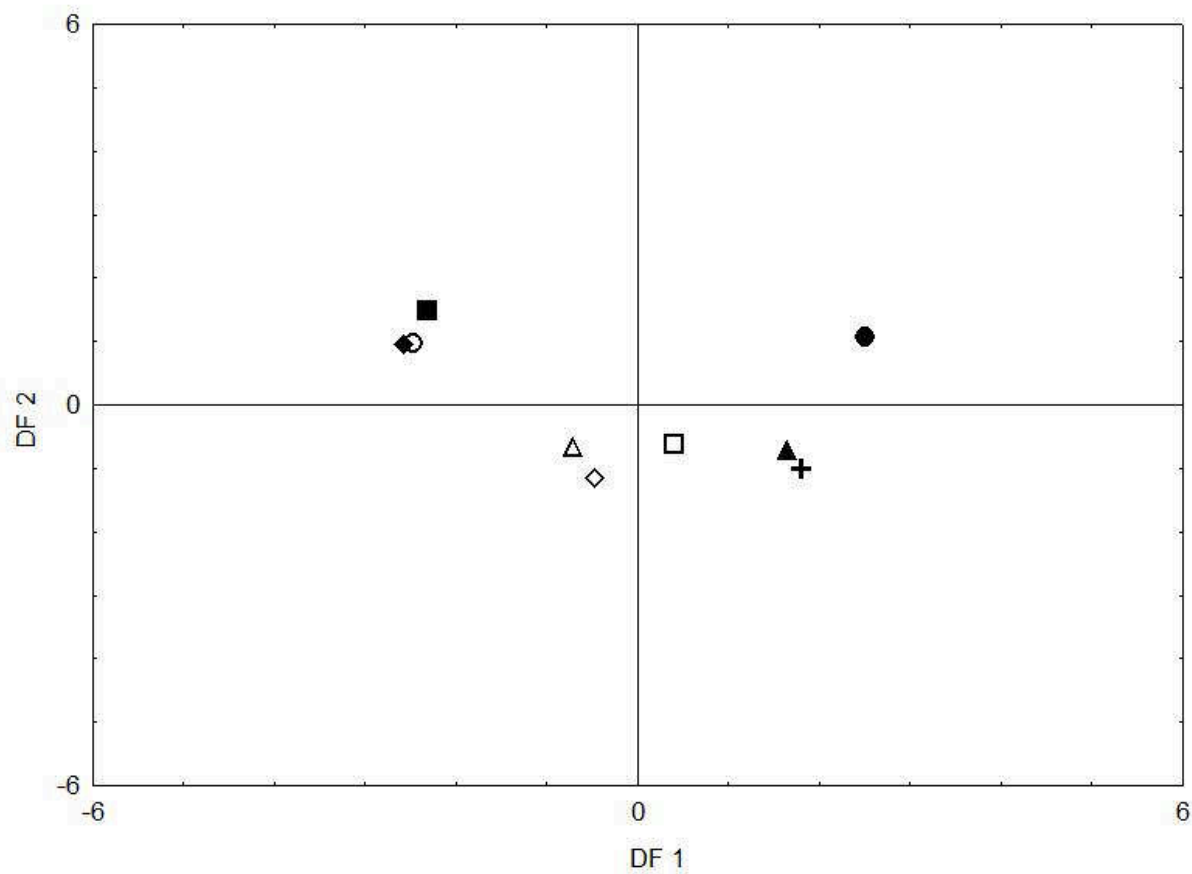
Lokalita	Zambratija	Sovlje	Sumartin	Lefkáda	Nikiana	Meganisi	Vasiliki	La Ciotat
<i>Sovlje</i>	8,93	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sumartin</i>	14,09	3,76	-	-	-	-	-	-
<i>Lefkáda</i>	16,67	8,04	5,42	-	-	-	-	-
<i>Nikiana</i>	26,01	12,92	10,67	10,29	-	-	-	-
<i>Meganisi</i>	25,06	14,27	12,39	12,88	3,80	-	-	-
<i>Vasiliki</i>	27,99	14,14	11,92	12,84	4,59	4,59	-	-
<i>La Ciotat</i>	19,94	18,25	22,30	22,33	36,08	33,65	33,04	-
<i>Six-Fours les Plages</i>	19,80	17,31	21,55	23,65	37,38	35,21	33,97	9,29

Diskriminační analýza DFA úspěšně oddělila jedince z jednotlivých lokalit sběru na 76 % (obr. 11.). Na obrázku 12 jsou pro přehlednost vyneseny průměr jednotlivých lokalit. Dendrogramy vytvořené z Mahalanobisových distancí mezi jednotlivými lokalitami sběru vzorků metodou UPGMA jsou znázorněny na obr. 15. a 16.



**Obr. 11.:** Vizualizace výsledků diskriminační analýzy (DFA) tvaru ulit *H. trunculus* pro devět lokalit sběru (● – Zambratija; □ – Sovlje; ◇ – Sumartin; Δ – Lefkáda; ○ – Nikiana; ■ – Meganisi; ◆ – Vasiliki; ▲ – La Ciotat; + – Six-Fours les Plages) v prostoru prvních dvou diskriminačních os (DF 1; DF 2).





**Obr. 12.:** Vizualizace výsledků diskriminační analýzy (DFA) tvaru ulit *H. trunculus* pro devět lokalit sběru (● – Zambratija; □ – Sovlje; ◇ – Sumartin; △ – Lefkáda; ○ – Nikiana; ■ – Meganisi; ◆ – Vasiliki; ▲ – La Ciotat; + – Six-Fours les Plages) v prostoru prvních dvou diskriminačních os (DF 1; DF 2). Vyneseny průměrné hodnoty lokalit.

### 3.2. Morfotypové určení

Morfotypy byly stanoveny podle předchozí geometricko-morfometrické studie. Z výsledků byla patrná homogenita tvarů ulit pro trojici řeckých lokalit Nikiana, Meganisi a Vasiliki a dvojici francouzských lokalit La Ciotat a Six-Fours les Plages. Z devíti lokalit tedy vzešlo šest morfotypů (Zambratija – Chorvatsko = ZCh; Sovlje – Chorvatsko = SoCh; Sumartin – Chorvatsko = SuCh; Lefkáda – Lefkáda = LL; Nikiana+Meganisi+Vasiliky – Lefkáda = NMVL; La Ciotat+Six-Fours les Plages – Francie = LCSFF), a diskriminační analýza DFA byla provedena pro těchto šest morfotypů. Mahalanobisovy distance byly signifikantní mezi všemi dvojicemi morfotypů na 5% hladině významnosti (upravené Bonferroniho korekcí  $\alpha = 0,05/15 = 0,0033$ ) (tab. 6.–7.).

**Tab. 6.:** Rozdíly mezi morfotypy tvaru ulit hledané na základě matice deformačních energií a DFA: hodnoty F-statistiky, (df = 46,413).

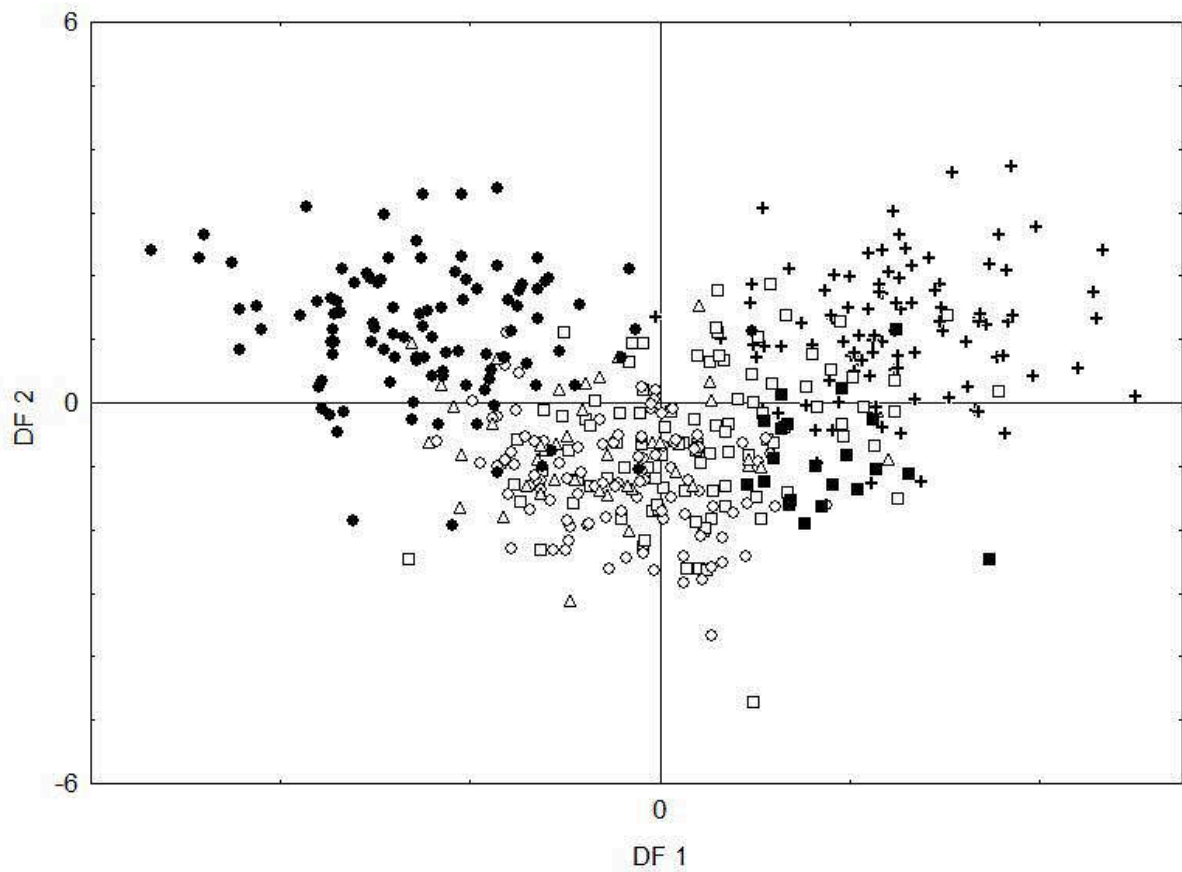
<b>Morfotypy</b>	<i>ZCh</i>	<i>SoCh</i>	<i>SuCh</i>	<i>LL</i>	<i>NMVL</i>
<i>SoCh</i>	8,73	-	-	-	-
<i>SuCh</i>	13,80	3,71	-	-	-
<i>LL</i>	9,33	4,51	3,04	-	-
<i>NMVL</i>	24,89	12,33	10,19	5,97	-
<i>LCSFF</i>	5,93	5,23	6,64	5,54	10,68

**Tab. 7.:** Rozdíly mezi morfotypy tvaru ulit hledané na základě matice deformačních energií a DFA: párová porovnání – Mahalanobisovy distance.

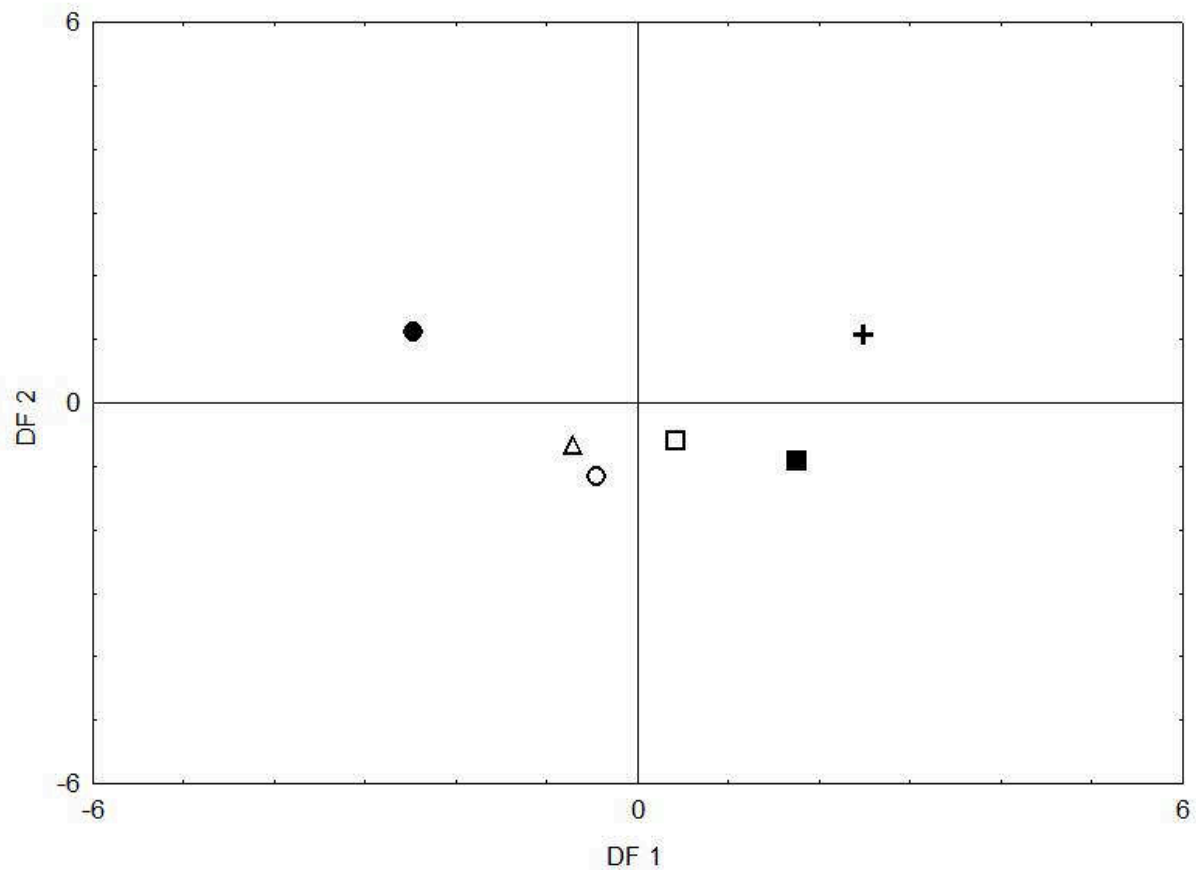
<b>Morfotypy</b>	<i>ZCh</i>	<i>SoCh</i>	<i>SuCh</i>	<i>LL</i>	<i>NMVL</i>
<i>SoCh</i>	8,90	-	-	-	-
<i>SuCh</i>	14,08	3,79	-	-	-
<i>LL</i>	16,66	8,06	5,43	-	-
<i>NMVL</i>	25,02	12,39	10,25	10,57	-
<i>LCSFF</i>	17,43	15,36	19,52	20,52	31,24

Diskriminační analýza DFA úspěšně oddělila jednotlivé morfotypy z 81 % (obr. 13). Na obrázku 14 jsou pro přehlednost vyneseny průměry jednotlivých morfotypů.

Dendrogramy vytvořené z Mahalanobisových distancí mezi morfotypy metodou UPGMA jsou znázorněny na obr. 15. a 16., vyobrazují vztahy mezi morfotypy a jednotlivými lokalitami sběru vzorků.

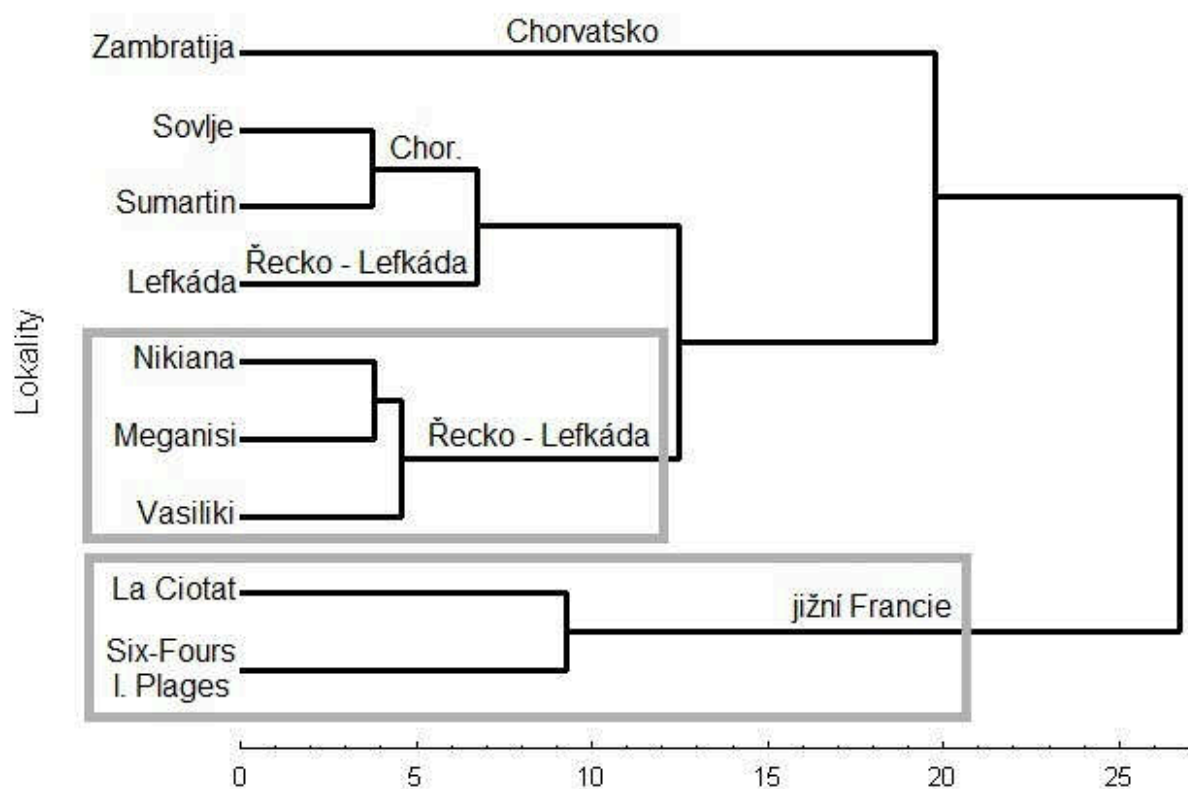


**Obr. 13.:** Vizualizace výsledků diskriminační analýzy (DFA) tvaru ulit *H. trunculus* pro šest morfotypů (+ – ZCh; □ – SoCh; ○ – SuCh; △ – LL; ● – NMVL; ■ – LCSFF) podle dvou diskriminačních os (DF 1; DF 2).

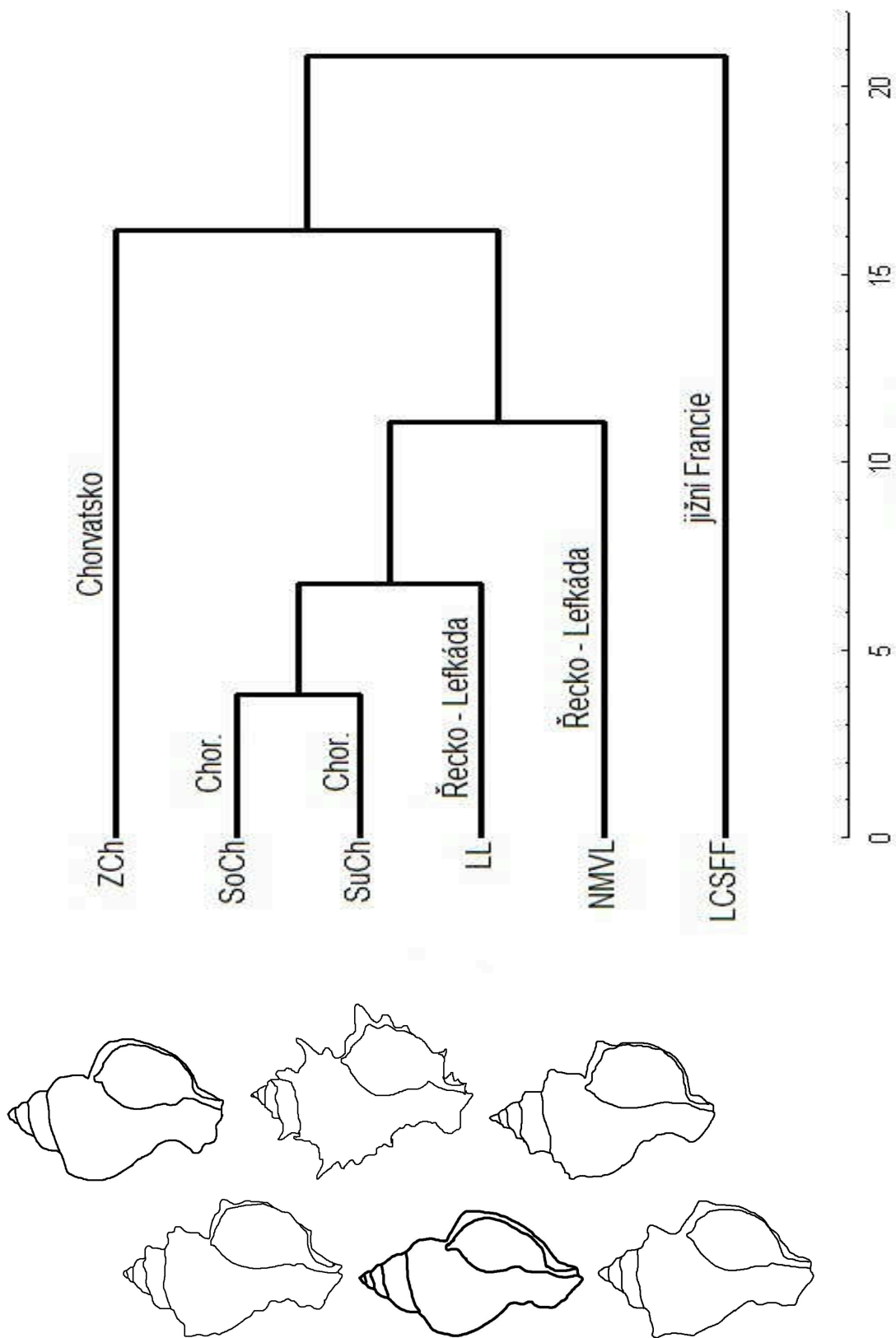


**Obr. 14.:** Vizualizace výsledků diskriminační analýzy (DFA) tvaru ulit *H. trunculus*: průměrné hodnoty DFA pro šest morfotypů (+ – ZCh; □ – SoCh; ○ – SuCh; Δ – LL; ● – NMVL; ■ – LCSFF) podle dvou diskriminačních os (DF 1; DF 2).

Z výsledných vizualizací tvarových rozdílů ulit plže *H. trunculus* mezi lokalitami jeho sběru pomocí dendrogramů (obr. 15., 16.) je vidět podobnost francouzských lokalit a jejich výrazná odlišnost od ostatních, a proto byly následně sloučeny v LCSFF morfotyp (La Ciotat Six Fours Francie). Homogenita tvaru ulit jedinců z Francie je navíc prokázána výsledky DFA pro lokality, což je zřejmé z tabulky pro F statistiku (tab. 4.) a pro Mahalanobisovi distance (tab. 5.). Ke stejnému sloučení lokalit díky DFA analýze došlo i u třech řeckých lokalit. Vznikl morfotyp NMVL (Nikiana Meganisi Vasiliki Lefkáda).



**Obr. 15.:** Vztahy mezi jednotlivými lokalitami sběru vzorků plže *H. trunculus* s šedě zvýrazněnými skupinami lokalit sloučených v určitý morfotyp na základě diskriminační analýzy matice deformační energie tvaru ulity.



**Obr. 16.:** Vztahy mezi jednotlivými morfotypy ulit plže *H. trunculus* na základě diskriminační analýzy matice deformačních energií s přiřazenými typickými tvary ulit (vlevo nahoře morfotyp ZCh, uprostřed SuCh, vpravo NMVL; vlevo dole morfotyp SoCh, uprostřed LL a vpravo LCSFF).

Vizualizace tvaru ulit pomocí deformační sítě provedená v programu tpsRegr (Rohlf, 2007b) ukazuje rozdíly ve tvaru ulit pro jednotlivé morfotypy (obr. 19.–24., 26.–31.) a konsenzuální tvar všech 464 ulit (obr. 18., 25.). Zřetelně viditelné jsou hlavně rozdíly v základních délkách a šířkách jednotlivých hlavních částí ulity jako jsou délka a šířka ulity, délka a šířka bazální části ulity, a to jak v oblasti blíže ke spirální části, tak v oblasti sifonálního kanálku. Dále pak jsou viditelné rozdíly v délce a šířce spirální části a v délce a šířce obústí.

Celkově lze morfotypy také rozlišit na tři skupiny podle trnů. Vznikly by skupiny s hladkou ulitou, s malými trny, a nebo s výraznými velkými trny. V rámci tohoto pojetí by do skupiny „hladká ulita“ spadaly morfotypy ZCh a LL, do skupiny „malé trny“ by patřily morfotypy SoCh, NMVL a LCSFF a do skupiny „velké trny“ by patřil morfotyp SuCh. Skupiny takto stanovené by však odporovaly dendrogramu (obr. 16) a proto je důležité tvarové změny popisovat komplexněji.

O jednotlivých morfotypech lze z celkového pohledu na tvarové změny ulit říci, že nejvíce se konsenzuálnímu tvaru podobá morfotyp SoCh. Tvar ulity tohoto morfotypu vykazuje pouze malé rozšíření obústí v oblasti mezi landmarky L12, 15, 16 a 18 a rozšíření patrového návalku vnitřního pysku v oblasti obústí (L14, 16, 17, 18, 19, 20), což je viditelné i u morfotypu ZCh. Dále má morfotyp SoCh nepatrně kratší spirální část (L1, 5, 8).

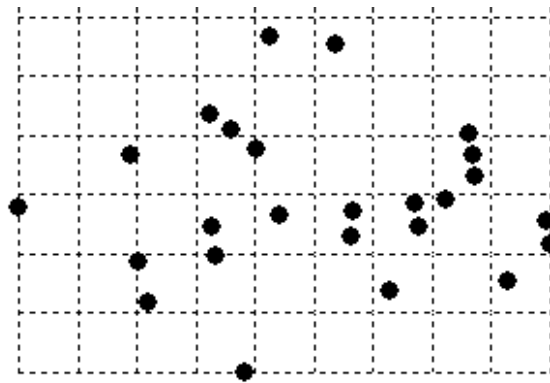
Dva morfotypy s hladkou ulitou se mezi sebou liší v tom, že morfotyp ZCh má kratší spirální část ulity (L1, 5, 8) než morfotyp LL. Morfotyp ZCh vykazuje oproti morfotypu LL i tvaru SoCh rozšíření bazální části ulity (L5, 8, 9, 10, 19, 20, 24) a má kratší obústí (L11, 12, 13, 20, 21, 22, 23). Tvar obústí je navíc u morfotypu LL oproti tvaru obústí morfotypu SoCh více zploštělý (L11, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23).

Morfotyp SuCh, jediný s velkými trny, má celkově ulitu nejširší. Projevuje se to jak v oblasti báze u spirální části (L8, 9, 12, 15), tak v obústí (L11, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23). Spirální část je oproti tvaru morfotypu SoCh zkrácena (L1, 5, 8) a bazální část v oblasti pístěle je výrazně protažena (L9, 10, 19, 20, 24).

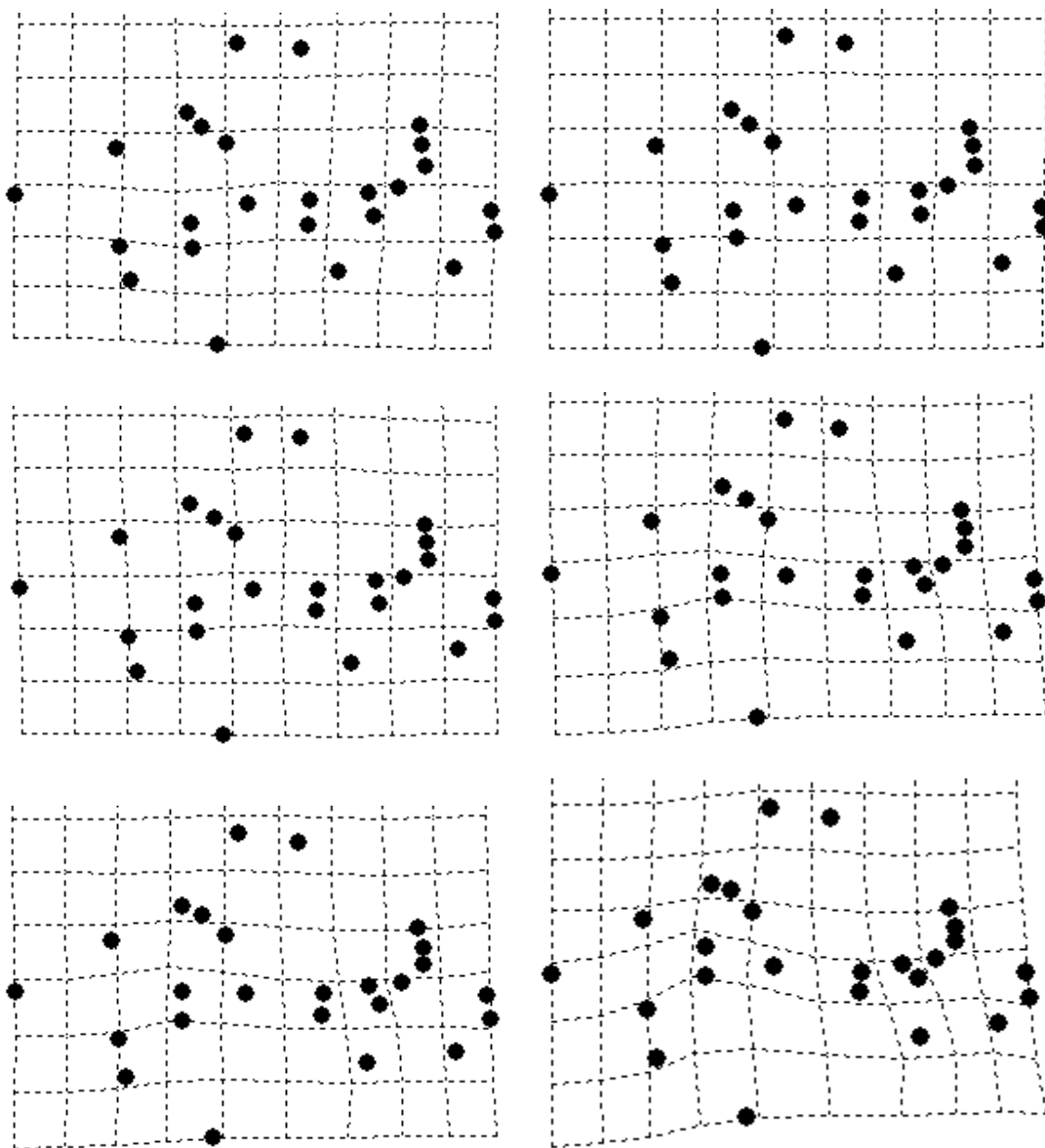
Poslední dva morfotypy, s malými trny, se odlišují mezi sebou i oproti morfotypu SoCh délkou spirální části (L1, 5, 8). Morfotyp NMVL má spirální část, stejně jako morfotyp LL z Řecka, prodlouženou a morfotyp LCSFF jí má krátkou, jakoby vnořenou (zapuštěnou do

bazální části). Odlišují se také šířkou obústí. Morfotyp NMVL má obústí v oblasti análního kanálku širší (L11, 12, 13, 16) a morfotyp LCSFF má obústí celkově užší oproti morfotypu SoCh (L11, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23). Společným znakem pro oba morfotypy je širší a kratší báze ulity v oblasti píštěle (L9, 10, 19, 20, 24). Při pohledu na obrázky (obr. 23., 30.), které ukazují tvar morfotypu LCSFF, je viditelný největší rozdíl ve tvaru ulity oproti morfotypu SoCh.

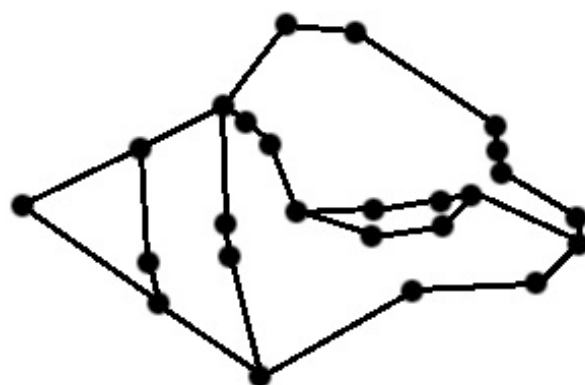




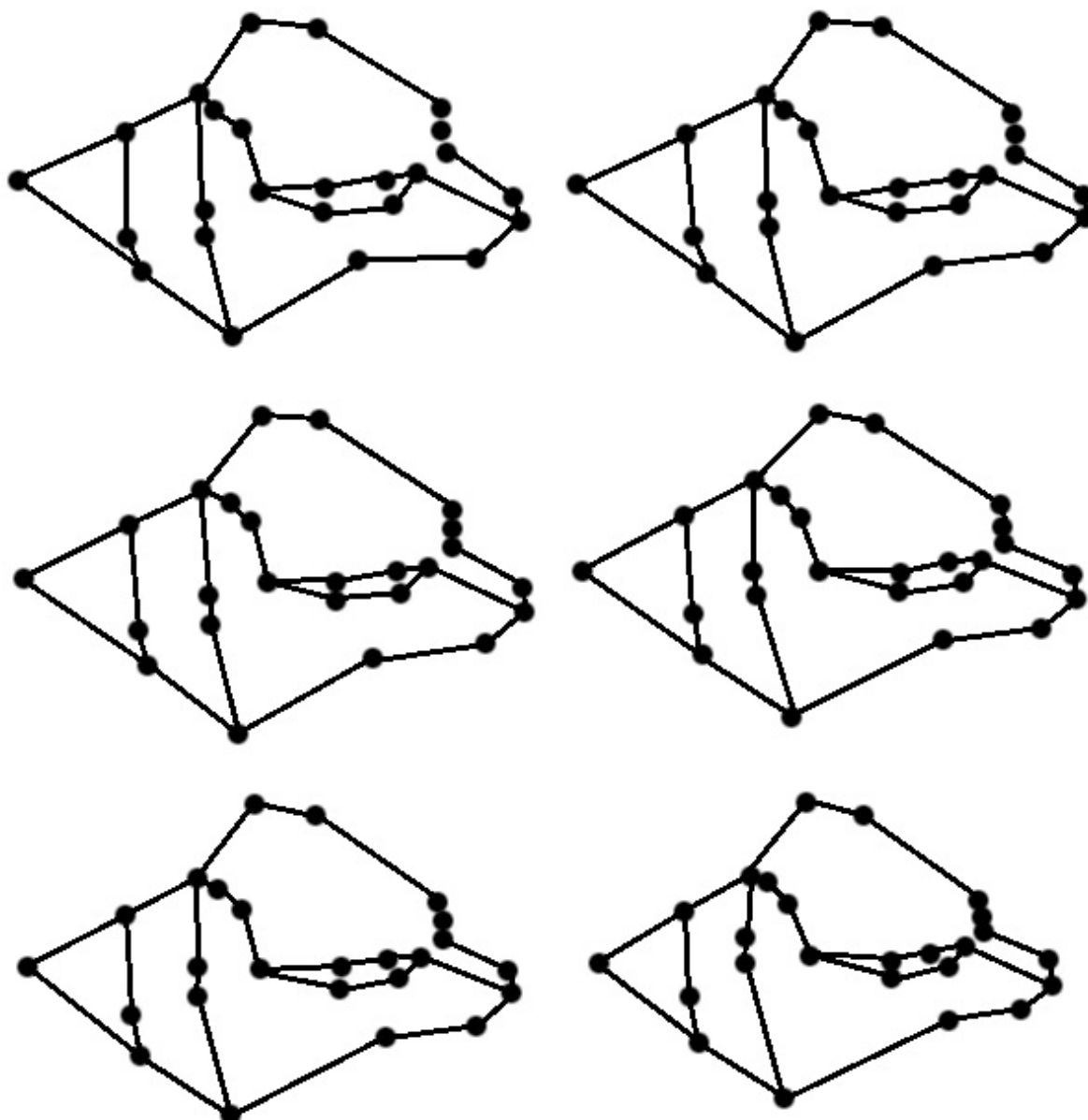
**Obr. 17.:** Konsenzuální tvar pro 464 jedinců druhu *H. trunculus* z devíti lokalit Středozemního moře s deformační sítí.



**Obr. 18. – 23.:** Průměrné tvary pro jednotlivé morfotypy (první řada vlevo ZCh, vpravo SoCh; druhá řada vlevo SuCh, vpravo LL; třetí řada vlevo NMVL, vpravo LCSFF) s deformační sítí.

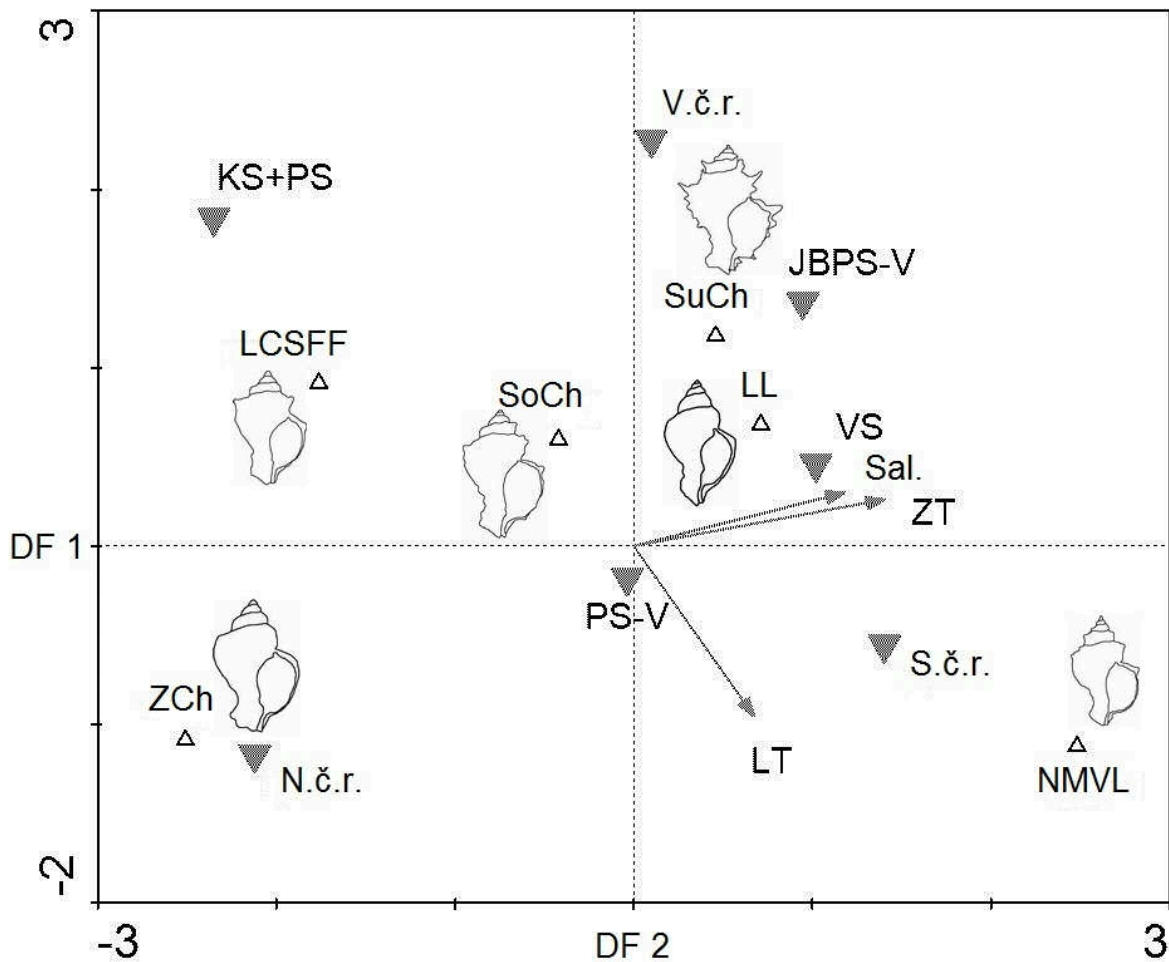


Obr. 24.: Konsenzuální tvar pro 464 jedinců druhu *H. trunculus* z devíti lokalit Středozemního moře.



Obr. 25. – 30.: Průměrné tvary pro jednotlivé morfotypy (první řada vlevo ZCh, vpravo SoCh; druhá řada vlevo SuCh, vpravo LL; třetí řada vlevo NMVL, vpravo LCSFF).

### 3.3. Vztah morfotypů k prostředí



**Obr. 31.:** Vztah morfotypů ulit plže *H. trunculus* k abiotickým faktorům, členitosti reliéfu dna a jeho struktuře v prostoru prvních dvou diskriminačních os (DF 1; DF 2) (Sal. – Salinita; ZT – Průměrné zimní teploty; LT – Průměrné letní teploty; V.č.r. – Vysoká členitost reliéfu; S.č.r. – Střední členitost reliéfu; N.č.r. – Nízká členitost reliéfu; VS – Vápencová skála; PS-V – Písčité sediment, vápenc; JBPS-V – Jemný bahnito-písčité sediment, vápenc; KS+PS – Křemencový slepenec + písčité sediment). Vytvořeno v programu Canoco (Braak & Šmilauer, 1998).

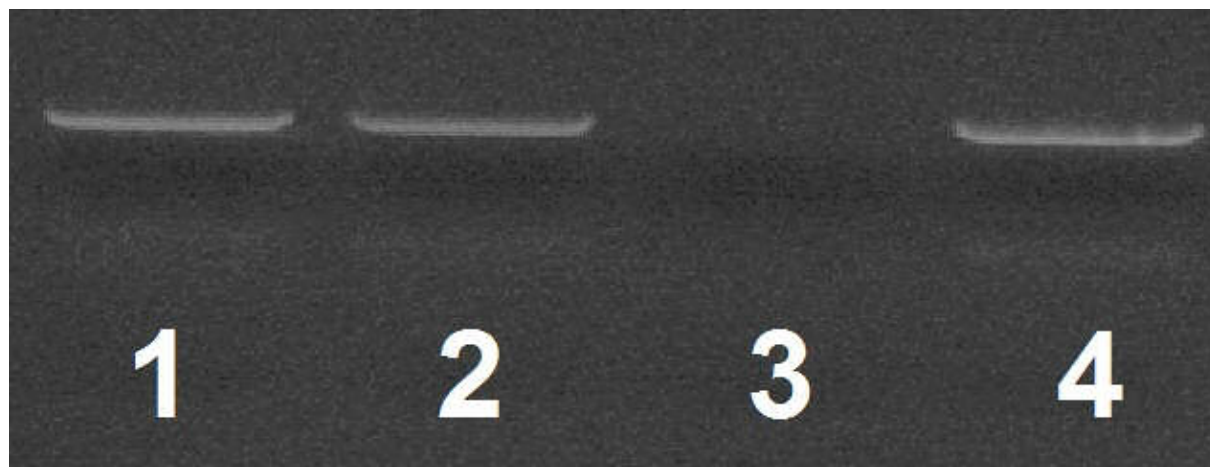
Vynesení abiotických faktorů, reliéfu dna a jeho geologické struktuře do prostoru prvních dvou diskriminačních os naznačilo jejich vztah k jednotlivým morfotypům (obr. 31.). První diskriminační osa koreluje se salinitou a zimní teplotou. Dále první diskriminační osa zřetelně oddělila morfotypy ZCh a LCSFF na jedné straně a NMVL na druhé. Podle první a druhé diskriminační osy je Typ dna „písčité sediment“ neprůkazný faktor, nemající vliv na tvarovou odlišnost jednotlivých morfotypů, ostatní typy dna jsou mírně korelovány s některými morfotypy. Druhá diskriminační osa oddělila morfotypy ZCh a NMVL od ostatních a

prokázala korelaci vysoké míry členitosti reliéfu k těmto čtyřem morfotypům, narozdíl od nízké členitosti spojené pouze s morfotypem ZCh a střední členitosti reliéfu spojené s morfotypem NMVL. Morfotyp SuCh s velkými trny nevyšel výrazně odlišný od jiných morfotypů, vyskytoval se na vápencové skále s písčítým sedimentem s vysoce členitým reliéfem.

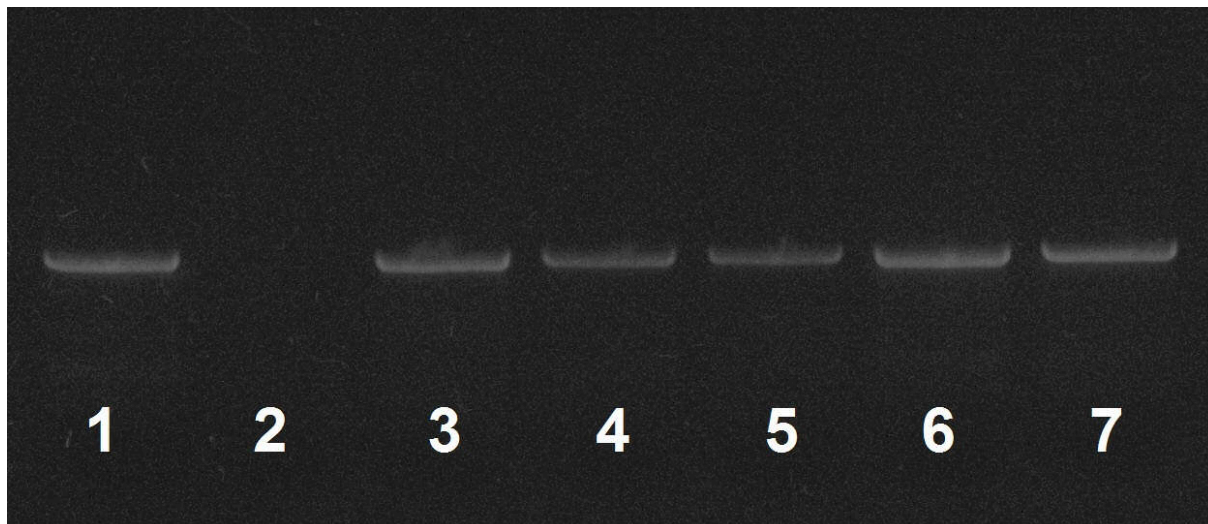
### 3.4. Molekulární analýza populací

Sekvenací části genu pro cytochrom c oxidázu podjednotku jedna (COI) o délce 683 bp nebyla zjištěna žádná genetická variabilita plže *Hexaplex trunculus*. Nebyla zjištěna jediná mutace pro šest populací, a to i v propojení mých dat s nukleotidovou sekvencí portugalské populace získanou z GenBank (ACA62688.1). Izolace DNA z plžů na chorvatské lokalitě Sumartin musela být opakována (obr. 32.; 33.).

```
AGATATTGGG ACCTTATATA TTCTATTTGG TATATGGTCA GGGCTTGTTG
GTACTGCTTT AAGTCTTCTT ATTCGAGCTG AATTAGGACA GCCTGGGGCT
TTACTAGGAG ACGATCAGTT ATATAATGTT ATTGTAAGT CACATGCCTT
TGTTATAATT TTCTTTTTAG TTATACCTAT AATGATTGGT GGATTTGGTA
ACTGGTTAGT GCCTCTTATA TTAGGAGCTC CAGATATGGC TTTTCCTCGA
TTAAATAATA TAAGATTTTG GTTACTTCCT CCATCGCTGC TTCTTTTACT
ATGTTCTGCT GCAGTAGAAA GGGGGTGGG AACTGGATGA ACAGTTTATC
CGCCTCTTTC TGGAAACCTG GCGCATGCTG GAGGATCTGT AGATTTAGCA
ATTTTTTCTT TGCATTTAGC TGGTGCTTCT TCCATTCTTG GTGCTGTGAA
TTTTATTACA ACTATCATT AATACGATG GCGAGGGATA CAATTTGAGC
GTGTACCTTT ATTTGTTTGA TCTGTTAAGA TTACGGCTAT TTTATTGCTT
TTATCTTTAC CTGTTTTAGC AGGGGCTATT ACTATACTAT TAACTGATCG
GAATTTTAAAT ACGGCGTTCT TTGATCCTGC AGGAGGTGGA GATCCTATTT
TATACCAGCA TCTGTTCTGA TTTTTTGGTC ACC
```



**Obr. 32.:** Horizontální gelová elektroforéza produktu PCR pro úsek COI plže *H. trunculus* (1 – Zambratija, Chorvatsko; 2 – Sovlje, Chorvatsko; 3 – nezdařená izolace pro lokalitu Sumartin, Chorvatsko; 4 – Lefkáda, Řecko – sloučeno v jednu populaci kvůli malé vzdálenosti lokalit).



**Obr. 33.:** Horizontální gelová elektroforéza produktu PCR (1-3 – La Ciotat, Francie; 4-6 Six Fours les Plages, Francie; 7 opakovaná zdařená izolace DNA pro lokalitu Sumartin, Chorvatsko).

### 3.5. Úroveň postižení

Z počtu zdravých samic a samic postižených imposexem na jednotlivých lokalitách (tab. 3.) byla vypočítána průměrná úroveň postižení pro každý stát. Hodnoty se pohybovaly mezi dvěma třetinami a třemi čtvrtinami, nejvyšší poškození a tím asi také znečištění mořské vody tributylcínem (TBT) jsme zjistili ve Francii. Lokalitou nejvíce zamořenou TBT je patrně chorvatská lokalita Sovlje, na které nebyla nalezena ani jedna zdravá samice. Všech 63 samic vykazovalo určitý stupeň maskulinizace (imposex). Naopak lokalita Lefkáda (Řecko) s odkalištěm odpadní vody vykazovala jen čtvrtinové poškození.

## 4. Diskuse

### 4.1. Rozdíly mezi populacemi a morfotypové určení

Geometricko-morfometrickými metodami bylo stanoveno šest morfotypů (ZCh, SoCh, SuCh, LL, NMVL, LCSFF) ulit plže *Hexaplex trunculus* v rámci sledovaných lokalit ve třech středozemních státech. Tvar ulit některých morfotypů vykazoval korelaci s charakterem biotopu (obr. 31.). Morfotypy ZCh a LCSFF se vyskytují v lokalitách s nižší salinitou a průměrnou zimní teplotou, naopak morfotyp NMVL v oblasti s vyššími hodnotami obou faktorů.

Další vlastnost lokality mající vliv na tvar ulit (morfotyp) je vysoká členitost reliéfu. Jedná se o biotopy s vysoce heterogenním prostředím. Jde o prostředí skalnatá často přerušovaná písčítými lavicemi a porosty posidoníí. Skalnaté prostředí samo o sobě je již dosti heterogenním prostředím se silnými stresujícími faktory a se širokým environmentálním rozmezím a s variabilními abiotickými faktory jako teplota, UV záření, salinita a vlnobítí (Menge & Branch, 2001 ex Hoffman et al., 2010). Nelze tedy jednoznačně stanovit, jaké nároky na abiotické vlastnosti prostředí mají morfotypy (SoCh; SuCh; LL; LCSFF) vyskytující se na členitých lokalitách (obr. 31.). Nároky také nelze stanovit přesně proto, že mnohým morfotypům odpovídá pouze jediná lokalita. Aby bylo možné přesně kategorizovat biotop pro určitý morfotyp, byla by zapotřebí rozsáhlejší studie v rámci Středozemního moře, kde by se opakovaně našli plži odpovídající již stanoveným morfotypům.

Při celkovém pohledu na tvar ulit všech šesti morfotypů můžeme spatřit obrovskou variabilitu tohoto druhu plže. Rozdíly jsou v přítomnosti či nepřítomnosti trnů na okrajových partiích ulit a také v relativní šířce a délce ulit. Při bližším pohledu se dají odhalit i méně výrazné rozdíly například ve tvaru obústí, bazální části ulity a tvaru spirály. Celkově mohu říci, že nejprůměrnější tvar vykazoval morfotyp SoCh, který má malé trny. Naproti tomu tvaru morfotypu SoCh je nejméně podobný francouzský morfotyp LCSFF, i když má ale také malé trny. Celkově jsou však jeho ulity robustnější v bazální části. Spirální část ulity je výrazně zapuštěna právě do bazální části a obústí ulity je celkově užší. Lokality obou morfotypů (SoCh a LCSFF) se podobají teplotou a salinitou, takže bychom mohli předpokládat i



podobnost ve tvaru ulit, ale liší se členitostí a podložím, což může mít vliv na zjištěný rozdíl mezi oběma morfotypy.

Tři řecké lokality obývané morfotypem NVML mají zároveň podobné vlastnosti prostředí a malou geografickou vzdálenost, takže nelze stanovit, kterým z těchto dvou faktorů je podobnost určena. Dvě francouzské lokality obývané společným morfotypem LCSFF mají dosti odlišný charakter podloží (viz tab. 2.), takže jejich podobnost lze přiřknout spíše malé geografické vzdálenosti. Jistá podobnost řeckého morfotypu LL ke dvojici chorvatských morfotypů SoCh a SuCh je překvapující, protože lokality leží relativně daleko od sebe a nesdílejí vlastnosti prostředí. Dva morfotypy, LL a ZCh se celkově od sebe liší, ale shodují se v jedné nápadné charakteristice – absenci trnů. Zároveň jsou to jediné dvě lokality s nízkou členitostí reliéfu.

Výsledky DFA jak pro jednotlivé lokality, tak pro morfotypy mohly být zkrusleny vzorky z lokality Sovlje. Na této lokalitě nebyla nalezena jediná zdravá samice. Moje bakalářská práce (Macík 2009) potvrdila jistý vliv imposexu na tvar ulit postižených jedinců. Ulity maskulinizovaných samic se více podobaly samcům než samicím, díky čemuž mohlo dojít k ovlivnění výsledků. Kdyby byly analyzovány zdravé samice, určitě by došlo k nepatrné změně tvaru tohoto morfotypu. Velký vliv této změny v tvaru ulity není pravděpodobný vzhledem k menší síle DFA (64%) pro oddělení jednotlivých kategorií pohlaví (samci, samice a imposex) než pro oddělení populací (Macík, 2009).

Geometrická morfometrie je použitelnou metodou pro hledání nových morfotypů druhu *H. trunculus*. Z hlediska tvarových změn lze jednotlivé stanovené morfotypy popsat. Nemohu však říci, že se určitý morfotyp vyznačuje velikostí nějaké struktury na ulitě od jiných. Pro další výzkum navrhuji numericky popsat jednotlivé morfotypy tak, aby bylo v budoucnu možné přiřazovat další jedince buď do stávajících morfotypů, anebo stanovit nové. Myslím si, že pro přesné určení jednotlivých morfotypů by bylo zapotřebí použít metodu tradiční morfometrie, tedy naměřit určité rozměry ulity a změny tvaru popsat pomocí průměrů těchto rozměrů. Navrhuji tedy měřit rozměry popisující jak celkový tvar (celková délka a šířka, délka a šířka bazální části ulity), tak menší struktury na ulitách (délka a šířka spirály, délka a šířka obústí, a to v oblastech u análního kanálku, uprostřed a u sifonálního kanálku, délku a šířku bazální části sousedící se spirální částí a délku a šířku bazální části sousedící s obústím,

tedy oblast u patrového návalku). Dále je vhodné stanovit přítomnost nebo nepřítomnost trnů a jiné kvalitativní vlastnosti.

#### 4.2. Genetická variabilita *H. trunculus*

V rámci devíti lokalit ve Středozemním moři (tři v Chorvatsku, čtyři na řeckém ostrově Lefkáda a dvě z jižního pobřeží Francie) nebyla zjištěna žádná genetická variabilita v úseku genu COI. Sekvence z našich lokalit byla shodná i s daty z portugalské lokality v Atlantiku (GenBank, přístupový kód ACA62688.1; Gonzáles-Tizón et al., 2008). Použitý gen COI je doporučený pro DNA barcoding (Hebert et al., 2003) na hledání genetické variability uvnitř druhů a je v molekulárně populačních analýzách v rámci kmene Mollusca hojně využíván jak samostatně (Cárdenas et al. 2009), tak v kombinaci s jinými geny (Gonzáles-Tizón et al., 2008) i přes svou nízkou nukleotidovou variabilitu  $\pi$  (Cárdenas et al. 2009). Mitochondriální DNA je použitelná na vyšetření genetické diverzity u mnoha bezobratlých živočichů (Boudry et al., 1998; Arnaud-Haord et al., 2003 ex Gonzáles-Tizón et al., 2008) (O'Foighil et al., 1998).

Ve chvíli, kdy chceme posuzovat genetickou variabilitu druhu, musíme vždy brát ohledy na všechny faktory uplatňující se v tomto směru dohromady (typ larvy, genový tok, životní strategie, reprodukce, velikost těla v dospělosti, kondice a další) (Wilke & Davis, 2000 ex Gonzáles-Tizón et al., 2008). Absence nukleotidové variability v COI mohla být způsobena několika důvody. Prvním je fakt, že druh *H. trunculus* nedisponuje pelagickou larvou. Jeho vývoj je přímý „kapsulární“ – vytváří kokony (Vasconcelos et al., 2004) a z vajíček se líhnou malé lezoucí plži. Nízká genetická variabilita může být u tohoto druhu způsobena právě tímto jevem (Grant & da Silva-Tatley, 1997; Foltz, 2003), protože klíčem k pochopení populační struktury je často mobilita druhu a jeho larvárních stádií (pokud existují). Některé druhy nemají možnost rozšiřovat se za pomoci pelagické dlouhožijící vysoce disperzibilní larvy (Thorpe et al., 2000 ex Gonzáles-Tizón et al., 2008). Nižší mobilita jedinců má za následek nižší genový tok mezi populacemi a tím snižuje genetickou variabilitu jednotlivých populací (Foltz, 2003). Naproti tomu pelagická larva zvyšuje mobilitu jedinců a tím i míru genového toku mezi populacemi, přičemž výsledkem je vysoká nukleotidová i haplotypová variabilita jednotlivých populací (Katsares et al., 2008).

Dalším důvodem pro nízkou genetickou variabilitu druhu může být velikost areálu rozšíření. Jak veliký by však musel být areál rozšíření druhu, abychom při molekulární analýze našli dostatečnou genetickou variabilitu? Odpovědí může být již v úvodu zmíněná studie na druhu *Pinna nobilis* ve východní části Středozemního moře, která vykazovala vysokou úroveň jak

nukleotidové, tak haplotypové variability pro COI gen (Katsares et al., 2008). Z toho vyplývá, že areál rozšíření plže *H. trunculus*, tedy Středozemní moře a přilehlá část Atlantiku, je dosti velký.

Pokud chceme vysvětlit nízkou genetickou variabilitu druhu *H. trunculus*, měli bychom zvážit historii druhu, jeho migraci z Atlantiku nebo jeho vznik ve Středozemním moři. S největší pravděpodobností *H. trunculus* ve Středozemním moři nevznikl, protože je známo, že největší množství druhů živočichů žijících ve Středozemním moři pochází z Atlantického oceánu (Bianchi & Morri, 2000; Boudouresque, 2004). Je to ještě pravděpodobnější u druhu, jehož areál rozšíření zahrnuje i nejbližší část Atlantiku. Pokud by ale došlo ke vzniku druhu *H. trunculus* ve Středozemním moři, muselo k tomu dojít maximálně před 5,5 milióny (přechod Miocénu v Pliocén) let. Tato doba souvisí s protržením Gibraltarské „přeřady“ a zaplavením oblasti Středomoří a tedy vůbec se vznikem Středozemního moře tak, jak ho známe dnes s charakterem moře mírného pásu (Bianchi & Morri, 2000; Mojetta, 2005). I díky této události se domnívám, že správnost tvrzení o rozšíření druhu *H. trunculus* do Středozemního moře z Atlantiku je na místě.

Pokud *H. trunculus* existoval ještě před vznikem Středozemního moře, celková genetická variabilita druhu by měla být vysoká. Intraspecifická genetická uniformita pro COI proto naznačuje, že středozemní populace jsou pouze malou a mladou částí druhu, protože gen pro COI vykazuje vysokou mutační rychlost. Pokud tedy došlo k předpokládanému rozšíření z Atlantiku, muselo při tom dojít, při pohledu na genetickou uniformitu COI, k „bottleneck efektu“ (BNE), který by byl původcem snížení početnosti nově vzniklé populace a „genetického poolu“ (GP), a tedy nově vzniklá populace *H. trunculus* by byla značně ochuzena o genetickou variabilitu (González-Tizón et al., 2008). To znamená, že by se i přes vysokou mutační rychlost COI genetická variabilita mezi populacemi nemusela projevit, ale zároveň by muselo k prvotní migraci dojít mnohem později než před pěti miliony let. V případě studie z Portugalské Ria Formosa lagoon její autoři zmiňují právě BNE jako jeden z hlavních důvodů nízké genetické variability *H. trunculus* (González-Tizón et al., 2008). Jelikož se jedná o téměř okrajovou lokalitu areálu rozšíření druhu *H. trunculus* (Brown et al., 1996 ex González-Tizón et al., 2008), mohlo zde k BNE a tedy ke snížení GP dojít a to z důvodu méně příznivých podmínek pro život tohoto druhu. Ideální podmínky pro život *H. trunculus* jsou v jeho centru rozšíření, tedy ve Středozemním moři (González-Tizón et al., 2008). Vliv na nízkou genetickou variabilitu druhu *H. trunculus* může mít i „genetický drift“

(GD) (González-Tizón et al., 2008), který se uplatňuje společně s BNE ve chvíli, kdy dochází ke kolonizaci nově vzniklého území jedinci z velké populace. BNE způsobí ochuzení genofondu populace a GD ho zafixuje (zakonzervuje). GD se zde může uplatnit, protože se při prvotní migraci jedná o malou populaci a z hlediska délky existence Středozemního moře jde o populaci dlouhodobou. Problémem však může být překryvnost generací druhu *H. trunculus*.

Antropogenní vlivy jsou dalším možným vysvětlením snížené genetické variability druhu *H. trunculus*. Ať už mluvíme o nekontrolovaném odlovu jedinců z gastronomických důvodů (González-Tizón et al., 2008) nebo znečišťování moře tributylcínem, jde vždy o zásah do populační dynamiky druhu (Axiak et al., 1995). Tím se snižuje početnost populace a její genetický fond. Imposex způsobený molekulami TBT může v nejhorší možné míře způsobit sterilitu populace a tedy její vymření, což se stalo na některých lokalitách v Portugalsku druhu *Nucella lapillus* (Barroso & Moreira, 2002). Stres vlivem znečištění moře (vznik imposexu) může být o to horší pro druhy s nižší mobilitou, například pro druh *H. trunculus* (González-Tizón et al., 2008).

Pravděpodobnost použití nesprávného genetického markeru pro hledání genetické variability druhu *H. trunculus* není vyloučena. Mitochondriální COI gen je často používán v kombinaci s jinými mitochondriálními i jadernými markery (González-Tizón et al., 2008). Existují i studie využívající COI samostatně pro hledání mezipopulační genetické variability (Cárdenas et al. 2009; Duda et al., 2009b). V mnoha případech nízká genetická variabilita mitochondriální DNA koreluje s nízkou genetickou variabilitou jaderné DNA (Moritz, 1994 ex González-Tizón et al., 2008). Zatímco mitochondriální gen pro NADH5 u komára *Aedes albopictus* podél Jadranského pobřeží nevykazoval žádnou variabilitu, COI byla reprezentována čtyřmi haplotypy (Žitko et al., 2011). Navíc je možné, že druh *H. trunculus* osídlil Středozemní moře teprve nedávno, což by znamenalo, že COI gen neměl dostatečně dlouhou dobu na mutace a proto by analýzou tohoto genu genetická variabilita mezi populacemi nebyla zjištěna. O tomto problému diskutují odpůrci využití COI pro DNA barcoding u druhů, které nedávno vznikly (Kerr et al., 2006).

U dostatečně starých druhů je variabilita COI velká a umožňující odlišení i poměrně málo geograficky vzdálených populací. Žížala *Aporrectodea trapezoides* – málo pohyblivý živočich jako plž *H. trunculus* – má dokonce 153 polymorfních míst na úseku COI pouze 456

bazí dlouhém (Fernández et al., 2011), z toho velká část haplotypů žije v rámci Španělska. Sumka *Styela plicata* má v rámci Španělského pobřeží Středoziemního moře čtyři haplotypy COI vzdálené až tři nukleotidy z úseku 624 bazí dlouhého. Tato sumka má sice plovoucí ale krátce žijící larvu a její rozšíření po světě je antropogenního původu (Pineda et al., 2011). Na druhé straně houba mycí (*Spongia officinalis*) měla jediný shodný haplotyp COI v rámci Egejského moře a pobřeží Provence. Populace z Gibraltaru se od těchto populací lišila ve 20 pozicích (Dailanis et al., 2011).

Informace o genetické variabilitě je v mé práci založená jen na analýze jednoho genu. Pro budoucí výzkum navrhuji využít více genetických markerů nebo například mikrosatelity, což by však bylo finančně mnohem náročnější a v mém případě z tohoto důvodu nedostupné.

### 4.3. Znečištění Středozemního moře a dodržování legislativy

V rámci Středozemního moře, respektive na lokalitách, na kterých jsem sbíral vzorky (tři lokality v Chorvatsku, čtyři na řeckém ostrově Lefkáda a dvě v jižní Francii) bylo zjištěno silné poškození ostranek *H. trunculus* jevem imposex, ukazující na možné znečištění moře tributylcínem (TBT). Tato látka, uvolňující se z antikoročních nátěrových hmot používaných na lodě, přístavní ocelová mola a rybí sádky, způsobuje u plže *H. trunculus* i jiných plžů z podtřídy Prosobranchiata růstové anomálie známé jako fenomén imposex (Smith, 1971). Vliv této zakázané látky byl zjištěn i u jiných bezobratlých a dokonce i u obratlovců. Díky své citlivosti na TBT se stal *H. trunculus* bioindikátorem znečištění Středozemního moře touto látkou (Terlizzi et al., 1999; Ramón & Amor, 2001).

Naše zjištění poukazují na nedodržování celosvětové směrnice (EU 1. července 2003; regulační číslo (CE) 782/2003) o zákazu používání antikoročních nátěrových hmot s obsahem TBT pro lodě menší 25 metrů (Garaventa et al., 2006). Nejhůře dopadla Francie se sedmdesáti pěti procentním poškozením ve smyslu poměru postižených samic ze všech nasbíraných v daném státě. Nemohu ale říci, zda došlo ke zvýšení či snížení koncentrace TBT v mořské vodě, neboť jsem vodu z lokalit sběru neanalyzoval a též z dané lokality nemám data zpětné kontroly. Tím však nechci říci, že koncentrace TBT ve vodách Středozemního moře je v normě či dokonce v pořádku. Výsledky mohly být značně zkreslující, protože na lokalitách ve Francii bylo sesbíráno nejméně samic (12). Co se týká úrovně znečištění na jednotlivých lokalitách, nejhůře dopadla chorvatská lokalita Sovlje, kde byly všechny samice maskulinizovány vlivem TBT (imposex). Stoprocentní postižení samic na této lokalitě je pravděpodobně důsledkem existence přístavu pro malá plavidla a doku pro opravy těchto lodí v této lokalitě. Jak již bylo zmíněno v úvodu, oblasti s přístavy pro malá plavidla vykazují vyšší stupeň znečištění mořské vody molekulami TBT než velké přístavy (Santos et al., 2002). Myslím si, že by se měla zlepšit kontrola dodržování legislativy a to pravidelným monitoringem bioindikátorového druhu *H. trunculus* pro Středozemní moře a jinými pro jiné oblasti, pokud jsou již stanoveny. Při zhoršení stavu oproti minulé kontrole by mělo dojít k postihu daného státu.

Jak již bylo řečeno, TBT má vliv na populační dynamiku druhu *H. trunculus* (Axiak et al., 1995). Tento druh plže, ale i jiné druhy, je každodenně vystaven tomuto znečištění, které nemusí mít následky na populaci v nejbližším roce, ale z dlouhodobého hlediska by to pro

tento druh mohlo být kritické. O to více, že se jedná o vysoce citlivého živočicha vnímajícího i nepatrná množství (0,1 ng Sn/l) této látky (Gibbs, 1999). Doposud nebyl u druhu *H. trunculus* prokázán Dumptonův syndrom, který by svým působením na koncentraci testosteronu v těle živočichů zabraňoval vzniku imposexu. Na druhou stranu tato genetická mutace by také mohla mít vliv na populační dynamiku populace, protože inhibicí testosteronu u samců dochází k jejich demaskulinizaci. O to horší dopad na populaci by Dumptonův syndrom mohl mít, když ostranka *H. trunculus* vykazuje přirozené vychýlení poměru pohlaví ve prospěch samic (Fretter & Graham, 1994).



## 5. Závěr

464 jedinců druhu *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) z deseti lokalit Středozemního moře jsem studoval pomocí geometrické morfometrie a genetické analýzy.

- Geometricko–morfometrickými postupy a následnou diskriminační analýzou (DFA) jsem stanovil tvarové rozdíly ulit na jednotlivých lokalitách sběru.
- Z výsledků geometricko-morfometrické analýzy jsem určil šest morfotypů (Zambratija – Chorvatsko = ZCh; Sovlje – Chorvatsko = SoCh; Sumartin – Chorvatsko = SuCh; Lefkáda – Lefkáda = LL; Nikiana+Meganisi+Vasiliky – Lefkáda = NMVL; La Ciotat+Six Fours les Plages – Francie = LCSFF).
- Společná analýza morfotypů a vlastností prostředí v daných lokalitách neukazuje dostatečně jasné vazby určitého tvaru ulity na určité podmínky.
- Pomocí molekulární analýzy cytochrom c oxidázy podjednotky 1 (COI) jsem nenalezl genetickou variabilitu v rámci studovaných lokalit na úseku 683 bp. Nelze vyloučit, že na tvaru ulit se podílejí jiné, ještě variabilnější geny, ale za pravděpodobnější považujeme vliv prostředí.
- Úroveň postižení (imposex) jedinců z Chorvatska, Řecka, Francie byla dosti značná (čtvrtina až 100 % samic z lokality). Plži jsou pravděpodobně vystaveni antropogennímu vlivu – znečištění moře TBT pocházejícím z antikoročních nátěrových hmot používaných v námořní dopravě.

## 6. Použitá literatura

**ABBOTT R.T.** (1989): Compendium of land shells (A color guide to more than 2000 of the world's terrestrial shells). American Malacologists, inc. – Melbourne, Florida: 108-120.

**ABBOTT R.T., DANCE S.P.** (1986): Compendium of sea shells (A color guide to more than 4200 of the world's marine shells). American Malacologists, inc. – Melbourne, Florida: 129-152.

**ABIDLI S., LAHBIB Y., EL MENIF M.T.** (2009): Imposex and genital tract malformations in *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* collected in the Gulf of Tunis. Bulletin of Marine Science 85: 11-25.

**ALZIEU C.** (1991): Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. Marine Environmental Research 32: 7-17.

**ALZIEU C.** (1986): The detrimental effects on oyster culture in France-Evolution since antifouling paint regulation. In: Proceedings of the Organotin Symposium of the Oceans 86 Conference 1130-1134.

**ARANZAMENDI M.C., MARTÍNEZ J.J., SAHADE R.** (2010): Shape differentiation and characterization in the two morphotypes of the Antarctic limpet *Nacella concinna* using Elliptic Fourier analysis of shells. Polar. Biol. 33: 1163–1170.

**\*ARNAUD-HAOND S., BONLOMME F., BLANC F.** (2003): Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. J. Evol. Biol. 16: 388-398.

**AXIAK V., MICALLEF D., MUSCAT J., VELLA A., MINTOFF B.** (2003): Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. Environment International 28: 743-749.

**AXIAK V., VELLA A.J., MICALLEFF D., CHIRCOP P., MINTOFF B.** (1995): Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. Marine Biology 121: 685-691.

**BARCO A., CLAREMONT M., REID D.G., HOUART R., BOUCHET P., WILLIAMS S.T., CRUAUD C., COULOUX A., OLIVERIO M.** (2010): A molecular phylogenetic framework for the Muricidae, a diverse family of carnivorous gastropod. Molecular Phylogenetics and Evolution 56: 1025-1039.

**BARROSO C.M., MOREIRA M.H.** (2002): Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese coast: inefficacy of the EEC directive 89/677. Marine Pollution Bulletin 44: 480-486.

- BECH M.** (2002): A survey of imposex in muricids from 1996 to 2000 and identification of optimal indicators of tributyltin contamination along the east coast of Phuket Island, Thailand. *Marine Pollution Bulletin* 44: 887-896.
- BECH M.** (1999): Increasing levels of Tributyltin-induced Imposex in Muricid Gastropods at Phuket Island, Thailand. *Applied Organometallic Chemistry* 13: 799-804.
- BECH M.** (1999): Sensitivity of different muricid gastropods to tributyltin contamination. Phuket. *Phuket Marine Biological Center Special Publication* 19: 151-156.
- BIANCHI C.N., MORRI C.** (2000): Marine biodiversity of the Mediterranean sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin* 40: 367-376.
- BOOKSTEIN F.L.** (1996): Combining the tools of geometric morphometrics. In: Marcus L. F., Corti M., Loy A., Naylor G. J. P. et Slice D. E. (eds.): *Advances in Morphometrics*. Plenum Press, New York: 131-151.
- BOOKSTEIN F.L.** (1991): *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge Univ. Press: Cambridge.
- BOUDOURESQUE CH.F.** (2004): Marine biodiversity in the Mediterranean: statut of species, species, populations and communities. *Travaux Scientifiques du Parc National de Port-Cros* 20: 97-146.
- \*BOUDRY P., HEUTEBISE S., COLLET B., COMETTE F., GÉRARD A.** (1998): Genetic differentiation between Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) populations, as revealed by RFLP analyses of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98: 279-291.
- BOWTELL D.L.L.** (1987): Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Analytical Biochemistry* 162: 463.
- \*BROWN J.H., STEVENS G.C., KAUFMAN D.M.** (1996): The geographic range: size, shape, boundaries and internal structure. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 597-623.
- BRYAN G.W., GIBBS P.E., HUGGETT R.J., CURTIS L.A, BAILEY D.S., DAUER D.M.** (1989): Effects of tributyltin pollution on the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*, from the York River and Sarah Creek, Chesapeake Bay. *Marine Pollution Bulletin* 20: 458-462.
- BRYAN G., GIBBS P.E., HUMMERSTONE L.G., BURT G.R.** (1986): The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around southwest England: evidence for the effect of TBT from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 66: 611-640.
- CÁRDENAS L., CASTILLA J.C., VIARD F.** (2009): A phylogenetic analysis across three biogeographical provinces of the south eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *Journal of Biogeography* 36: 969-981.
- CARDINI A., ELTON S.** (2007): Sample size and sampling error in geometric morphometric studies of size and shape. *Zoomorphology* 126: 121-134.

- \*CEFIC (1994):** Use of triorganotin compounds in anti-fouling paints. Results of TBT monitoring studies. Paper submitted to International Maritime Organisation Marine Environment Protection Committee 35: 17.
- CLAISSE D., ALZIEU C. (1993):** Copper contamination as a result of antifouling paint regulation? *Marine Pollution Bulletin* 26: 395-397.
- \*CLEARY J.J. (1991):** Organotin in marine surface microlayer and subsurface waters of southwest England: relation to toxicity thresholds and the UK environmental quality standard. *Marine Environmental Research* 32: 65-73.
- CLOSE H.T. (2000):** The *Liguus* tree snails of south Florida. University press of Florida – Gainesville, Florida: (3). 27-39.
- CONDE-PADIN P., GRAHAME J.W., ROLAN-ALVAREZ E. (2007):** Detecting shape differences in species of the *Littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies* 73: 147-154.
- DAILIANIS T., TSIGENOPOULOS C.S., DOUNAS C., VOULTSIADOU E. (2011):** Genetic diversity of the imperilled bath sponge *Spongia officinalis* Linnaeu, 1759 across the Mediterranean Sea: patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation. *Molecular Ecology* 20: 3757-3772.
- \*DOWSON P.H., BUBB J.M., LESTER J.N. (1993):** Temporal distribution of organotins in the aquatic environment: five years after the UK retail ban on TBT based antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 26: 487-494.
- DUDA J.T.F., LESSIOS H.A. (2009):** Connectivity of populations within and between major biogeographic regions of the tropical Pacific in *Conus ebraeus*, a widespread marine gastropod. *Coral Reefs* 28: 651-659.
- DUDA J.T.F., LEE T. (2009b):** Isolation and population divergence of a widespread Indo-West Pacific marine gastropod at Easter Island. *Marine Biology* 156: 1193-1202.
- EL HAMDANI A., FERRER J.M., GARCÍA CARRASCOSA A.M. (1998):** Imposex in prosobranch molluscs: an indicator of TBT pollution in the Valencian coast (Spain, Western Mediterranean). *Cuadernos de Investigación Biológica* 20: 275-278.
- EL MENIF N.T., LAHBIB Y., RAMDANI M., BOUMAIZA M., LE PENNEC M. (2007):** Imposex in the marine neogastropod *Hexaplex trunculus* from Tunisian coasts: Geographical distribution and development intensity. *Life and Environment* 57: 33-38.
- EVANS S.M., EVANS P.M., LEKSONO T. (1996):** Widespread recovery of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in M. Bech / *Marine Pollution Bulletin* 44 (2002) 887-896 895 the North Sea and Clyde Sea. *Marine Pollution Bulletin* 32: 263-269.
- EVANS S.M., LEKSONO T., MCKINNELL P.D. (1995):** Tributyltin pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT – based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 30: 14-21.

- FÉRAL C., LEGALL S.** (1983): The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. Molluscan neuro-endocrinology. North Holland Publ Co, Amsterdam: 173–175.
- FERNANDEZ R., ALMODOVAR A., NOVO M., GUTIERREZ M., COSIN D.J.D.** (2011): A vagrant clone in a peregrine species: Phylogeography, high clonal diversity and geographical distribution in the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Duges, 1828). Soil Biology & Biochemistry 43: 2085-2093.
- FOLMER O., BLACH M., LUTZ R., VRIJENHOEK R.** (1994): DNA primers for amplifications of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mar. Biol. Biotech. 3: 294-299.
- FOLTZ D.W.** (2003): Invertebrate species with nonpelagic larvae have elevated levels of nonsynonymous substitutions and reduced nucleotide diversities. J. Mol. Evol. 57: 607-612.
- FRETTER V., GRAHAM A.** (1994): British Prosobranch Gastropods. Their functional anatomy and ecology. London: The Ray Society.
- GARAVENTA F., PELLIZZATO F., FAIMALI M., TERLIZZI A., MEDAKOVIC D., GERACI S., PAVONI B.** (2006): Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. Hydrobiologia 555: 281-287.
- GIBBS P.E.** (2005): Male genital defect (Dumpton Syndrome) in the dogwhelk *Nucella lapillus* (Neogastropoda): Mendelian inheritance inferred, based on laboratory breeding experiments. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 85: 143-150.
- GIBBS P.E.** (1999): Biological effects of contaminants: use of imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a bioindicator of tributyltin pollution. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences 24: 1-29.
- GIBBS P.E.** (1993): A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda) favouring the survival of a population in a TBT-affected area: Journal of the Marine Biological Association UK 73: 667-678.
- GIBBS P.E., BRYAN G.W., PASCOE P.L.** (1991): TBT-induced imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*: Geographical uniformity of the response and effects. Marine environmental research 32: 79-87.
- GIBBS P.E., PASCOE P.L., BURT G.R.** (1988): Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association UK 68: 715-731.
- GIBBS P.E., BRYAN G.W., PASCOE P.L., BURT G.R.** (1987): The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination: Journal of the Marine Biological Association UK 67: 507-523.

- GIBBS P.E., BRYAN G.W.** (1986): Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints: Journal of the Marine Biological Association UK 66: 767-777.
- GNU IMAGE MANIPULATION PROGRAM** (2008): GIMP (software for photo retouching, image composition and image authoring), version 2.4.7.: [www.gimp.org](http://www.gimp.org).
- GONZÁLES-TIZÓN A.M., FERNANDEZ-MORENO M., VASCONCELOS P., GASPAR M.B., MARTÍNEZ-LAGE A.** (2008): Genetic diversity in fishery-exploited populations of the banded murex (*Hexaplex trunculus*) from the southern Iberian Peninsula. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 363: 35-41.
- GONZÁLEZ-WEVAR C.A., DAVID B., POULIN E.** (2001): Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. Deep-Sea Research II 58: 220-229.
- GÓMEZ A.-ROBLES, MARTINÓN M.-TORRES, BERMÚDEZ DE CASTRO J.M., MARGVELASHVILI A., BASTIR M., ARSUAGA J.L., PÉREZ A.-PÉREZ, ESTEBARANZ F., MARTÍNEZ L.M.** (2007): A geometric morphometric analysis of hominin upper first molar shape. Journal of Human Evolution 53: 272-285.
- GRANT W.S., DA SILVA-TATLEY F.M.** (1997): Lack of genetically-subdivided population structure in *Bullia digitalis*, a southern African marine gastropod with lecithotrophic development. Mar. Biol. 129: 123-137.
- GRAVEL P., JOHANNING K., VARGA J.A., OBERDORSTER E.** (2006): Imposex in the intertidal snail *Thais brevidentata* (Gastropoda: Muricidae) from the Pacific coast of Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 54: 21-26.
- HALL T.A.** (1999): BioEdit: a use – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- HANNAFORD-ELLIS C.J.** (1978): *Littorina arcana* sp. Nov.: a new species of wrinkle (Gastropoda: Prosobranchia: Littorinidae).
- HANNAH H.N., CORNELI P.S., WATKINS M., OLIVERA B., BANDYOPADHYAY P.** (2009): Multiple genes elucidate the evolution of venomous snail-hunting *Conus* species. Molecular Phylogenetics and Evolution 53: 645-652.
- HEBERT P.D.N., CYWINSKA A., BALL S.L., WAARD J.R.** (2003): Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270: 313-321.
- HOLOMUZKI J.R., BIGGS B.J.F.** (2006): Habitat-species variation and performance trade-offs in shell armature of New Zealand mudsnails. Ecology 87: 1038-1047.
- HORIGUCHI T., SHIRAISHI H., SHIMIZU M., MORITA M.** (1994): Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan: Journal of Marine Biological Association United Kingdom 74: 651-669.

- \*HOUART R.** (2001): A review of the recent Mediterranean and northeastern Atlantic species of Muricidae. Ed Evolver, Rome.
- CHEN A.H., LI Z.X., FENG G.N.** (2009): Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences. *Zoological Research* 30: 233-239.
- CHIAVARINI S., MASSANISSO P., NICOLAI P., NOBILI C., MORABITO R.** (2003): Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere* 50: 311-319.
- IGUCHI A., TAKAI S., UENO M., MAEDA T., MINAMI T., HAYASHI I.** (2007): Comparative analysis on the genetic population structures of the deep-sea whelks *Buccinum tsubai* and *Neptunea constricta* in the Sea of Japan. *Marine Biology* 151: 31-39.
- JENNER M.G.** (1979): Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Neogastropoda). *Science* 205: 1407-1409.
- KANAYAMA T., KOBAYASHI N., MAMIYA S., NAKANISHI T., NISHIKAWA J.** (2005): Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome activated receptor (PPAR)c/retinoid X receptor (RXR) pathway. *Mol. Pharmacol.* 67: 766-774.
- KANNAN K., CORSOLINI S., FOCARDI S., TANABE S., TATSUKAWA R.** (1996): Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian costal Waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 19-23.
- KATSARES V., TSIORA A., GALINOUMITSOU S., IMSIRIDOU A.** (2008): Genetic structure of the endangered species *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) inferred from mt DNA sequences. *Biologia* 63: 412-417.
- \*KERR K.C.R., STOECKLE M.Y., DOVE C.J., WEIGT L.A., FRANCIS CH.M., HEBERT P.D.N.** (2006): Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*.
- KO M.M.C., BRADLEY G.C., NELLER A.H., BROOM M.J.** (1995): Tributyltin contamination of marine sediments of Hong Kong: *Marine Pollution Bulletin* 31: 249-253.
- KÖHLER F., DEEIN G.** (2010): Hybridisation as potential source of incongruence in the morphological and mitochondrial diversity of a Thai freshwater gastropod (Pachychilidae, Brotia H. Adams, 1866). *Zoosyst. Evol.* 86: 301-314.
- KOCH H.** (2010): Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* (Moure, 1961). *African Invertebrates* 51: 413-421.

- KRESS W.J., WURDACK K.J., ZIMMER E.A., WEIGT L.A., JANZEN D.H.** (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8369-8374.
- LATIOLAS J.M., TAYLOR M.S., ROY K., HELLBERG M.E.** (2006): A molecular phylogenetic analysis of strombid gastropod morphological diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 436-444.
- MACÍK J.** (2009): Geometricko – morfometrická studie ulit plže *Hexaplex trunculus* z chorvatského pobřeží Jaderského moře. Bakalářská práce, Přf.JU, České Budějovice: pp. 47.
- MARÍA-CERVANTES A., JIMÉNEZ-CÁRCELES F.J., ÁLVAREZ-ROGEL J.** (2009): As, Cd, Cu, Mn, Pb and Zn contents in sediments and Mollusks (*Hexaplex trunculus* and *Tapes decussatus*) from coastal zones of a Mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain) affected by mining wastes. *Water Air Soil Pollut* 200: 289-304.
- MARTOJA M., BOUQUEGNEAU J.M.** (1988): *Murex trunculus*: un nouveau cas de pseudo-hermaphrodisme chez un gastéropode prosobranch. *Bulletin de la Société Royale de Liège* 57: 45-58.
- MATTHIESSEN P., GIBBS P.E.** (1998): Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 37-43.
- \*MENGE B.A., BRANCH G.M.** (2001): Rocky intertidal communities. In: Bertness M.D., Gaines S.D., Hay M.E. (eds) *Marine Community Ecology*, Sineuer Associates, Sunderland: pp. 221-251.
- MOJETTA A.** (2005): Průvodce podmořským světem, Středozemní moře. Svojtka & Co., s.r.o.: Praha 3.
- \*MORITZ C.** (1994): Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol. Ecol.* 3: 401-411.
- NISHIKAWA JUN-ICHI** (2006): Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Marine Biology* 149: 117-124.
- NISHIKAWA J., MAMIYA S., KANAYAMA T.** (2004): Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ. Sci. Technol.* 38: 6271–6276.
- O'FOIGHIL D., GAFFNEY P.M., WILBUR A.E., HILBISCH T.J.** (1998): Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.* 131: 497-503.
- OBERDÖRSTER E., MCCLELLAN-GREEN P.** (2002) Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar. Environ. Res.* 54: 715–718.



- OBERDÖRSTER E., MCCLELLAN-GREEN P.** (2000) The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21: 1323–1330.
- PARKINSON B., HEMMEN J., GROH K.** (1987): Tropical land shells of the world. Verlag Christa Hemmen – Wiesbaden, West Germany: 110-123.
- PELLIZZATO F., CENTANNI E., MARIN M.G., MOSCHINO V., PAVONI B.** (2004): Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. *Science of the total Environment* 332: 89-100.
- \*PILSBRY H.A.** (1946): Land mollusks of North America, north of Mexico. Philadelphia Academi of Science – Philadelphia, USA: Monography 3(2). 37-102.
- PINEDA M.C., LOPEZ-LEGENTIL S., TURON X.** (2011): The whereabouts of an ancient wanderer: Global phylogeography of the solitar ascidian *Styela plicata*. *Plos One* 6: AN-e25495.
- POPPE G.T., GOTTO Y.** (1991): European Seashells, Vol. 1 (Polyplacophora, Claudofoveata, Solenogastra, Gastropoda). Verlag Christa Hemmen: Wiesbaden.
- PRIME M., PEHARDA M., JELIC K., MLADINEO I., RICHARDSON C.A.** (2006): The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic. *Marine pollution bulletin* 52: 810-812.
- PULLANDRE N., HOLFORD M.** (2010): The Terebridae and teretoxins: Combining phylogeny and anatomy for concerted discovery of bioactive compounds. *BMC Chemical Biology* 10: 7.
- QUINTAS P., ROLÁN E., TRONCOSO J.S.** (2005): Sobre la presencia de un ejemplar vivo de *Hexaplex trunculus* en la ensenada de O Grove (Ría de Arousa, Galicia). *Not. Soc.Esp. Malacol.* 43: 77-78.
- RAMÓN M., AMOR M.J.** (2002): Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* and penis and genital duct size variations in populations affected by imposex. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82: 435-442.
- RAMÓN M., AMOR M.J.** (2001): Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. *Marine Environmental Research* 52: 463-475.
- RIBEIRO P.A., BRANCO M., HAWKINS S.J., SANTOS A.M.** (2010): Recent changes in the distribution of a marine gastropod, *Patella rustica*, across the Iberian Atlantic coast did not result in diminished genetic diversity or increased connectivity. *Journal of Biogeography* 37: 1782-1796.
- RILOV G., BENAYAHU Y., GASITH A.** (2004): Life on the edge: do biomechanical and behavioral adaptations to wave-exposure correlate with habitat partitioning in predatory whelks? *Marine Ecology Progress* 282: 193-204.

- RILOV G., GASITH A., EVANS S.M., BENAYAHU Y.** (2000): Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (Eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. *Marine Ecology Progress Series* 192: 229-238.
- ROBIN A.** (2008): *Encyclopedia of Marine Gastropods*. Conchbooks, Xenophora – Hackenheim (Germany), Paris (France): 239-284.
- ROHLF F.J.** (2008): tps Utility program, version 1.40. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (2007a): Relative warps, version 1.45. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (2007b): tpsRegr, version 1.34. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (2006): tpsDIG, version 2.10. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (1993): Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: *Contributions to morphometrics*. Vol. 8 (L.F. Marcus, E. Bello & A. Garcí'a Valdecasas, eds), 8: 131-159. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- ROLÁN E., BANON-DÍAZ R.** (2007): Primer hallazgo de la especie invasora *Rapana venosa* y nueva información sobre *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) en Galicia. *Not. Soc. Esp. Malacol.* 47: 57-59.
- RUIZ J.M., BACHELET G., CAUMETTE P., DONARD O.F.X.** (1996): Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay France. *Environmental Pollution*. 93: 195-203.
- SANTOS M.M., TEN HALLERS-TJABBES C.C., SANTOS A.M., VIEIRA N.** (2002): Imposex in *Nucella lapillus* a bioindicator for TBT contamination: re.survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EC regulation. *Journal of Sea Research* 48: 217-223.
- SAMADI S., BOTTON L., MACPHERSON E., DE FORGES B.R., BOISSELIER M.C.** (2006): Seamount endemism questioned by the geographic distribution and population genetic structure of marine invertebrates. *Marine Biology* 149: 1463-1475.
- SMITH B.S.** (1971): Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 377-378.
- \*SPIGHT T.M., BIRKELAND C., LYONS A.** (1974): Live histories of large and small murexes (Prosobranchia: Muricidae). *Marine Biology* 24: 229-242.
- STATSOFT, Inc** (2007): STATISTICA (data analysis software system), version 8.: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- STONE J.R.** (1998): Landmark-based thin-plate spline relative warp analysis of gastropod shells. *Systematic Biology* 47: 254-263.

- STROBEN E., OEHLMANN U., SCHULTE-OEHLMANN U., FIORONI P.** (1996): Seasonal variations in the genital ducts of normal and imposex-affected prosobranchs and its influence on biomonitoring indexes. *Malacological Review*, Suppl. 6: 173-184.
- STROBEN E., OEHLMANN J., FIORONI P.** (1992): The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Mar. Biol.* 113: 625-636.
- ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTUČEK R., RUŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J.** (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno: pp. 188.
- TAN K. S.** (1997): Imposex in three species of *Thais* from Singapore, with additional observations on *T. clavigera* (Küster) from Japan. *Marine Pollution Bulletin* 34: 577-581.
- TEN HALLERS-TJABBES C.C., KEMP J.F., BOON J.P.** (1994): Imposex in whelks *Buccinum undatum* from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. *Marine Pollution Bulletin* 28: 311-313.
- TER BRAAK C. J. F., ŠMILAUER P.** (1998): CANOCO Reference manual and user's guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power, Ithaca, NY: 1-352 pp.
- TERLIZZI A., FRASCHETTI S., GIANGUZZA P., FAIMALI M., BOERO F.** (2001): Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 11: 311-317.
- TERLIZZI A., GERACI S., GIBBS P.E.** (1999): TBT-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. *Ital. J. Zool.* 66: 141-146.
- \*THORPE J.P., SOLÉ-CAVA A.M., WATTS P.C.** (2000): Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420: 165-184.
- \*TORRE R.** (1938): On the probable cause of certain variation in color of the shell in the genus *Liguus*. *Nautilus* 52: 46ff.
- URRA A., OLIVA D., SEPÚLVEDA M.** (2007): Use of a morphometric analysis to differentiate *Adelomelon ancilla* and *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) of southern Chile. *Zoological studies* 46: 253-261.
- VASCONCELOS P., CARVALHO S., CASTRO M., GASPAR M.B.** (2008): The artisanal fishery for muricid gastropods (banded murex and purple dye murex) in the Ria Formosa lagoon (Algarve coast, southern Portugal). *Scientia Marina* 72(2): 287-298.
- VASCONCELOS P., CÚRDIA J., CASTRO M., GASPAR M.B.** (2007): The shell of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) as a mobile hard substratum for epibiotic polychaetes (Annelida: Polychaeta) in the Ria Formosa (Algarve coast—southern Portugal). *Hydrobiologia* 575: 161-172.

- VASCONCELOS P., GASPAR M.B., CASTRO M.** (2006): Development of indices for nonsacrificial sexing of imposex-affected *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan studies* 72: 285-294.
- VASCONCELOS P., GASPAR M.B., PEREIRA A.M., CASTRO M.** (2006,b): Growth rate estimation of *H. trunculus* based on mark/recapture experiments in the Ria Formosa lagoon. *Journal of Shellfisheries Research*.
- \*VASCONCELOS P., GASPAR M. B., JOAQUIM S., MATIAS D., CASTRO M.** (2004): Spawning of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) in the laboratory: description of spawning behaviour, egg masses, embryonic development, hatchling and juvenile growth rates. *Invertebr. Reprod. Dev.* 46: 125-138.
- \*WADE T.L., GARCIA-ROMERO B., BROKS J.M.** (1991): Oysters as biomonitors of butyltins in the Gulf of Mexico. *Marine Environmental Research* 32: 232-241.
- \*WALKER A.J.M.** (1972): Introduction to the ecology of the Antarctic limpet *Patinigera polaris* (Hombron and Jaquinot) at Signy Island, South Orkney Island. *Br. Antarct. Surv. Bull.* 28: 49–71.
- \*WILKE T., DAVIS G.M.** (2000): Intraspecific mitochondrial sequence diversity in *Hydrobia ulvae* and *Hydrobia ventrosa* (Hydrobiidae: Rissooidea: Gastropoda): do their different life histories affect biogeographic patterns and gene flow? *Biol. J. Linn. Soc.* 70: 89-105.
- ŽITKO T., DESDEVISES Y., PUIZINA J.** (2011): Genetic variation in East-Adriatic populations of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), inferred from NADH5 and COI sequence variability. *Eur. J. Entomol.* 108: 501-508.
- FERNANDEZ R., ALMODOVAR A., NOVO M., GUTIERREZ M., COSIN D.J.D.** (2011): A vagrant clone in a peregrine species: Phylogeography, high clonal diversity and geographical distribution in the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Duges, 1828). *Soil Biology & Biochemistry* 43: 2085-2093.

[http://www.gastropods.com/9/Shell\\_11069.shtml](http://www.gastropods.com/9/Shell_11069.shtml)

<http://www.vialattea.net/esperti/php/risposta.php?num=7249>

\* (symbol pro nečtené publikace nebo čtené jen abstrakty)

## 7. Přílohy



**Př. 1.:** Typičtí zástupci z chorvatské lokality Zambratija (číslo vzorku: 1; 50; 57).



**Př. 2.:** Typičtí zástupci z chorvatské lokality Sovlje (číslo vzorku: 117; 152; 161).



**Př. 3.:** Typičtí zástupci z chorvatské lokality Sumartin (číslo vzorku: 245; 246; 271).



**Př. 4.:** Typičtí zástupci z řecké lokality Lefkáda (číslo vzorku: 308; 327; 335).

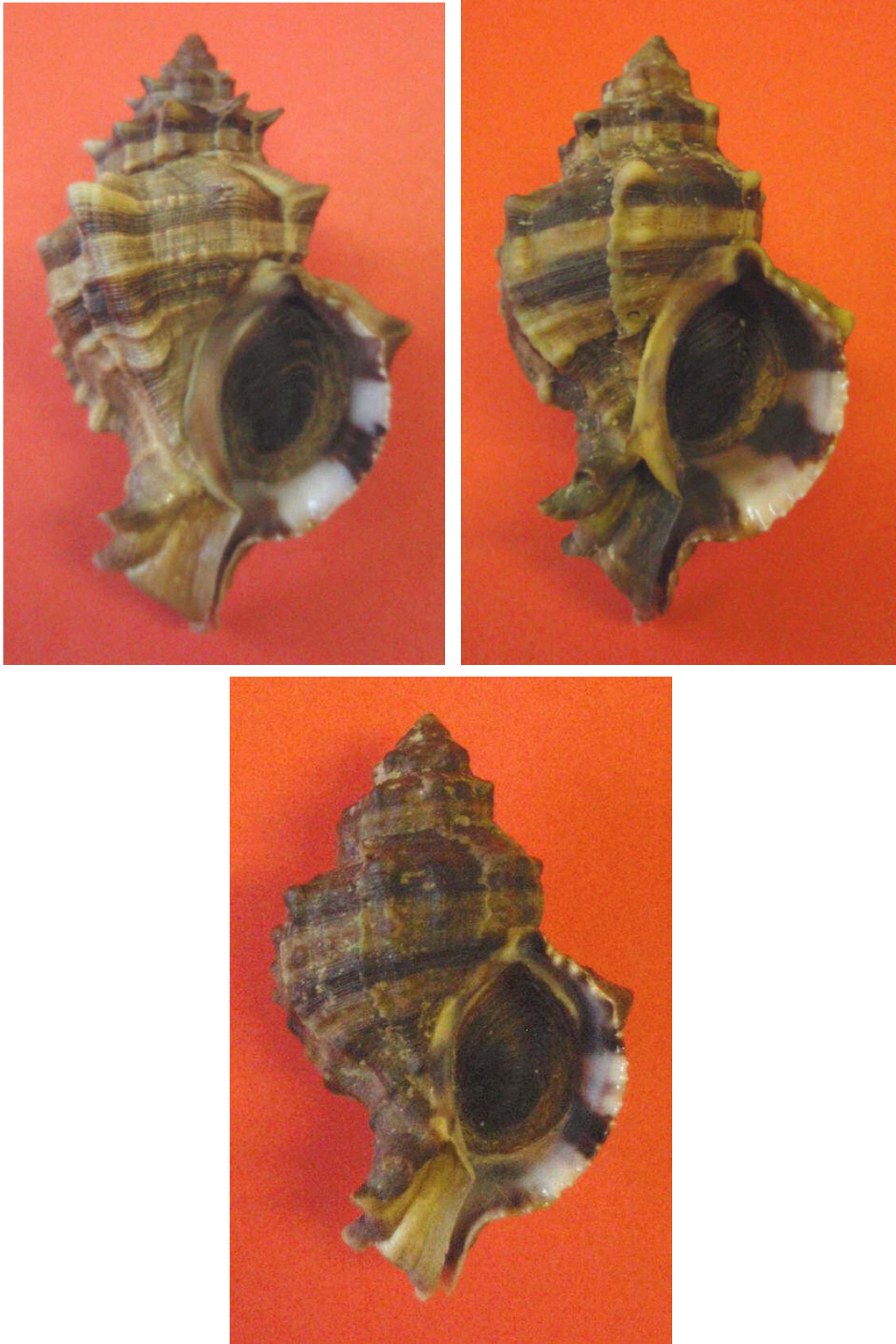




**Př. 5.:** Typičtí zástupci z řecké lokality Nikiana (číslo vzorku: 350; 362; 363).



**Př. 6.:** Typičtí zástupci z řecké lokality Meganiši (číslo vzorku: 375; 389; 392).



**Př. 7.:** Typičtí zástupci z řecké lokality Vasiliki (číslo vzorku: 409; 410; 412).



**Př. 8.:** Typičtí zástupci z francouzské lokality La Ciotat (číslo vzorku: 446; 447; 451).



**Př. 9.:** Typičtí zástupci z francouzské lokality Six-Fours les Plages (číslo vzorku: 454; 455; 457).