

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Denní produkce a rytmy ve vyplouvání cercárií dvou
druhů motolic *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium
recurvatum* z prvních mezihostitelských plžů**

Bakalářská práce

Šárka Kreslová

Školitelka: Mgr. Miroslava Soldánová, Ph.D.

České Budějovice 2024

Kreslová, Š., 2024: Denní produkce a rytmy ve vyplouvání cercárií dvou druhů motolic *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum* z prvních mezihostitelských plžů. [Daily output rates and emergence patterns of two trematode species *Opisthioglyphe ranae* and *Echinoparyphium recurvatum* from the first snail intermediate hosts. [Bc. Thesis, in Czech.] 72 p., Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this study was to obtain data on the emergence of cercariae of two trematode species *Opisthioglyphe ranae* and *Echinoparyphium recurvatum* parasitizing snails of the genera *Ampullaceana* and *Radix* as first intermediate hosts. These two important transmission strategies were studied under laboratory conditions in three seasons (spring, summer and autumn). The study provided new data on the daily production and rhythms in cercarial emergence in relation to biotic and abiotic factors that facilitate the transmission of cercariae to the next hosts.

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 12. dubna 2024

.....
Šárka Kreslová

Poděkování:

Nejprve bych chtěla poděkovat mé školitelce Miroslavě Soldánové za odborné rady, obrovskou trpělivost, a hlavně za obrovskou psychickou podporu. Velké poděkování patří také Petře Kundid za pomoc během experimentů a laboratorní práci. Dále bych chtěla poděkovat Blance Škoríkové a Martině Borovkové za pomoc při sběru materiálu v terénu a také celé laboratoři helmintologie pod vedením Tomáše Scholze za praktické rady, obrovskou podporu a přátelskou a milou atmosféru v průběhu vypracovávání této bakalářské práce. Na závěr bych chtěla poděkovat celé své rodině, příteli a přátelům za psychickou podporu a trpělivost.

Financování:

Tento výzkum byl podpořen z prostředků Akademie věd ČR (program "Strategie AV 21: Záchrana a obnova krajiny").

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Obecná charakteristika motolic se zaměřením na stádium cercárie.....	1
1.2. Strategie přenosu cercárií motolic.....	3
2. Cíle	7
3. Hypotézy	8
4. Materiál a metodika	9
4.1. Přehled lokalit a jejich charakteristika.....	9
4.2. Sběr a vyšetření plžů.....	12
4.3. Studované druhy motolic.....	15
4.3.1. <i>Opisthioglyphe ranae</i>	16
4.3.2. <i>Echinoparyphium recurvatum</i>	17
4.4. Materiál pro experimenty	19
4.5. Metodika experimentů.....	20
4.6. Analýza dat.....	23
5. Výsledky	26
5.1. Denní produkce cercárií	26
5.2. Denní vzory ve vyplouvání cercárií	32
5.3. Vliv testovaných faktorů	41
6. Diskuse	44
7. Závěr	56
8. Použitá literatura	57

1. Úvod

1.1. Obecná charakteristika motolic se zaměřením na stádium cercárie

Parazitismus je obecně definován jako vztah, ve kterém jeden organismus získává výhodu na úkor druhého organismu, tzn. parazit škodí svému hostiteli odebráním živin, což může vést až k jeho usmrcení (Loker a Hofkin, 2015; Lucius a Poulin, 2017). Organismy s parazitickým způsobem života se řadí do mnoha rostlinných i živočišných skupin, jsou kosmopolitně rozšířené a vyznačují se složitými životními cykly, které zahrnují několik vývojových stádií a hostitelů (Esch a Fernández, 1993; Poulin a Morand, 2000; Lucius a Poulin, 2017).

Typickou skupinou parazitů se složitými životními cykly jsou motolice (třída Trematoda) podtřídy Digenea (Neodermata, Platyhelminthes). Motolice jsou kosmopolitní převážně endoparazitičtí červi, kteří během svého vývoje parazitují širokou škálu sladkovodních i mořských bezobratlých a obratlovců, ale existují i zástupci s životním cyklem v prostředí suchozemském (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Horák, 2010; Morley, 2012). Motolice jsou rozsáhlou skupinou s velkou druhovou diverzitou zahrnující přes 44 200 zástupců, avšak celkový odhad druhů je mnohem vyšší (přes 181 400) díky kryptické neboli skryté diverzitě (tj. druhy, které jsou morfologicky velmi podobné, ale geneticky rozdílné; Korshunova a kol., 2017; Struck a Cerca, 2019) (Carlson a kol., 2020). Jsou významnými patogeny člověka i volně žijících a hospodářských zvířat (Caravedo a Cabada, 2020) s celou řadou nechvalně známých a důležitých parazitů způsobující závažná onemocnění jako např. druhy rodu *Schistosoma* Weinland, 1858 (Schistosomatidae), krevní motolice způsobující schistosomózu u lidí v tropech a subtropích (až 290 milionů nakažených lidí) (Jamieson, 2017; Klohe a kol., 2021) či druhy rodu *Fasciola* Linnaeus, 1758 (Fasciolidae), jaterní motolice způsobující fasciolózu u zvířat a lidí celosvětově (zde až 17 milionů případů) (Cwiklinski a kol., 2016; Caravedo a Cabada, 2020; Infantes a kol., 2023).

Životní cykly motolic většinou zahrnují 3 hostitele. Definitivním hostitelem je obratlovec, ve kterém probíhá pohlavní množení, prvním mezihostitelem je obvykle měkkýš, ve kterém probíhá nepohlavní (asexuální) množení a druhými mezihostiteli jsou různé druhy bezobratlých živočichů i obratlovců (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Combes a kol., 2002; Esch a kol., 2001; Sukhdeo a Sukhdeo, 2004). Některé druhy motolic mají 2-hostitelské životní cykly s absencí druhého mezihostitele jako např. zástupci čeledi Schistosomatidae či Fasciolidae (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Během ontogenetického vývoje tak motolice vystřídají několik životních stádií přes vajíčko, miracidium, sporocysty a/nebo redie, cercárie, metacercárie a dospělce. Výsledkem sexuálního množení dospělců v definitivním hostiteli jsou vajíčka, která jsou společně s výkaly vylučována do vnějšího prostředí. Embryogenezi

vajíček následně vzniká první volně plovoucí larva miracidium, která aktivně vyhledává a infikuje prvního mezihostitele, měkkýše (u některých motolic se miracidium nachází uvnitř vajíčka, které je tak pasivně přeneseno do prvního mezihostitele). V těle plže vzniká z miracidia mateřská sporocysta, ze které se vyvíjejí další generace sporocyst a/nebo redií a v nich pak cercárie, které se uvolňují do vnějšího prostředí a aktivně vyhledávají další hostitele. Cercárie mohou infikovat definitivního hostitele přímo nebo se encystují ve vnějším prostředí jako adoleskárie, ale většinou penetrují druhého mezihostitele a encystují se jako metacercárie (klidové stádium). Definitivní hostitel se pak nakazí požitím infikovaného mezihostitele. Zde se postupně vyvíjejí dospělé motolice, které produkují vajíčka, čímž se životní cyklus uzavírá.

Cercárie představují zcela klíčová vývojová stádia v životním cyklu motolic. Jedná se o volně plovoucí larvy, které po uvolnění z infikovaného plže již dále nepřijímají potravu a jejich primárním cílem je nalézt a infikovat co největší množství dalších hostitelů (Thieltges a kol., 2008; Morley, 2012). Živostnost cercárií je totiž limitována zásobou glykogenu, který se rychle vyčerpává (Lawson a Wilson, 1980; Morley, 2011; Morley, 2012), tudíž cercárie přežívají velmi krátkou dobu; obecně se uvádí 24 až 72 h, ale některé druhy mohou přežít až 6 týdnů nebo jen 6 až 7 h (Morley, 2012; Born-Torrijos a kol., 2022). Jelikož mají cercárie motolic velmi omezený čas na vyhledání a infikování dalšího vhodného hostitele, došlo v průběhu koevolučních procesů a adaptací na hostitele k vývoji celé řady strategií přenosu za účelem zvýšit pravděpodobnost úspěšného dokončení životního cyklu (Combes a kol., 2002; Esch a kol., 2001; Reece a kol., 2017) (viz níže).

Motolice nejsou jen významnými patogeny, ale také plní pozitivní ekologickou roli ve fungování ekosystémů (Sures a kol., 2017; Szopieray a Żbikowska, 2021). Jedná se hlavně o cercárie, které jsou většinou uvolňovány z plžů ve velkém množství (např. Morley, 2012; Preston a kol., 2013; Soldánová a kol., 2016; Selbach a kol., 2019; Vyhlídalová a Soldánová, 2020) a přispívají tak svojí obrovskou biomasou k toku energie v potravních sítích (Kuris a kol., 2008; Thielthges a kol., 2008; Preston a kol., 2013; Moore a kol., 2024). Například jsou často vyhledávaným zdrojem potravy pro široké spektrum tzv. nehostitelských organismů – predátorů (tj. organismy, které neslouží jako přirození hostitelé a brání přenosu parazitů; Johnson a Thielthges, 2010) jako je hmyz, žahavci, mlži, korýši či ryby (Koprivnikar a kol., 2023; Stanicka a kol., 2023). Cercárie tak kromě predace musí ve vodním prostředí čelit mnoha dalším nástrahám biotického a abiotického charakteru (např. teplota, salinita, pH, UV záření, či chemické látky; Pietrock a Marcogliese, 2003; Studer a Poulin, 2013), které obecně vedou ke snížení populace cercárií ve vodním prostředí a tím i jejich šancí infikovat další

hostitele. Strategie přenosu do dalších hostitelů tyto ztráty kompenzují (Combes, 2001; Esch a kol., 2001, Haas, 2003).

1.2. Strategie přenosu cercárií motolic

U motolic existuje četná diverzita ve strategiích přenosu s cílem maximalizovat pravděpodobnost dokončení životního cyklu. Tyto strategie zahrnují procesy vyhledávání a rozpoznání vhodných hostitelů volně plovoucími larvami (miracidia a cercárie) ve vnějším prostředí pomocí různorodých chemických i mechanických stimulů/signálů, např. reakce na světlo (fototaxe, geotaxe), způsob pohybu, distribuce ve vodním sloupci či chemické signály hostitelů (Combes a kol., 1994; Haas, 2003; Morley, 2020). Dále mohou strategie zahrnovat mimikry cercárií, kdy dochází k napodobování pohybů obvyklé kořisti za účelem nalákání predátorů (např. larvy hmyzu), kteří slouží jako hostitelé motolic (Faltýnková a kol., 2023; Krupenko a kol., 2023), či manipulace hostitelů, kdy motolice dokáží ovlivňovat hostitele ve svůj prospěch změnou jejich přirozeného chování; hostitelé jsou pak více exponováni a tím náchylní k pozření predátorem – vhodným hostitelem (Poulin, 2010; Gopko a Mikheev, 2017; Nadler a kol., 2023).

Pro stádia cercárie se zdá být klíčovou strategií přenosu periodicitu čili rytmus v jejich vyplouvání z infikovaného mezihostitelského plže. Cercárie se uvolňují v určitých částech dne pravidelně tak, aby jejich největší počet koreloval s nejpravděpodobnějším výskytem vhodných hostitelů v životním cyklu (Combes a kol., 1994; Combes a kol., 2002; Soldánová a kol., 2022). Tato časová koordinace ve vyplouvání umožňuje akumulaci cercárií v čase a prostoru hostitele (tzv. „host-space“ and „host-time“ podle Combes a kol., 1994) a tím synchronizovat vzájemné biorytmy za účelem kompenzace omezených možností přenosu kvůli krátké životnosti cercárií (Morley, 2012; Born-Torrijos a kol., 2022). Vhodné načasování uvolňování cercárií z mezihostitelských měkkýšů se tedy většinou odvíjí od typu a aktivity dalších hostitelů, např. zda je hostitel bentický (pohybující se u dna) či pelagický (obývající vodní sloupec od hladiny zhruba do střední části) nebo jaká je jeho frekvence výskytu během dne v závislosti na vyhledávání potravy či dalších aktivit (Anderson a kol., 1976; Combes a kol., 1994; Combes a kol., 2002; Prokofiev a kol., 2015; Soldánová a kol., 2022).

Existuje několik typů rytmů ve vyplouvání cercárií: denní („diurnal“), kdy cercárie nejvíce vyplouvají během světlé části dne, a noční („nocturnal“), kdy nejvíce vyplouvají v průběhu tmavé části dne (Combes a kol., 1994; Bell a kol., 1999; Théron, 2015). Dále se rytmy rozlišují podle frekvence největšího množství vyplavaných cercárií v určitých částech

dne, podle tzv. („peaks“) ve vyplouvání (Combes a kol., 1994; Prokofiev a kol., 2015; Théron, 2015). Vyplouvání cercárií může tak být cirkadiánní, tj. s jedním vrcholem během 24 h (tento typ vykazuje většina druhů motolic; Hawking, 1975; Prokofiev a kol., 2015), ultradiánní, tj. se dvěma vrcholy ve vyplouvání během 24 h, nebo vzácný infradiánní rytmus, který nevykazuje žádné vrcholy ve vyplouvání, tedy bez jakékoliv periodicity (typicky pro cercárie, které se encystují ve vnějším prostředí, např. na vegetaci jako *F. hepatica*; Théron, 2015; Maggioli a kol., 2020). Tyto rytmy mohou být specifické pro dané skupiny motolic, ale mohou být i specifické pro blízké příbuzné druhy motolic v rámci jedné skupiny/čeledi nebo dokonce v rámci jednoho rodu. Například řada druhů rodu *Schistosoma* vykazuje diurnální cirkadiánní rytmy (např. *S. bovis*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*), ale i cirkadiánní rytmy s vrcholem vyplouvání během noci (např. *S. rodhaini*) (Combes a kol., 1994; Théron, 2015). Rovněž vyplouvání cercárií dvou druhů rodu *Diplostomum* je odlišné; zatímco *D. spathacaeum* vykazuje diurnální rytmy, *D. parviventosum* vykazuje noční vyplouvání (Vyhlídalová a Soldánová, 2020).

Kromě denních rytmů (tj. v jaké části dne cercárie vyplouvají), je jejich denní produkce dalším klíčovým aspektem ve vyplouvání (tj. kolik cercárií vyplouvá čili denní množství vyplavaných cercárií z jednoho prvního mezihostitelského plže). Produkce se může pohybovat v rozmezí několika jedinců až sta tisíců cercárií denně (Haas, 2003; Poulin, 2006; Morley, 2012; Soldánová a kol., 2016; Vyhlídalová a Soldánová, 2020). Touto strategií také dochází ke kompenzaci časově omezených možností přenosu cercárií, protože větší množství cercárií v prostředí zvyšuje pravděpodobnost nalezení a infikování dalšího hostitele, a tím dokončení životního cyklu.

Denní produkce i rytmy ve vyplouvání cercárií z prvních hostitelských plžů jsou ovlivněny řadou abiotických i biotických faktorů (Pietroock a Marcogliese, 2003; Thielges a kol., 2008) v závislosti na prostředí, ve kterém probíhá životní cyklus parazita. V mořských podmínkách je to např. salinita vody (zvýšená koncentrace podporuje vyplouvání cercárií), hladina vody (vyšší hladina naopak brzdí vyplouvání cercárií; Koprivnikar a Poulin, 2009a), slapové jevy (při odlivu vyplouvá více cercárií), tlak vody (spojením s dalšími faktory pozitivně ovlivňuje vyplouvání cercárií; Mouritsen, 2002)) či UV záření (nízké dávky UV záření mohou mít stimulační účinky; Studer a kol., 2012). Avšak teplota a světelné podmínky patří mezi nejdůležitější abiotické faktory ve všech typech vodních ekosystémů (Prokofiev a kol., 2015; Théron, 2015; Vyhlídalová a Soldánová, 2020). Teplota je jedním z nejvýznamnějších stimulů, jelikož se zvyšující se teplotou se zvyšuje počet vyplavaných cercárií (Lo a Lee, 1996; Koprivnikar a Poulin, 2009a; Poulin, 2006), avšak jen do určité

mezí teploty a poté produkce cercárií klesá (Poulin, 2006; Koprivnikar a Poulin, 2009a; Morley a kol., 2010; Selbach a Poulin, 2020; Khosravi a kol., 2023). Naopak, při poklesu teploty na určitý bod se produkce cercárií zastaví (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Lyholt a Buchmann, 1996). Intenzita světla (stupeň nasvícení, např. v laboratorních podmínkách) a fotoperioda (tj. střídání fází světlo/tma během 24 h) také výrazně ovlivňují vyplouvání cercárií z plžů (Théron, 2015; Prokofiev a kol., 2015). U některých druhů motolic je světlo hlavním stimulem pro uvolňování co největšího množství cercárií (např. ptačí schistosomy; Soldánová a kol., 2016; Soldánová a kol., 2022), zatímco u jiných druhů je to naopak tmavá část dne (např. *Plagiorchis elegans*; Lowenberger a Rau, 1994 či *Schistosoma rodhaini*; Théron, 2015). Nicméně lze konstatovat, že zatímco světelné podmínky výrazně ovlivňují způsob ve vyplouvání cercárií během 24 h (denní rytmy) (Kaewkes a kol., 2012; Théron, 2015; Soldánová a kol., 2016), celkové množství cercárií vyprodukovaných za 24 h (denní produkce) je naopak ovlivňováno hlavně teplotou prostředí (Poulin, 2006; Koprivnikar a Poulin, 2009a; Soldánová a kol., 2016). Teplota i intenzita světla/fotoperioda úzce souvisí s měnícími se klimatickými podmínkami v jednotlivých sezónách, a přestože sezónnost významně ovlivňuje vyplouvání cercárií z prvních mezihostitelských měkkýšů, je velmi málo prozkoumána (Fingerut a kol., 2003; Koprivnikar a Poulin, 2009b; Kiatsopit a kol., 2014; Paull a Johnson, 2014; Prokofiev a kol., 2015; de Montaudouin a kol., 2016; Soldánová a kol., 2016; Vyhliadalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022; Taskinen a kol., 2022).

Mezi významné biotické faktory podmiňující produkci cercárií patří velikost prvního mezihostitele, protože větší jedinci plžů poskytují více prostoru a energetických zdrojů pro asexuální namnožení larválních stádií (Esch a kol., 2001; Graham, 2003; Morley a kol., 2010). Dále je to intenzita infekce prvního mezihostitele, tzn. do jaké míry je hostitelský měkkýš promořen larvami motolic – sporocystami a/nebo rediemi (Massoud, 1974; Gustafson a Bolek, 2015), historie infekce, tzn. kolika miracidii je měkkýš infikován (Massoud, 1974; Gustafson a Bolek, 2015), genetická variabilita motolic (Berkhout a kol., 2014) či chronobiologická aktivita dalších hostitelů (viz výše; Anderson a kol., 1976; Combes a kol., 1994, 2002; Théron, 2015). Cyklický vývoj larev v infrapopulacích sporocyst a/nebo redií (Théron, 1981; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Soldánová a kol., 2016) a dynamika infekce v přezimujících plžích také může ovlivnit množství vyplavaných cercárií (Karvonen a kol., 2006a; Żbikowska a kol., 2006; Soldánová a kol., 2011).

Studium strategií přenosu motolic ve smyslu produkce a rytmů ve vyplouvání jejich cercárií je důležité pro pochopení biologie, ekologie a epidemiologie motolic (hlavně těch s patogenními účinky na člověka) a současně vlivů antropogenní činnosti, které ovlivňují

výskyt a šíření motolic jakožto původců parazitárních onemocnění do nových prostředí a geografických oblastí světa (Kurane, 2010; Goedknecht, 2015). V důsledku klimatických změn způsobených globálním oteplováním, které má za následek zvyšování průměrných teplot (Benjamin a kol., 2017; You a kol., 2022), se prodlužuje i délka sezónních období jak pro hostitele, tak i pro uvolňování infekčních stádií motolic z plžů (Paull a kol., 2012; Taskinen a kol., 2022). Očekává se zvýšení populačních hustot cercárií jako odpověď na zvyšující se teploty prostředí (Galaktionov, 2017), tedy vyšší produkce a koncentrace infekčních stádií v prostředí a tím i zvýšené riziko nálezů u zvířat i člověka (Marcogliese, 2001; Kutz a kol., 2009; Mas-Coma a kol., 2009).

Tato práce je zaměřena na mezery ve výzkumu denní produkce a rytmů ve vyplouvání cercárií z mezihostitelských plžů rodů *Ampullaceana* (Servain, 1882) a *Radix* (Montfort, 1810). Strategie přenosu cercárií motolic nejsou obecně u malých plovátkovitých plžů dobře prozkoumány (McCarthy, 1999a; Morley a kol., 2003; Morley a kol., 2010; Soldánová a kol., 2016; Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022). V této studii byly jako modelové motolice zkoumány dva druhy: *Opisthioglyphe ranae* (Fröhlich, 1791) z čeledi Telorchidiidae (Looss, 1899) a *Echinoparyphium recurvatum* (von Linstow, 1873) z čeledi Echinostomatidae (Looss, 1899), u kterých existuje jen velmi málo údajů o denní produkci a rytmech ve vyplouvání cercárií. Pro druh *O. ranae* zatím neexistují žádné studie o denních rytmech ve vyplouvání cercárií, ale částečná data lze nalézt v diplomové práci Bednářová (2010). Pro druh *E. recurvatum* existují údaje pouze ze třech prací, které obecně uvádějí, že rytmy ve vyplouvání cercárií jsou diurnální a cirkadiánní s nejvyšším počtem vyplavaných cercárií jednou ve světlé části dne během 24 h (McCarthy, 1999a; Morley a kol., 2003; Morley a kol., 2010). Znalost chronobiologické aktivity ve vyplouvání cercárií je důležitá při kontrole šíření motolic a snížení rizika přenosu do dalších hostitelů. Motolice čeledi Echinostomatidae vyvolávají střevní onemocnění zvané echinostomiáza převážně v Asii (Toledo a Esteban, 2016). Lidé se nakazí metacercáriemi pozřením syrových či nedostatečně upravených měkkýšů, ryb nebo žab, kteří slouží jako hostitelé. Jedním z významných původců tohoto onemocnění je právě druh *E. recurvatum* (Toledo a Esteban, 2016), který způsobuje echinostomozózu u lidí v Egyptě, Indonésii a Thajsku (Toledo a Esteban, 2016). Ačkoliv v Evropě není toto onemocnění zatím rozšířené, současná a narůstající hrozba globálních změn klimatu může vést k jeho šíření.

2. Cíle

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo získat data o vyplouvání cercárií dvou druhů motolic *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum* z prvních mezihostitelských plžů čeledi Lymnaeidae ve vztahu k různým sezónním světelným a teplotním podmínkám (foto- a termoperiodě) mírného pásu Evropy, konkrétně:

- 1) Získat údaje o **celkové denní produkci cercárií** (celkovém množství cercárií vyplavaných během 24 h).
- 2) Získat údaje o **denních rytmech ve vyplouvání cercárií** (denní periodicitě ve vyplouvání v průběhu 24 h).
- 3) Zjistit **vliv sezóny na denní produkci a rytmy cercárií** (variabilitu ve vyplouvání cercárií v závislosti na odlišných světelných a teplotních podmínkách v různých ročních obdobích).
- 4) Posoudit **mezidruhovou variabilitu v celkové denní produkci a cirkadiálních rytmech** cercárií sledovaných druhů motolic.

3. Hypotézy

- 1) **Denní produkce** cercárií (celkové množství vyplavaných cercárií během 24 h) se liší v závislosti na sezónní termoperiodě, ale nezávisí na světelných podmínkách v průběhu dne ani na sezónní fotoperiodě. Nejvyšší denní produkce se předpokládá v měsíci, kdy byla pozorována nevyšší teplota vody v jezeře.

- 2) **Denní rytmy** ve vyplouvání cercárií (denní periodicita ve vyplouvání v průběhu 24 h) závisí na světelných podmínkách v průběhu dne, ale nezávisí sezónní foto- a termoperiodě. Cirkadiánní rytmy jsou úzce spjaté s chronobiologickou aktivitou dalších mezipřehoditelů v životním cyklu sledovaných motolic, tzn. že se předpokládá stejná periodicita ve vyplouvání cercárií během dne v různých sezónách, protože i denní aktivita dalších hostitelů v životním cyklu zůstává v průběhu sezón konstantní. Produkce cercárií druhu *Opisthioglyphe ranae* je nejvyšší v průběhu západu slunce v závislosti na nejvyšší aktivitě žab a pulců, zatímco produkce cercárií druhu *Echinoparyphium recurvatum* je nejvyšší v průběhu světlé části dne v závislosti na nejvyšší denní aktivitě plžů.

- 3) **Denní rytmy** ve vyplouvání cercárií se mezi jednotlivými druhy liší, protože oba druhy motolic mají rozdílné životní cykly zahrnující jiné hostitele s odlišnou chronobiologickou aktivitou. Mezidruhová variabilita se ale neočekává u celkové **denní produkce** cercárií kvůli obecně známé citlivosti motolic na teplotní podmínky, tzn. podobné množství cercárií v závislosti na měsíční teplotě. U obou druhů se předpokládá nejvyšší denní produkce v měsíci, kdy byla pozorována nevyšší teplota vody v jezeře.

4. Materiál a metodika

4.1. Přehled lokalit a jejich charakteristika

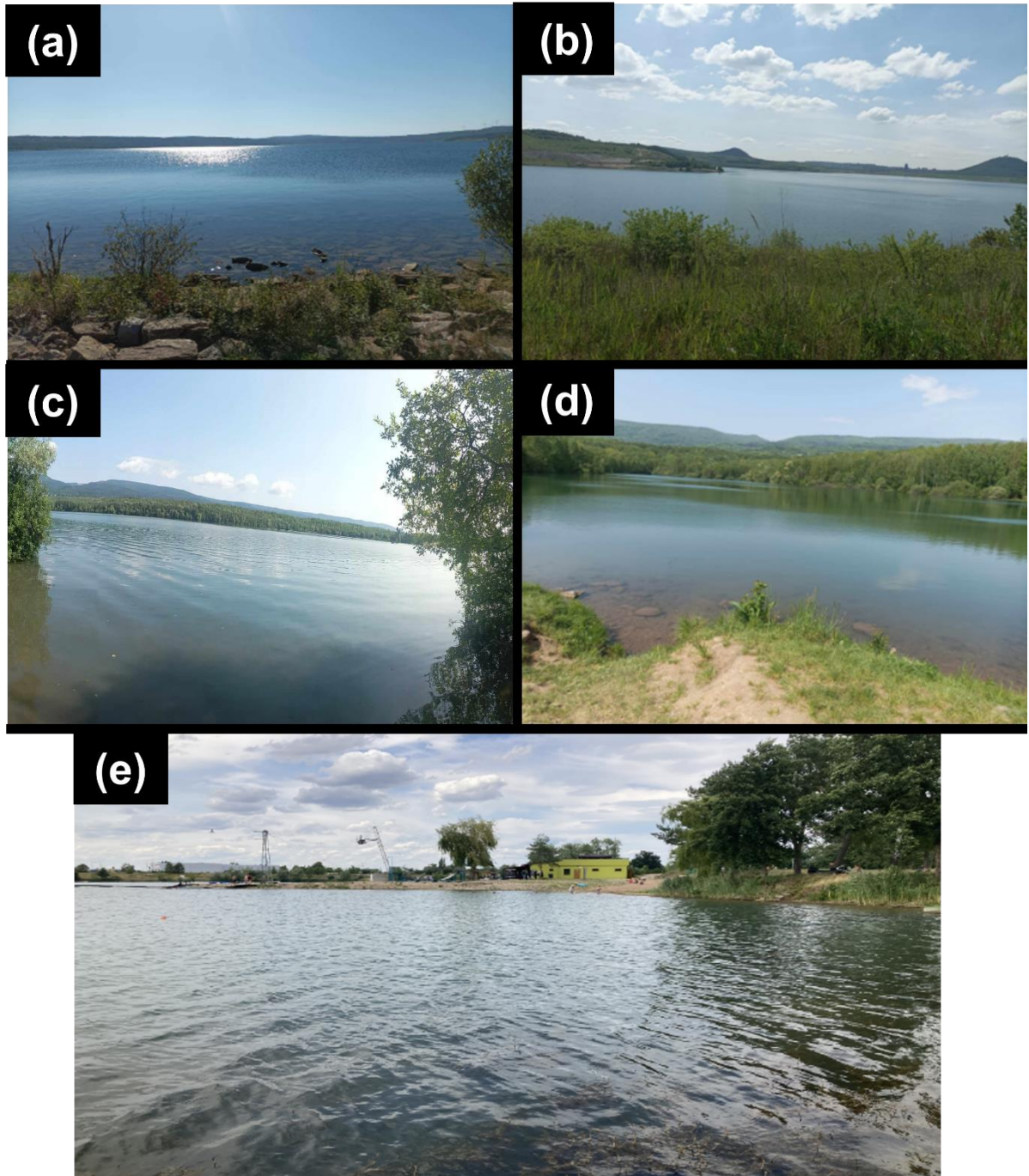
Plži dvou rodů, *Ampullaceana* a *Radix*, byli sbíráni na 5 jezerech v severních Čechách v roce 2023: Barbora (50°38'35.6"N, 13°45'00.1"E), Medard (50°10'44.0"N, 12°35'50.1"E), Most (50°32'13.6"N, 13°38'40.7"E), Písník Dubina (50°11'20.8"N, 15°47'09.7"E) a Otakar (50°39'04.8"N, 13°44'23.1"E) (Obr. 1). Jedná se o antropogenní jezera nebo vodní plochy vzniklá během rekultivačních a revitalizačních procesů obnovující přirozený ráz krajiny, která byla narušena důlní činností hnědého uhlí (Barbora, Medard, Most, Otakar; Příkryl a Havel, 2010; Žižka a Burda, 2020; Žižka a kol., 2020) nebo těžbou šterkopísku (Písník Dubina).

Jezero Medard (Obr. 1a) (496 ha, max. hloubka 57 m) se nachází v severozápadních Čechách v blízkosti města Sokolov a je největší uměle vytvořené jezero v Čechách (Žižka a kol., 2020). Hlavní důlní činnost byla ukončena v roce 2000 a napouštění jezera z nedaleké řeky Ohře trvalo 5 let (2011–2016) (Žižka a kol., 2020). Jezero Most (Obr. 1b) (309 ha, max. hloubka 75 m), nacházející se v severních Čechách v těsné blízkosti města Most, je druhým největším uměle vytvořeným jezerem v Čechách (Žižka a Burda, 2020). Hlavní důlní činnost byla ukončena v roce 1999 a napouštění jezera z nedaleké řeky Ohře trvalo 6 let (2008–2014) (Žižka a Burda, 2020; Dlouhá a kol., 2021). Jezera Barbora (63 ha, max. hloubka 60 m; Obr. 1c) a Otakar (9 ha, max. hloubka 10 m; Obr. 1d) se nacházejí v blízkosti jezera Most. Jedná se o starší jezera vzniklá samovolným zatopením hnědouhelných dolů v 70. letech 20. století (Příkryl a Havel, 2010), avšak informace o jejich floře a fauně jsou minimální. Písník Dubina (10 ha; Obr. 1e) je vodní plocha v severních Čechách u Hradce Králové a je odlišná od ostatních lokalit svým původem, neboť vznikla zaplavením jámy po těžbě šterkopísku.

Medard a Most představují důležitá ornitologická stanoviště pro hnízdění ptáků, jejich zimoviště či zastávky mezi migračními cestami; na obou jezerech je rozmanitá druhová diverzita ptáků. Vyskytují se zde i poměrně vzácné druhy jako *Larus hyperboreus* Gunnerus, 1767, *Cecropis daurica* (Laxmann, 1769) či *Miliaria calandra* (Linnaeus, 1766) (Bažant, 2017; Vavřík a kol., 2019). Jezero Most je považováno za jednu z nejvýznamnějších ptačích oblastí v České republice, jelikož je hlavním útočištěm pro 149 druhů ptáků (data z ornitologického pozorování mezi lety 2011 až 2014) (Bažant, 2017; Žižka a kol., 2020). Na obou jezerech se tudíž vyskytují vhodné definitivní hostitelé pro druh *E. recurvatum* (často i v hojných populacích), protože zde bývá přítomno více než 20 druhů kachen z čeledi Anatidae a celkově 7 čeledí ptáků sloužící jako potencionální definitivní hostitelé (Gibson a kol., 2005; Birmani a kol., 2019). Barbora a Otakar se nacházejí v těsné blízkosti jezera Most a též nedaleko jezera Medard (79 km), což může značit podobnou faunu ptáků, tedy vhodných

definitivních hostitelů. V severních Čechách se dle dat o výskytu obojživelníků v České republice z AOPK ČR (Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky) nacházejí druhy žab, které jsou důležitými druhými a zároveň definitivními hostiteli druhu *O. ranae* jako je *Bufo bufo*, *B. viridis*, *Hyla arborea* a široká škála druhů rodu *Rana* a *Pelophylax* (dle Host-parasite Database; Gibson a kol., 2005).

Lokality byly vybrány na základě prvotního zájmu prozkoumat druhovou diverzitu motolic v malých plovatkových plžích rodů *Ampullaceana* a *Radix*, pro které je výzkum diverzity a složení společenstev motolic stále podhodnocen (Soldánová a kol., 2010; Faltýnková a kol., 2016; Selbach a kol., 2020; Duan a kol., 2021). Druhy těchto plžů se zde vyskytují v početných populacích, což je typické pro větší oligotrofní jezera (Soldánová a kol., 2010), narozdíl od výskytu velké plovatky *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (Lymnaeidae) spíše v eutrofních prostředích (Soldánová a kol., 2011). Navíc rekultivační jezera se vyznačují bohatou biodiverzitou (Pešout a kol., 2022), včetně ptáků a obojživelníků jakožto hlavních hostitelů pro studované druhy motolic. Písník Dubina byl zvolen kvůli početným populacím malých plovatkových plžů, konkrétně druhu *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758).



Obr. 1 Přehled lokalit pro sběr plžů v severních Čechách. **(a)** Medard, **(b)** Most, **(c)** Barbora, **(d)** Otakar a **(e)** Písník Dubina.

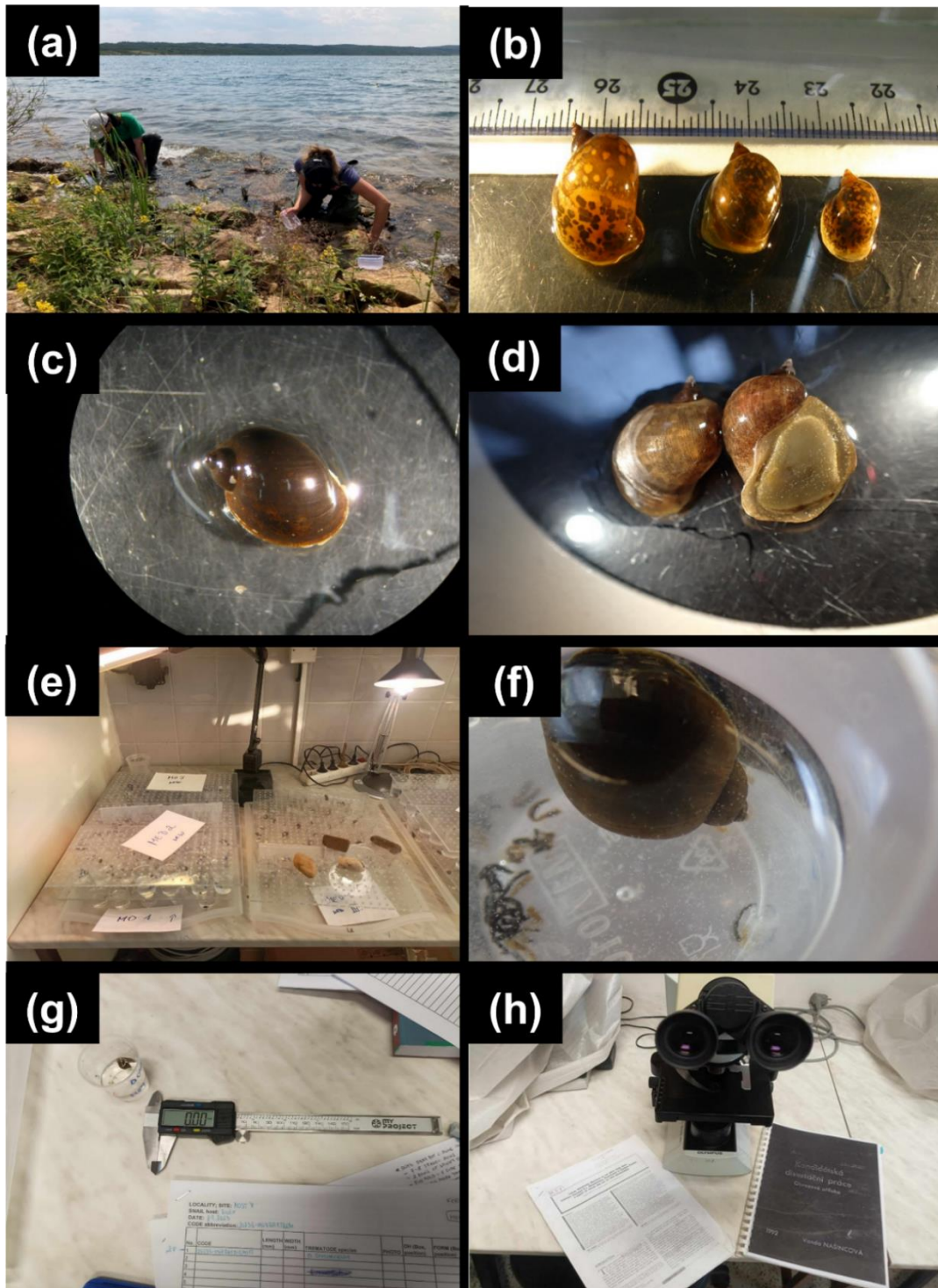
4.2. Sběr a vyšetření plžů

Plži byli sbíráni ručně z povrchu nebo zpod kamenů ve třech sezónách: jaro (květen), léto (červenec) a podzim (září) (Tab. 1, Obr. 2a). Sběr byl náhodně zaměřen na všechny velikostní skupiny plžů, avšak ne všechny druhy plžů se podařilo získat ze všech lokalit nebo ve všech sezónách (Tab. 1). Celkem bylo vyšetřeno 2167 jedinců plžů 4 druhů, *Ampullaceana balthica* (Linnaeus, 1758) (Obr. 2b), *Ampullaceana lagotis* (Schränk, 1803) (Obr. 2c) a *Radix auricularia* (Obr. 2d). Nejvíce plžů bylo nalezeno na jezeře Medard, konkrétně druh *A. balthica*. Na jezeře Most byl nalezen pouze druh *A. lagotis*, zatímco na jezerech Barbora, Otakar a Písník Dubina byl nejpočetnějším druhem *R. auricularia*.

V laboratoři byli plži individuálně rozděleni do transparentních kelímků s vodou (30 ml) z jezera a nasvíceni umělým osvětlením pro stimulaci vyplouvání cercárií (podle Vyhlídalová a Soldánová, 2020) (Obr. 2e). V průběhu 1 až 2 dní byly kelímky s plži vizuálně kontrolovány na přítomnost cercárií pomocí stereomikroskopu (Obr. 2f). Dále byli plži změřeni (délka a šířka ulity v mm) pomocí digitálního posuvného měřidla (Obr. 2g) a následnou parazitickou pitvou (tj. stlačením plžů mezi dvěma skly) byla zjištěna přítomnost prepatentních infekcí (tj. nezralé infekce čili přítomnost sporocyst a/nebo redií). Cercárie byly následně mikroskopicky identifikovány do druhu podle klíčů Našincová (1992) a Faltýnková a kol. (2007) (Obr. 2h) a hlavní morfologické znaky cercárií byly fotografovány pod mikroskopem (Olympus BX51). Plži byli identifikováni do druhu pomocí molekulárních analýz tkáně již v dřívějších studiích (Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Kundid a kol., 2024).

Tab. 1 Přehled sezónních sběrů plžů druhů *Ampullaceana balthica*, *Ampullaceana lagotis* a *Radix auricularia*, včetně velikosti sbíraných plžů, celkové prevalence infekce motolicemi a prevalence modelových druhů *Opisthio glyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum*. Údaje o experimentálních podmínkách (teplota vody a intenzity světla vody) jsou také uvedeny pro každou sezónu. Znak “–” značí, že experimenty v daném měsíci neproběhly.

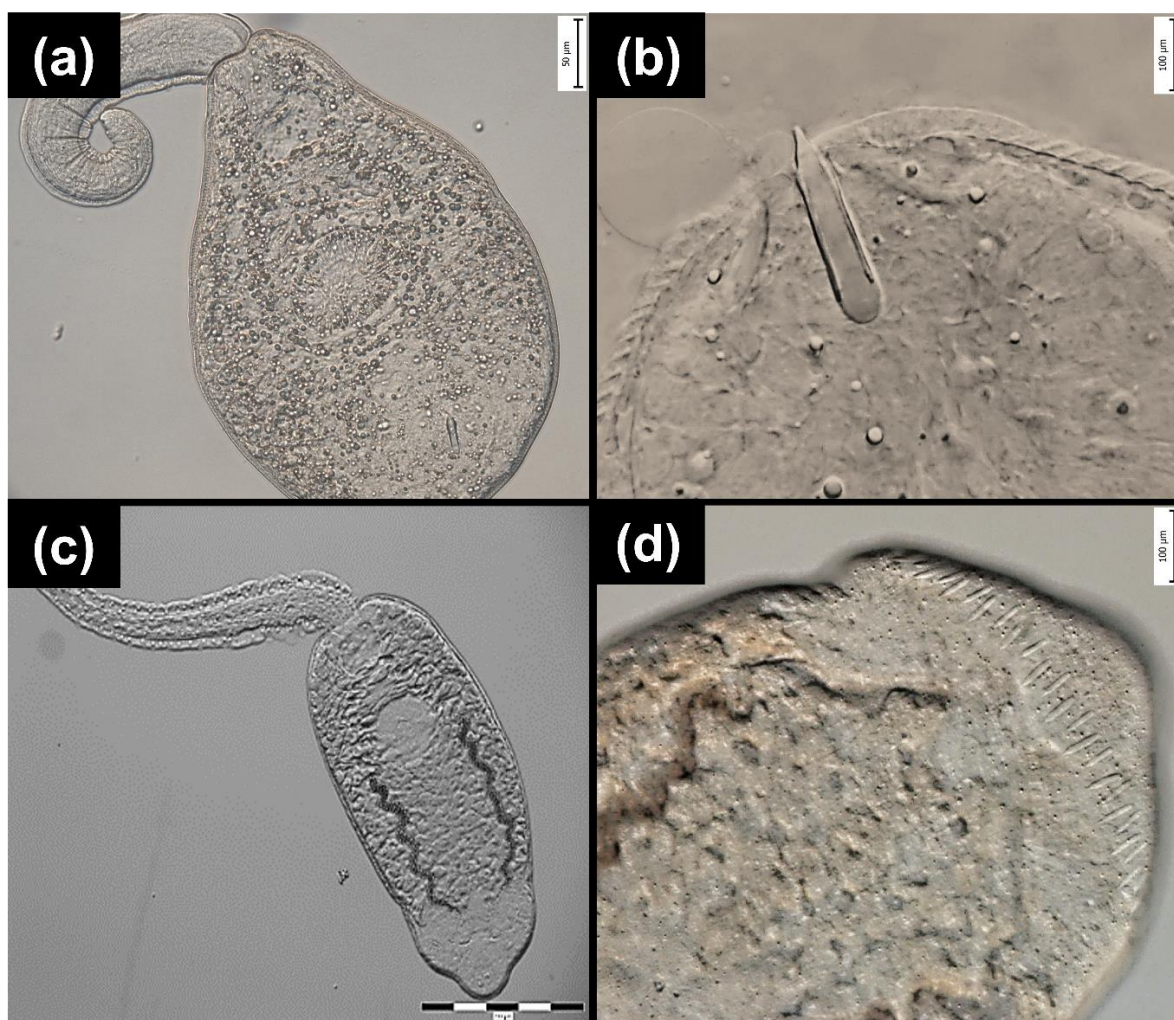
Parametr/Sezóna	Květen	Červenec	Září	Celkem
Počet vyšetřených plžů	603	589	975	2167
Počet infikovaných plžů (%)	42 (7,0)	105 (17,8)	191 (19,6)	338 (15,6)
Počet infikovaných plžů s <i>O. ranae</i> (%)	6 (1,0)	16 (2,7)	9 (0,9)	31 (1,4)
Počet infikovaných plžů s <i>E. recurvatum</i> (%)	3 (0,5)	5 (0,9)	14 (1,4)	22 (1,0)
Počet plžů během experimentů (počáteční/přeživší)	9/9	9/8	16/12	34/29
Průměr délky plže±SD (rozsah, mm)	12,3±3,71 (4,3–26,7)	10,6±5,2 (1,9–28,2)	8,8±3,2 (3,4–22,1)	10,5±4,1 (1,9–28,2)
Průměr šířky plže±SD (rozsah, mm)	7,4±2,4 (2,7–18,3)	6,6±3,8 (1,3–25,2)	5,6±2,2 (1,8–18,6)	6,5±2,8 (1,3–25,2)
Průměr teploty vody (rozsah, °C)	19,3 (19,1–19,5)	21,6 (20,8–21,8)	17,9 (17,9–18,1)	19,6 (17,9–21,8)
Průměr intenzity světla vody (rozsah, Lx)	145,2 (0–861,1)	89,8 (0–473,6)	70,3 (0–376,7)	101,8 (0–861,1)
<i>Ampullaceana balthica</i>				
Počet vyšetřených plžů	372	278	677	1327
Počet infikovaných plžů (%)	21 (5,6)	32 (11,5)	100 (14,9)	153 (11,5)
Počet infikovaných plžů s <i>O. ranae</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Počet infikovaných plžů s <i>E. recurvatum</i> (%)	0 (0)	2 (0,7)	1 (0,2)	3 (0,2)
Počet plžů během experimentů (počáteční/přeživší)	–	–	1/0	1/0
Průměr délky plže±SD (rozsah, mm)	10,7±2,6 (4,3–18,3)	10,3±5,7 (2,1–28,2)	7,4±2,0 (3,7–21,4)	9,5±3,4 (2,1–28,2)
Průměr šířky plže±SD (rozsah, mm)	6,4±1,7 (2,7–12,4)	6,7±4,4 (1,3–25,2)	4,8±1,5 (2,3–18,6)	6,0±1,3 (1,3–25,2)
<i>Ampullaceana lagotis</i>				
Počet vyšetřených plžů	166	172	186	524
Počet infikovaných plžů (%)	16 (9,6)	58 (33,7)	72 (38,7)	146 (27,9)
Počet infikovaných plžů s <i>O. ranae</i> (%)	6 (3,6)	16 (9,3)	9 (4,8)	31 (5,9)
Počet infikovaných plžů s <i>E. recurvatum</i> (%)	0 (0)	1 (0,6)	6 (3,2)	7 (1,3)
Počet plžů během experimentů (počáteční/přeživší)	6/6	9/8	8/6	23/20
Průměr délky plže±SD (rozsah, mm)	15,1±4,0 (5,8–26,7)	13,0±5,3 (1,9–26,8)	12,9±3,3 (3,4–22,1)	13,6±4,2 (1,9–26,8)
Průměr šířky plže±SD (rozsah, mm)	9,1±2,6 (3,0–18,3)	8,1±3,4 (1,3–17,0)	8,2±2,3 (1,8–15,3)	8,5±2,7 (1,3–18,3)
<i>Radix auricularia</i>				
Počet vyšetřených plžů	65	139	112	316
Počet infikovaných plžů (%)	5 (7,7)	15 (10,8)	19 (17,0)	39 (12,3)
Počet infikovaných plžů s <i>O. ranae</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Počet infikovaných plžů s <i>E. recurvatum</i> (%)	3 (4,6)	2 (1,4)	7 (6,3)	12 (3,8)
Počet plžů během experimentů (počáteční/přeživší)	3/3	–	7/6	10/9
Průměr délky plže±SD (rozsah, mm)	14,1±3,9 (6,0–24,4)	8,3±2,2 (3,4–14,1)	10,5±2,7 (5,2–17,8)	11,0±2,9 (3,4–24,4)
Průměr šířky plže±SD (rozsah, mm)	8,4±2,8 (3,7–15,7)	4,7±1,4 (2,1–8,5)	6,2±2,0 (2,7–12,2)	6,5±2,1 (2,1–15,7)



Obr. 2 Metodika sběru a vyšetření plžů. **(a)** sběr plžů v litorálu jezer, **(b)** *Ampullaceana balthica*, **(c)** *Ampullaceana lagotis*, **(d)** *Radix auricularia*, **(e)** nasvícení plžů pro stimulaci vyplouvání cercárií, **(f)** vyplavané cercárie z infikovaného plže, **(g)** měření plžů pomocí digitálního posuvného měřidla, **(h)** určování cercárií pomocí dostupné literatury (Našincová, 1992; Faltýnková a kol., 2007).

4.3. Studované druhy motolic

Pro experimenty byly vybrány cercárie dvou druhů motolic, *O. ranae* a *E. recurvatum* (Obr. 3), a to na základě nedostatečných informací o jejich denní produkci a rytmech ve vyplouvání cercárií z prvních mezihostitelských plžů. Navíc žádná data nejsou k dispozici z plžů rodů *Ampullaceana* a *Radix*. Dalším kritériem byla relativně vysoká četnost výskytu těchto plžů v různých sezónách na studovaných lokalitách, která by zajistila statisticky robustní množství experimentálních opakování. Oba druhy motolic jsou snadno od sebe rozeznatelné pomocí základních morfologických znaků specifických pro dané morfotypy cercárií (xifidiocercárie a echinostomní cercárie) a čeledí Telorchiidae (Looss, 1899) a Echinostomatidae (Looss, 1899) (viz. podkapitoly níže).



Obr. 3 Fotografie živých cercárií studovaných druhů motolic. (a) tělo cercárie druhu *Opisthioglyphe ranae* (ventrální pohled), (b) detail styletu, (c) tělo cercárie druhu *Echinoparyphium recurvatum* (ventrální pohled), (d) detail límcových trnů (dorzální pohled).

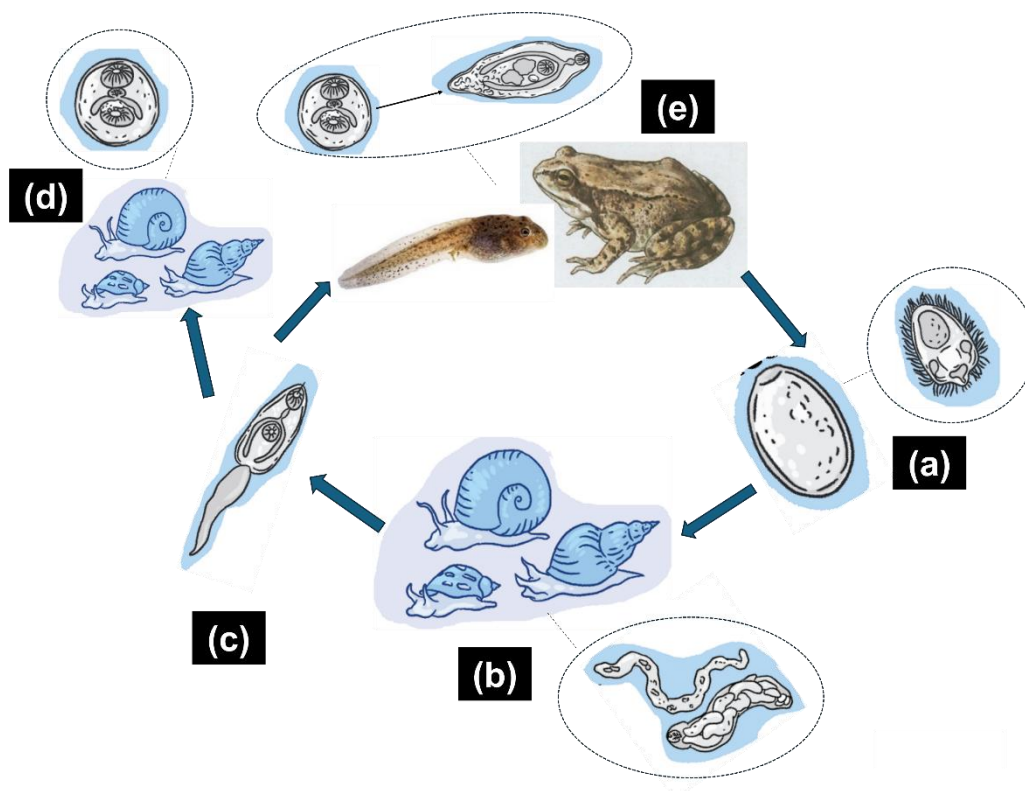
4.3.1. *Opisthioglyphe ranae*

Motolice druhu *O. ranae* se řadí do řádu Plagiorchiida čeledi Telorchiidae (Olson a kol., 2003). Cerkárie jsou poměrně velké (337–420 × 148–177 μm; Grabda-Kazubská, 1969) a vyznačují se přítomností sklerotizovaného orgánu v oblasti ústní přísavky, tzv. styletem. Patří tedy do morfotypu xifidiocerkárie (Obr. 5a), který se odlišuje od ostatních druhů motolic čeledi Telorchiidae (či podobných druhů čeledí Plagiorchiidae) hlavně díky absenci pevné skleroproteinové vrstvy v distální části (báze) styletu (Našincová, 1992) (Obr. 5b). Cerkárie se po vyplutí z plže pohybují spíše v blízkosti vodní hladiny; někdy se přichytávají na vodní vegetaci (Grabda-Kazubská, 1969).

Tento druh motolice má složitý a zajímavý životní cyklus zahrnující 2–3 hostitele (Grabda-Kazubská, 1969) (Obr. 3). Prvním mezihostitelem je vodní plž (obvykle čeledí Lymnaeidae a Planorbidae), ve kterém se vyvíjejí sporocysty, z nichž se dále vyvíjí cercárie (Grabda-Kazubská, 1969; Běspalaya a kol., 2022). Definitivními hostiteli jsou obvykle pulci a mladé či dospělé žáby (Grabda-Kazubská, 1969) až 16 druhů (podle Host-parasite Database; Gibson a kol., 2005). Cerkárie po uvolnění z plže mohou infikovat jak pulce, tak dospělé žáby mnoha čeledí, především skokanovité druhy čeledi Ranidae (Rafinesque, 1814), konkrétně druhy rodu *Rana* Linnaeus, 1758 (Ranidae) a *Bufo* Garsault, 1764 (Bufonidae), kde se encystují jako metacerkárie, přičemž nejlépe se metacerkárie vyvíjejí v pulcích. V pulcích se metacerkárie nacházejí různě v těle, ale nejvíce se akumulují v hlavě, zejména v dutině ústní a v ocase; u dospělých žab jsou metacerkárie lokalizovány nejvíce v dutině ústní. Metacerkárie se následně přesunují z dutiny ústní do střeva žab a pulců, kde se dále vyvíjejí v dospělé, tudíž druhý mezihostitel zároveň slouží jako definitivní hostitel. V tomto případě se jedná o 2-hostitelský životní cyklus. Po ukončeném vývoji motolice se začnou během 15 dnů objevovat vajíčka (Grabda-Kazubská, 1969). Vajíčka se uvolňují spolu s výkaly definitivního hostitele do vnějšího prostředí a musí být pozřena prvním mezihostitelským plžem, kde se v trávicím traktu plže (žaludek nebo střeva) líhnou v miracidia. Miracidium proniká do střeva a dále se vyvíjí ve sporocysty (Dobrovolskij, 1965).

Dle dostupných informací je známo, že cercárie tohoto druhu motolice mohou infikovat i plže jako druhého mezihostitele (Dobrovolskij, 1965; Grabda-Kazubská, 1969; Běspalaya a kol., 2022), ale informace o dalším pokračování životního cyklu nejsou v tomto případě dostupné. V tomto případě se pak jedná o 3-hostitelský životní cyklus. Tento druh motolice je také schopen tzv. post-cyklického parazitismu, tzn. schopnost pokračování ve

vývoji dospělých jedinců v definitivních hostitelích po jejich pozření vyšším predátorem (např. pokud hadi pozrou infikované žáby) (Zhytova a kol., 2019).



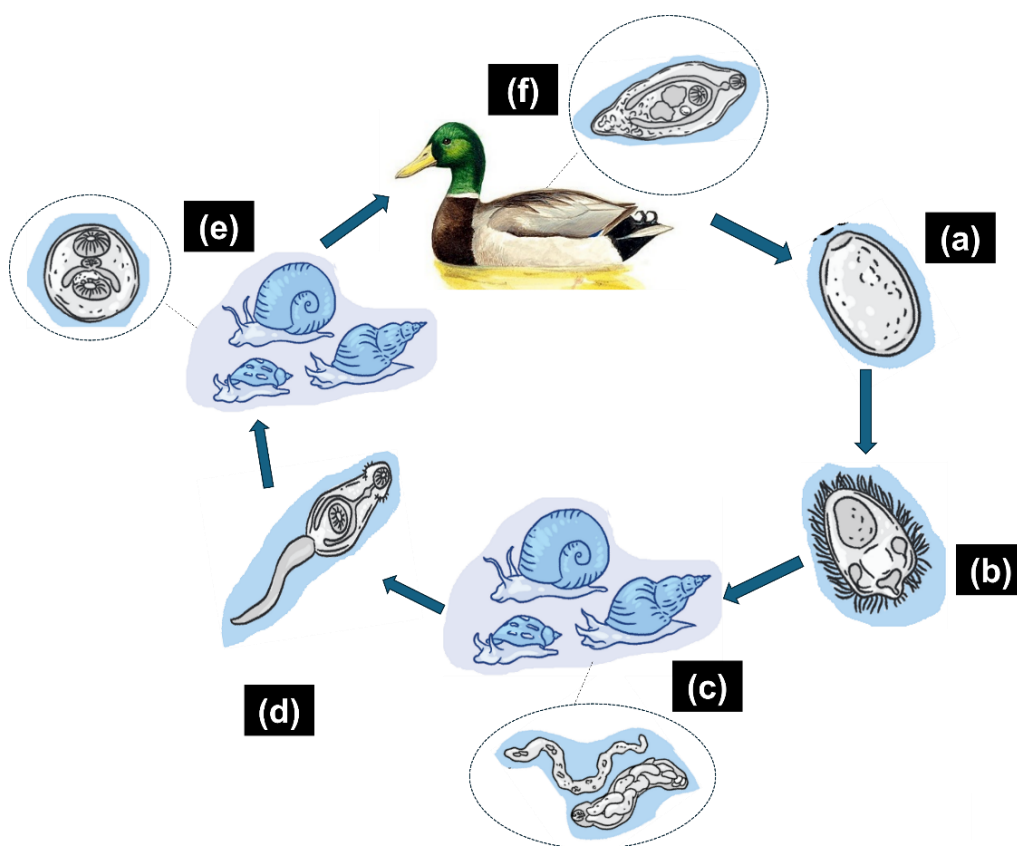
Obr. 4 Životní cyklus motolice *Opisthioglyphe ranae*. (a) miracidium obsažené ve vajíčku motolice, (b) sporocysty v prvním mezihostitelském plži, (c) volně plovoucí cercárie, (d) plž jako druhý mezihostitel se stádiem metacerkárie, (e) pulec nebo žába sloužící jako druhý mezihostitel a zároveň jako definitivní hostitel. Obrázky převzaty od autorky Mona Luo.

4.3.2. *Echinoparyphium recurvatum*

Motolice druhu *E. recurvatum* se řadí do řádu Echinostomida čeledi Echinostomatidae (Olson a kol., 2003; Huffman a Fried, 2012). Cercárie *E. recurvatum* (221–290 × 92–118 μm; Našincová, 1992) patří do morfortypu echinostomních cercárií (Obr. 5c), které se vyznačují hlavně přítomností límcových trnů v oblasti ústní přísavky (Obr. 5e). *Echinoparyphium recurvatum* se od ostatních druhů této čeledi odlišuje počtem a tvarem límcových trnů, konkrétně tento druh jich má 45 (Našincová, 1992; Faltýnková, 2007). Cercárie tohoto druhu jsou fototakticky pozitivní (tj. pohyb za světlem) i geotakticky pozitivní (tj. cercárie se pohybují u dna substrátu) (McCarthy, 1999b; Morley, 2012).

Tento druh motolice má 3-hostitelský životní cyklus (Grabda-Kazubska a Kisielienė, 1989) (Obr. 4). Prvními mezihostiteli jsou sladkovodní plži značného množství druhů především dvou čeledí Lymnaeidae a Planorbidae (Faltýnková a kol., 2016). Sladkovodní plži

zároveň slouží jako druzí mezihostitelé a druhová rozmanitost je zde poměrně široká (plži čeledí Lymnaeidae, Planorbidae, Physidae, Valvatidae, ale i další; Našincová, 1992). Méně často slouží jako druzí mezihostitelé pulci (McCarthy, 1999a) rodu *Rana* (Ranidae) (dle Host-parasite Database; Gibson a kol., 2005). V těchto hostitelích se cercárie *E. recurvatum* encystují jako metacerkárie (uvolněné cercárie z plžů jako prvních mezihostitelů často infikují ty samé jedince plžů jako druhé mezihostitele) (Huffman a Fried, 2012). Hlavními definitivními hostiteli jsou ptáci obrovské diverzity čeledí, nejčastěji se jedná o vodní ptáky čeledí Anatidae a Laridae, ale i mnoho dalších čeledí jako Accipitridae, Ardeidae, Charadriidae, Fringillidae, Phasianidae, Rallidae, či Threskiornithidae (Gibson a kol., 2005; Huffman a Fried, 2012; Birmani a kol., 2019). Výskyt tohoto druhu motolice byl zaznamenán i v hlodavcích (Huffman a Fried, 2012).



Obr. 5 Životní cyklus motolice *Echinoparyphium recurvatum*. (a) vajíčko, z něhož se uvolňuje (b) volně plovoucí miracidium, (c) sporocysty a redie v prvním mezihostitelském plži, (d) volně plovoucí cercárie, (e) plž jako druhý mezihostitel se stádiem metacerkárie, (f) vodní pták sloužící jako definitivní hostitel. Obrázky převzaty od autorky Mona Luo.

4.4. Materiál pro experimenty

V experimentech byl v každém měsíci použit odlišný počet plžů, a to v závislosti na prevalenci (proporce infikovaných plžů v populaci; Bush a kol., 1997) studovaných druhů motolic a úmrtnosti infikovaných plžů během v průběhu experimentů nebo aklimatizace (Tab. 1 a 2). Pro druh *O. ranae* bylo celkem použito 19 plžů (6 v květnu; 9 v červenci a 4 v září) (Tab. 2), přičemž celkem 18 plžů přežilo po celou dobu experimentů (Tab. 2). Druh *O. ranae* byl nalezen ve všech měsících jen v jednom druhu plže *A. lagotis* na jezeře Most (Tab. 2). Pro druh *E. recurvatum* bylo celkem použito 15 plžů (3 v květnu a 12 v září) (Tab. 2), přičemž celkem 11 plžů přežilo po celou dobu experimentů (Tab. 2). Pro tento druh nebyly v červenci provedeny žádné experimenty z důvodu předčasného úmrtí infikovaných plžů (Tab. 1 a 2). Druh *E. recurvatum* byl nalezen ve 3 druzích plžů (*A. balthica*, *A. lagotis* a *Radix auricularia*) na všech 5 lokalitách, přičemž nejčastěji v jezerech Otakar a Most (Tab. 2). Pouze údaje o produkci cercárií z přeživších plžů byly použity ve statistických analýzách (viz níže).

Tab. 2 Přehled materiálu pro experimenty, datum a lokalita sběru plžů druhů *Ampullaceana balthica*, *Ampullaceana lagotis* a *Radix auricularia* infikovaných dvěma druhy motolic *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum*, kódy experimentálních plžů a jejich délka a šířka (mm). Nomenklatura plžů je podle Aksenova a kol., 2018.

Měsíc sběru	Datum sběru	Lokalita	Druh motolice	Druh plže	Kód	Délka plže (mm)	Šířka plže (mm)
Květen	19.05.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	1O-K	21,03	11,86
	19.05.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	2O-K	21,41	12,74
	19.05.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	3O-K	20,14	13,46
	19.05.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	4O-K	20,24	12,66
	19.05.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	5O-K	22,61	12,82
	19.05.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	6O-K	16,52	10,38
	20.05.	Otakar	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	1E-K	17,50	11,53
	20.05.	Otakar	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	2E-K	17,93	12,29
	20.05.	Otakar	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	3E-K	19,31	13,60
Červenec	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	1O-C	18,53	11,00
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	2O-C	19,33	12,18
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	3O-C	23,49	14,93
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	6O-C ^a	18,30	10,11
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	7O-C	20,53	12,61
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	8O-C	17,30	9,73
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	9O-C	24,99	16,66
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	10O-C	20,22	12,28
	10.07.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	11O-C	17,94	10,70

Tab. 2 Pokračování

Září	08.09.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	1O-Z	11,73	7,18
	08.09.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	2O-Z	12,66	7,79
	08.09.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	3O-Z	15,49	10,56
	08.09.	Most	<i>O. ranae</i>	<i>A. lagotis</i>	4O-Z	13,67	8,20
	09.09.	Písník Dubina	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	1E-Z	16,33	10,41
	09.09.	Písník Dubina	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	2E-Z	14,50	9,07
	08.09.	Most	<i>E. recurvatum</i>	<i>A. lagotis</i>	3E-Z	12,80	8,47
	08.09.	Most	<i>E. recurvatum</i>	<i>A. lagotis</i>	4E-Z ^a	12,26	8,17
	08.09.	Most	<i>E. recurvatum</i>	<i>A. lagotis</i>	5E-Z	19,80	13,83
	08.09.	Most	<i>E. recurvatum</i>	<i>A. lagotis</i>	6E-Z ^a	18,44	11,32
	07.09.	Medard	<i>E. recurvatum</i>	<i>A. balthica</i>	7E-Z ^a	20,02	16,43
	08.09.	Barbora	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	8E-Z	11,05	7,21
	08.09.	Barbora	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	9E-Z ^a	11,04	7,23
	08.09.	Otakar	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	10E-Z	13,22	7,97
	08.09.	Otakar	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	11E-Z	16,60	11,61
	08.09.	Otakar	<i>E. recurvatum</i>	<i>R. auricularia</i>	12E-Z	10,42	6,30

^a Plži zemřeli v průběhu experimentů

4.5. Metodika experimentů

Celková denní produkce a rytmy ve vyplouvání cercárií dvou studovaných druhů motolic byly zkoumány experimentálně v laboratorních podmínkách podle protokolu Vyhlídalová a Soldánová (2020) a Soldánová a kol. (2022).

Experimenty byly provedeny ve třech ročních obdobích: na jaře (v květnu), v létě (v červenci) a na podzim (v září) (Tab. 1), při konstantní teplotě, ale za rozdílných světelných podmínek podle přirozené fotoperiody dané sezóny. Údaje o teplotě a světelných podmínkách (tj. intenzitě světla) v každé sezóně byly zjištěny pomocí elektronických záznamníků dat (tzv. dataloggerů; Onset HOBO UA-002-64 Pendant 64K), které byly umístěny v každém jezeře na jaře, aby zaznamenávaly údaje každých 30 min po celou dobu výzkumu. Data pak byla zprůměrována pro zjištění teploty v každé sezóně. V květnu tak byly experimenty provedeny při teplotě 20°C, v červenci při 22°C a v září při 18°C (Tab. 1). Denní fotoperioda byla v každém experimentálním měsíci odlišná; v září byla světlá část dne (den) nejkratší (fotoperioda, světlo:tma; 13h:11h), zatímco v květnu (fotoperioda 16h:8h) a červenci (fotoperioda 16h:8h) se výrazně nelišila, jelikož denní doby byly u obou měsíců rozdílné pouze o 10 minut.

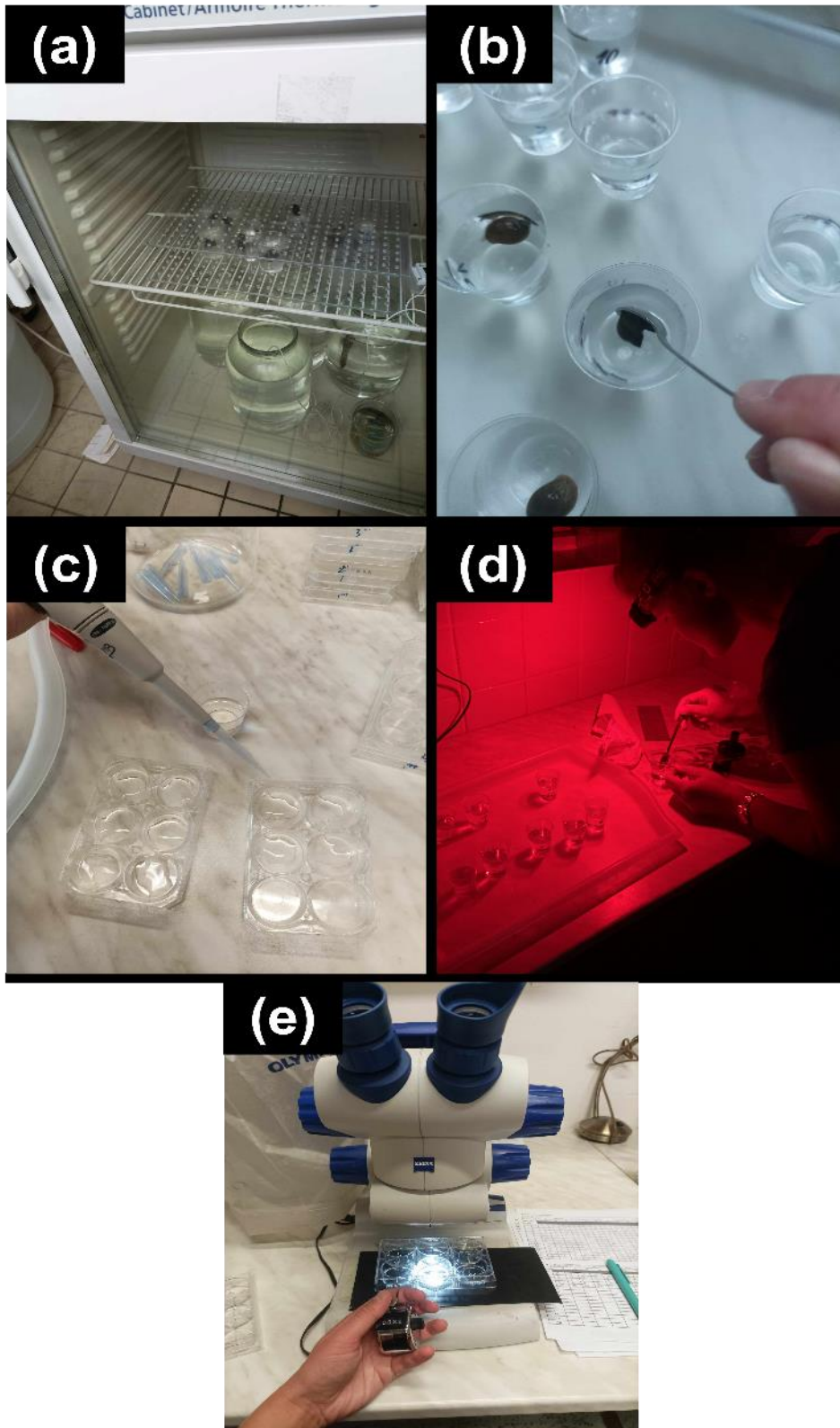
Všechny experimenty probíhaly po dobu třech dní, aby bylo zajištěno získání robustních dat v následném statistickém hodnocení. Před zahájením experimentů byli infikováni plži motolicemi *O. ranae* a *E. recurvatum* vloženi do čistých transparentních kelímků s vodou (30 ml) z jezera Most a vloženi do inkubátoru s prosklenými dveřmi (kvůli propustnosti světla imitující přirozenou fotoperiodu v každé sezóně), kde byli aklimatizováni

na příslušnou konstantní teplotu po dobu 24 h (Obr. 6a). Během této doby nebyla plžům podávána potrava, která by mohla ovlivnit denní produkci cercárií (Sepällä a kol., 2015).

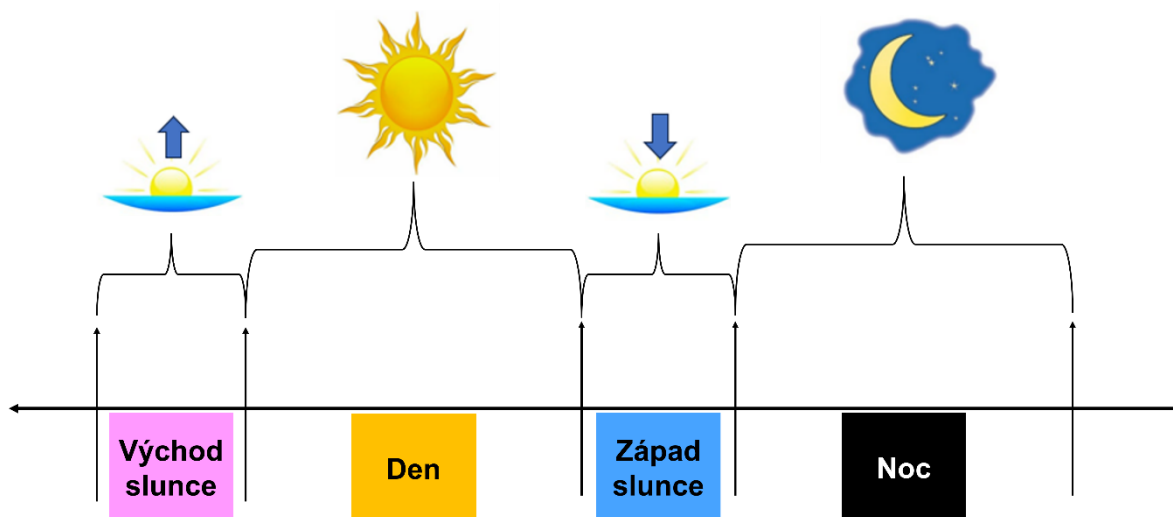
Vyplouvání cercárií bylo sledováno 4× denně tak, aby byly pokryty hlavní části dne, tzn. východ slunce, den, západ slunce a noc (Obr. 7), protože vzory ve vyplouvání cercárií závisí na světelných podmínkách právě v těchto denních intervalech (Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022). Plži byli ponecháni v kelímkách s 30 ml vody v inkubátoru po dobu každého časového intervalu. Poté byli plži opatrně přesunuti pomocí lžičky do čistých kelímků s vodou (30 ml) a vloženi zpět do inkubátoru po dobu dalšího časové intervalu (Obr. 6b). Z každého kelímku byla řádně promíchaná voda s cercáriemi pipetována 10× po 1 ml do 6-ti jamkových destiček (Obr. 6c). Během experimentů byl striktně dodržován světelný režim dne, tzn. že během tmavých částí dne byla použita čelová lampa s červených světlem, aby se zabránilo případné stimulaci vyplouvání cercárií přímým osvětlením bílého světla (Obr. 6d). Počet cercárií v každé jamce byl pak mechanicky počítán pomocí stereomikroskopu a zapsán do protokolu (Obr. 6e).

Po dokončení experimentů byli experimentální plži podrobeni parazitologické pitvě s cílem určit intenzitu infekce daným druhem motolice. Intenzita infekce byla stanovena vizuálně odhadem procentuálního zastoupení larválních stádií v hepatopankreatu (sporocyst u *O. ranae* a redií u *E. recurvatum*) u každého plže.

Během všech experimentů byla každých 5 minut sledována teplota vody a světelné podmínky (intenzita světa) pomocí dataloggeru.



Obr. 6 Metodika experimentů s vyplouváním cercárií. **(a)** standardizované experimentální podmínky: inkubátor s plži, **(b)** přesun plžů do čistého kelímku s vodou po uplynutí daného časového úseku, **(c)** odběr vody s cercáriemi do 6-ti jamkových destiček, **(d)** přesun plžů během tmavých částí dne, **(e)** manuální počítání cercárií pod binokulární lupou.



Obr. 7 Časový plán experimentů s vyznačenými denními úseky (východ slunce, den, západ slunce a noc).

4.6. Analýza dat

Denní produkce cercárií byla stanovena následovně (dle protokolů Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022): z každého plže byl vypočítán průměrný počet vyplavaných cercárií (z 10×1 ml odebraných vzorků do 6-ti jamkových destiček) a poté byl průměr vynásoben celkovým objemem vody v kelímku (30 ml). Toto bylo provedeno pro každý časový úsek. Následně byla data sečtena přes 4 časové úseky, počet plžů a experimentální dny. Z těchto dat byl vypočítán průměrný počet vyplavaných cercárií na jednoho plže a jeden den pro každý druh motolice a sezónu (čili průměrná denní produkce cercárií během 24 h).

Denní rytmy ve vyplouvání cercárií byly stanoveny následovně (dle protokolů Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022): z každého plže byl vypočítán průměrný počet vyplavaných cercárií (z 10×1 ml odebraných vzorků do 6-ti jamkových destiček) a poté byl průměr vynásoben celkovým objemem vody v kelímku (30 ml) pro každý časový úsek. Následně byla data sečtena přes počet plžů a experimentální dny. Z těchto dat byl vypočítán průměrný počet vyplavaných cercárií na jednoho plže a jeden den pro každý druh motolice a sezónu v daném časovém úseku. Vzhledem k rozdílným délkám denních/časových úseků v průběhu 24 h v každé sezóně (v závislosti na sezónní fotoperiodě; květen a červenec: východ slunce 40 min, den 945 min, západ slunce 40 min a noc 415 min; září: východ slunce 30 min, den 750 min, západ slunce 30 min a noc 630 min), byla tato pozorovaná data o počtu vyprodukovaných cercárií standardizována na 60 min. Takto přepočítaná data umožnila identifikovat vrcholy ve vyplouvání cercárií v průběhu 24 h, tzn. ve které části dne vyplouvá největší množství cercárií (čili definovat rytmy ve vyplouvání cercárií).

Rozdíly v denní produkci cercárií mezi jednotlivými sezónami nebyly statisticky analyzovány kvůli odlišným počtům experimentálních plžů (Tab. 1). V některých sezónách byl navíc počet plžů nízký, konkrétně 3 plži infikovaní druhem *E. recurvatum* v květnu a 4 plži infikovaní druhem *O. ranae* v září (Tab. 2). To by mohlo vést k podjatosti (tzv. bias) čili k systematické chybě dat (v tomto případě v průměrných počtech vyplavaných cercárií) a následné chybné interpretaci. Z tohoto důvodu jsou data o denní produkci cercárií mezi sezónami uvedena v tabulce a vizualizována graficky.

Denní rytmy ve vyplouvání cercárií byly statisticky hodnoceny pomocí testu Repeated Measures ANOVA a následné metody post-hoc Tukeyho mnohonásobného porovnání vzorků (Tukey's HSD „Honestly Significant Difference“ test), která se používá ke zjištění statisticky prokazatelných odlišností mezi dvojicemi testovaných skupin (Lepš a Šmilauer, 2016), zde počtu vyplavaných cercárií mezi jednotlivými denními časovými intervaly. Avšak před statistickým zhodnocením dat byla nejprve provedena grafická vizualizace počtu vyplavaných cercárií z každého jedince plže s cílem posoudit konzistenci v periodicitě ve vyplouvání cercárií během jednotlivých časových intervalů napříč experimentálními dny a sezónami u každého druhu motolice. Zde konkrétně byl použit počet vyplavaných cercárií z počátečního počtu plžů v experimentech, celkem 34 plžů (19 pro *O. ranae* a 15 pro *E. recurvatum*; Tab. 1 a 2). Pro následnou analýzu Repeated Measures Anova a korelační analýzu (viz níže) byly použity údaje pouze z přeživších plžů; celkem 29 plžů (18 pro *O. ranae* a 11 pro *E. recurvatum*; Tab. 1 a 2). Rozdíly v počtech vyplavaných cercárií mezi jednotlivými časovými úseky u druhu *E. recurvatum* bylo možné testovat pomocí Repeated Measures Anova pouze pro měsíc září kvůli dostatečnému množství dat (tzn. 8 plžů vs 3 v květnu; Tab. 2). Pro robustnost dat při statistické analýze je potřeba určitého množství vzorků a nejlépe by měly být skupiny studovaných vzorků stejně početné (Lepš a Šmilauer, 2016).

Jelikož vyplouvání cercárií z plžů může být ovlivněno řadou faktorů (viz kapitola Úvod), z nichž nevýznamnější jsou teplota a intenzita světla (např. Prokofiev a kol., 2015; Soldánová a Vyhlídalová, 2020; Soldánová a kol., 2022) či velikost/délka plže a intenzita infekce larválními stádii v plži (např. Graham, 2003; Morley a kol., 2010; Vyhlídalová a Soldánová, 2020), průměrný počet vyplavaných cercárií ve vztahu k těmto faktorům byl statisticky analyzován pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (r). Ten popisuje míru závislosti mezi dvěma veličinami (tzn. lineární vztah mezi dvěma kvantitativními proměnnými). Produkce cercárií z každého plže (zde zprůměrovaná data přes jednotlivé časové úseky) byla testována pouze ve vztahu k rozměru (délce ulit) plžů a intenzitě infekce, protože tyto biotické faktory obecně neovlivňují způsob, jakým jsou cercárie uvolňovány

z plžů v průběhu dne (tzn. rytmy/periodicita ve vyplouvání cercárií). Produkce cercárií v každém časovém úseku (zde zprůměrovaná data přes jedince plžů pro jednotlivé časové úseky) byla testována ve vztahu k teplotním a světelným podmínkám během východu a západu slunce, dne a noci, protože světelné podmínky byly variabilní v jednotlivých časových úsecích v závislosti na různých sezónách v roce, a tedy i počet cercárií byl různý. Navíc, intenzita světla a teplota byly identifikovány jako nejvýznamnější abiotické faktory regulující periodicitu ve vyplouvání cercárií (Thieltges a Rick, 2006; Prokofiev a kol., 2015). Korelační analýzou byla tak zároveň i provedena kontrola standardizovaných teplotních podmínek, tj. zda v průběhu experimentů nedocházelo k výrazným výkyvům teploty vody, které by mohly ovlivnit vyplouvání cercárií (Tab. 1). Účelem korelačních analýz bylo poskytnout další podpůrné informace pro výsledky denní produkce a hlavní výsledky statických analýz z Repeated Measures ANOVA hodnotící denní periodicitu ve vyplouvání cercárií.

Vliv velikosti plžů na celkovou denní produkci cercárií se může projevit nejen na úrovni jedinců plžů v rámci jedné sezóny (hodnoceno korelační analýzou), ale i mezi jednotlivými sezónami v roce. V této studii byli použiti experimentální plži různých sezónních velikostí (Tab. 2). Možný efekt byl zohledněn testem jednocestná ANOVA (one-way ANOVA) pro zhodnocení rozdílů v délce infikovaných plžů mezi měsíci.

Statistické analýzy byly provedeny na transformovaných počtech vyplavaných cercárií $\ln(x + 1)$ kvůli normalizaci a homogenitě dat. Délka plžů byla transformována jako $\ln(x)$ pouze u testu jednocestná ANOVA. Pro veškerou statistickou analýzu dat byl využit program Statistica 14.0. (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) a statistické rozdíly byly považovány za významné při $p < 0,05$ (hladina významnosti $\alpha = 0,05$).

5. Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 2167 plžů třech druhů, *A. balthica*, *A. lagotis* a *R. auricularia* během třech sezón (květen, červenec a září) na přítomnost cercárií motolic. Z celkového počtu vyšetřených plžů bylo infikováno 338 jedinců s prevalencí nákazy 15,6% (Tab. 1). Celková prevalence studovaných druhů motolic *O. ranae* a *E. recurvatum* byla během studovaných sezón nízká (*O. ranae*: 1,4 % s rozmezím 0,9–2,7%; *E. recurvatum* 1,0% s rozmezím 0,5–1,4%) se stoupající tendencí od května do září u druhu *E. recurvatum*, zatímco nejvyšší prevalence u druhu *O. ranae* byla zaznamenána v červenci (Tab. 1). Druh *O. ranae* se vyskytoval ve všech sezónách, ale pouze u jednoho druhu plže *A. lagotis* na jedné lokalitě, jezeře Most (Tab. 1 a 2). Druh *E. recurvatum* byl také nalezen ve všech sezónách, u všech druhů plžů (*A. balthica*, *A. lagotis* a *R. auricularia*) (Tab. 1) a na všech lokalitách (Tab. 1 a 2).

Celkem bylo nakaženo 53 plžů oběma druhy motolic, ale pouze 34 plžů (19 infikovaných *O. ranae* a 15 infikovaných *E. recurvatum*) bylo použito pro experimenty (Tab. 1 a 2) z důvodu úmrtí plžů během zpracovávání vzorků nebo během aklimatizace. Také z tohoto důvodu neproběhly experimenty s vyplouváním cercárií *E. recurvatum* v červenci, ačkoliv bylo nalezeno 5 infikovaných plžů (Tab. 1). Celkem 29 plžů přežilo všechny experimenty (18 infikovaných *O. ranae* a 11 infikovaných *E. recurvatum*) (Tab. 1 a 2). Pět plžů zemřelo v průběhu experimentů (1 infikovaný *O. ranae* v červenci a 4 infikovaných *E. recurvatum* v září) (Tab. 2). Údaje o produkci cercárií z těchto 29 plžů byly použity v následných statistických analýzách.

5.1. Denní produkce cercárií

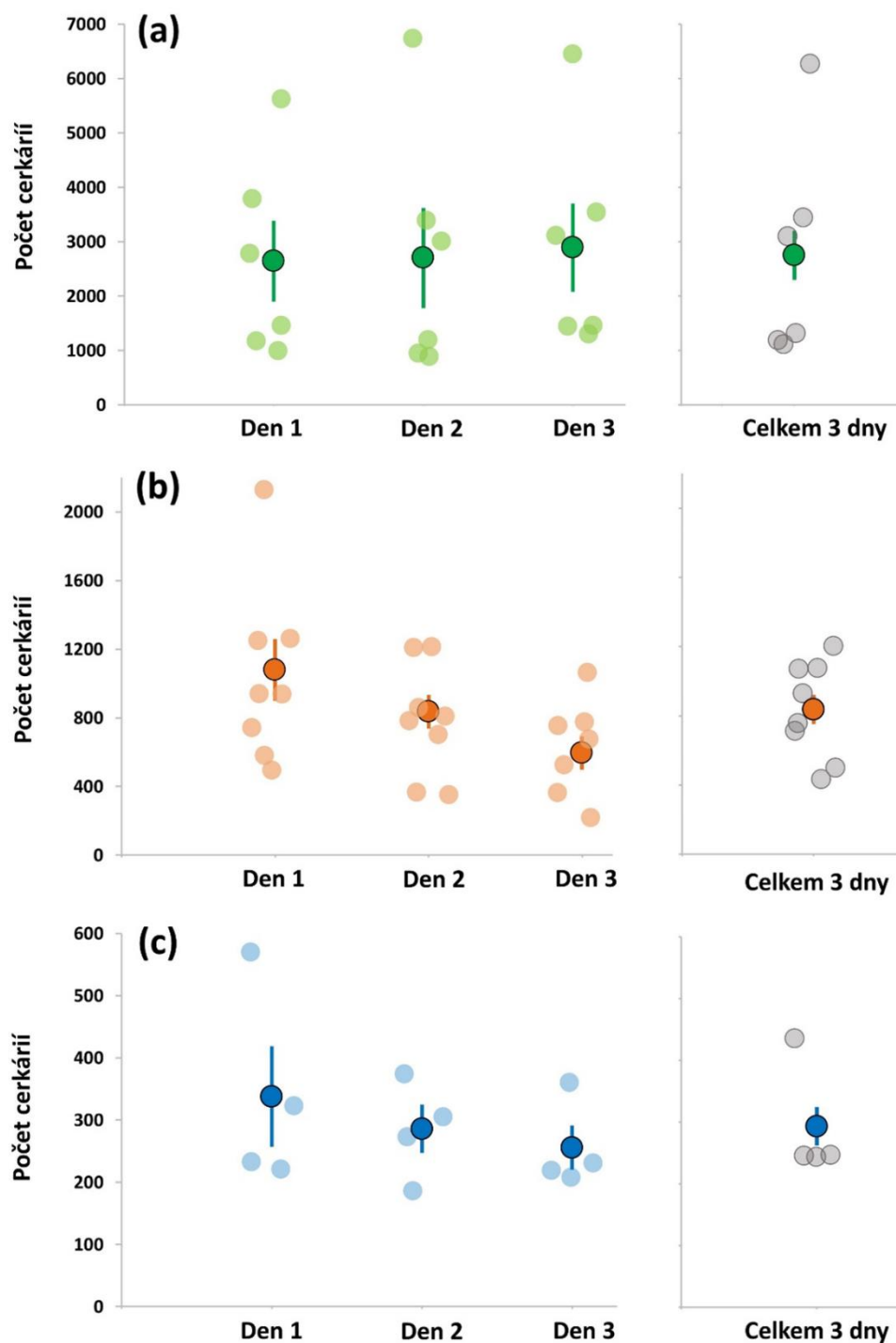
Individuální produkce cercárií, tj. denní produkce cercárií z jednotlivých plžů v každém experimentálním dni, se v jednotlivých sezónách lišila u obou druhů motolic (Obr. 8 a 9), kdy se u druhu *O. ranae* pohybovala v rozmezí 187–6744 cercárií a u druhu *E. recurvatum* v rozmezí 27–3078 cercárií (Tab. 3). Avšak, průměrná produkce cercárií, tj. průměr přes plže pro každý experimentální den, vykazuje v jednotlivých sezónách podobnou tendenci u každého druhu motolice (Obr. 8 a 9). Zatímco u druhu *O. ranae* byla průměrná produkce lehce vyšší v červenci a září v prvním dni experimentu (Obr. 8b a 8c; podobná produkce mezi dny je pozorována v květnu, Obr. 8a; Tab. 3), u druhu *E. recurvatum* byla průměrná produkce lehce vyšší ve druhém dni experimentu v obou sezónách (Obr. 9a a 9b; viz také Tab. 3).

Tab. 3 Denní produkce cercárií (během 24 h) druhů *Opisthoglyphe ranae* uvolněných z plžů rodů *Ampullaceana* a *Radix* v měsících květen, červenc a září a *Echinoparyphium recurvatum* v měsících květen a září (viz materiál v Tab. 2). Data jsou uvedena jako rozsah počtu vyplavaných cercárií (min–max) a průměr (\pm standardní odchylka, SD). Zkratky: n, počet experimentálních plžů; D1–D3, experimentální den 1–3.

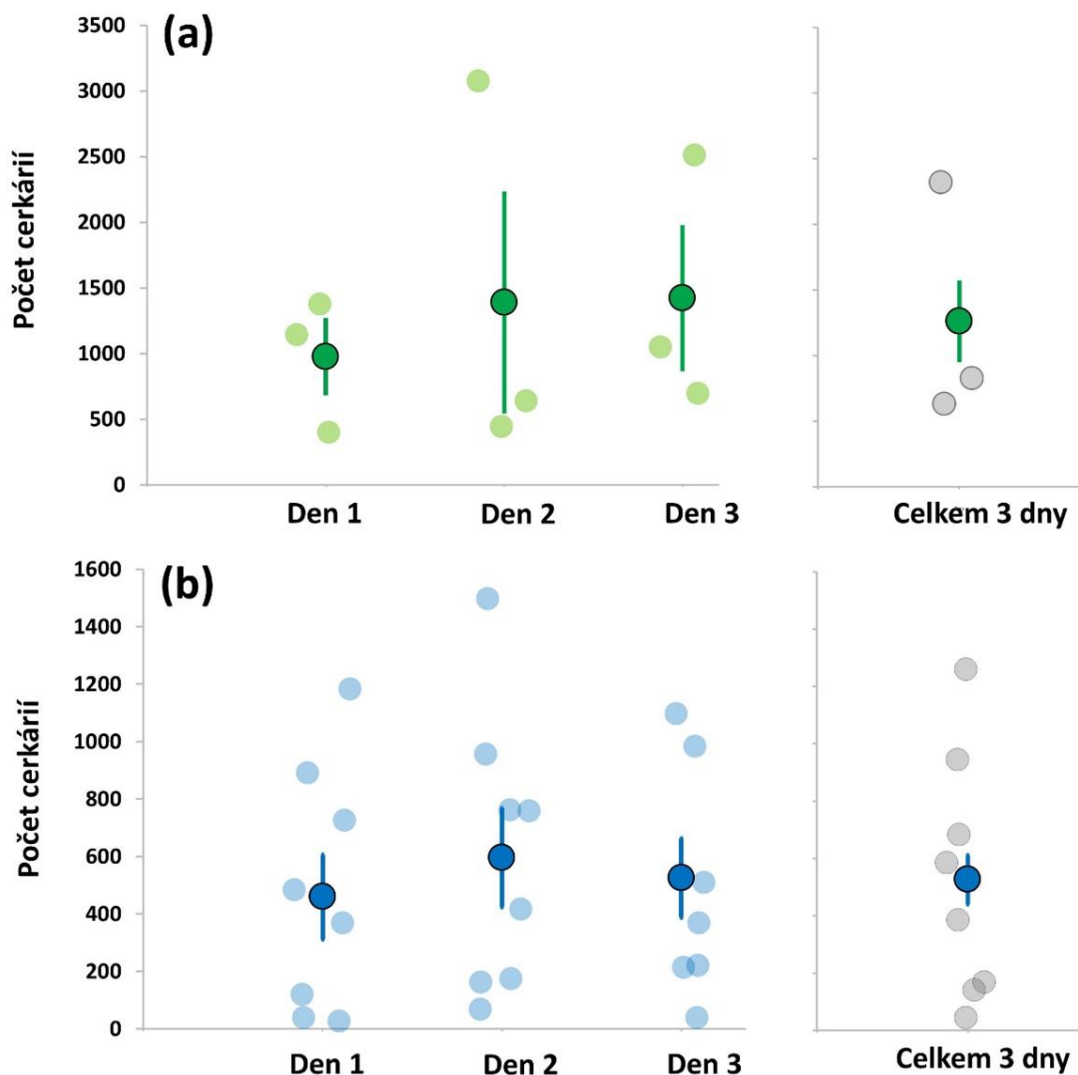
<i>Opisthoglyphe ranae</i>							<i>Echinoparyphium recurvatum</i>						
	D 1	D 2	D 3	Min–Max	Průměr \pm SD	Celkem		D 1	D 2	D 3	Min–Max	Průměr \pm SD	Celkem
Květen (n = 6)							Květen (n = 3)						
1O-K	2796	3402	3123	2796–3402	3107 \pm 303	9321	1E-K	1146	641	700	641–1146	829 \pm 276	2487
2O-K	3801	3021	3555	3021–3801	3459 \pm 399	10377	2E-K	402	446	1053	402–1053	634 \pm 364	1901
3O-K	1002	900	1471	900–1471	1124 \pm 305	3373	3E-K	1380	3078	2513	1380–3078	2324 \pm 865	6971
4O-K	1182	957	1455	957–1455	1198 \pm 249	3594							
5O-K	5634	6744	6459	5634–6744	6279 \pm 577	18837							
6O-K	1467	1209	1311	1209–1467	1329 \pm 130	3987							
Celkem	15882	16233	17374	900–6744	2749\pm1909	49489	Celkem	2928	4165	4266	402–3078	1262\pm938	11359
Červenec (n = 8)							Červenec						
1O-C	1035	744	371	371–1035	717 \pm 333	2150	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
2O-C	497	786	223	223–786	502 \pm 282	1506	–	–	–	–	–	–	–
3O-C	1263	1215	756	756–1263	1078 \pm 280	3234	–	–	–	–	–	–	–
7O-C	2130	705	777	705–2130	1204 \pm 803	3612	–	–	–	–	–	–	–
8O-C	1251	861	678	678–1251	930 \pm 293	2790	–	–	–	–	–	–	–
9O-C	942	1212	1065	942–1212	1073 \pm 135	3219	–	–	–	–	–	–	–
10O-C	939	810	528	528–939	759 \pm 210	2277	–	–	–	–	–	–	–
11O-C	582	357	369	357–582	436 \pm 127	1308	–	–	–	–	–	–	–
Celkem	8639	6690	4767	223–2130	837\pm407	20096	–	–	–	–	–	–	–

Tab. 3 Pokračování

Září (n = 4)							Září (n = 8)						
1O-Z	324	187	220	187–324	244±72	731	1E-Z	560	727	762	560–762	683±108	2049
2O-Z	222	306	209	209–306	246±53	737	2E-Z	369	417	369	369–417	385±28	1155
3O-Z	571	375	361	361–571	436±117	1307	3E-Z	484	759	510	484–759	584±152	1753
4O-Z	234	274	232	232–274	247±24	740	5E-Z	1183	1498	1097	1097–1498	1259±211	3778
							8E-Z	39	163	222	39–222	141±93	424
							10E-Z	120	174	214	120–214	169±47	508
							11E-Z	891	957	985	891–985	944±48	2833
							12E-Z	27	69	39	27–69	45±22	135
Celkem	1351	1142	1022	187–571	293±107	3515	Celkem	3673	4764	4198	27–1498	526±451	12635



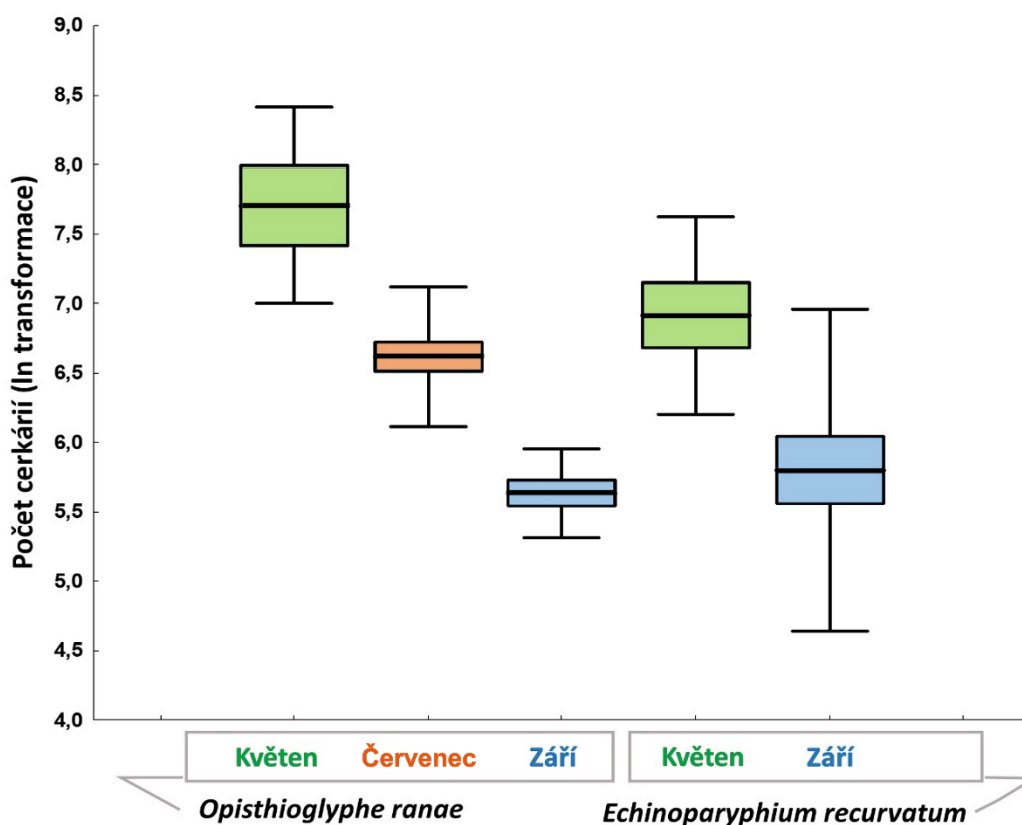
Obr. 8 Sezónní rozdíly v denní produkci cercárií druhu *Opisthioglyphe ranae* v měsících (a) květen, (b) červenec a (c) září. Grafy vlevo znázorňují produkci cercárií pro každý za sebou jdoucí den experimentu. Body odpovídají jednotlivým experimentálním plžům použitých v experimentu, tmavší bod znázorňuje průměrnou produkci cercárií ze všech experimentálních plžů během 24 h. Grafy vpravo ukazují průměrný počet vyplavaných cercárií přes 3 dny z jednotlivých experimentálních plžů a celkovou průměrnou produkci na plže/den.



Obr. 9 Sezónní rozdíly v denní produkci cercárií druhu *Echinoparyphium recurvatum* v měsících (a) květen a (b) září. Grafy vlevo znázorňují produkci cercárií pro každý za sebou jdoucí den experimentu. Body odpovídají jednotlivým experimentálním plžům použitých v experimentu, tmavší bod znázorňuje průměrnou denní produkci cercárií ze všech experimentálních plžů během 24 h. Grafy vpravo ukazují průměrný počet vyplavaných cercárií přes 3 dny z jednotlivých experimentálních plžů a celkovou průměrnou produkci na plže/den.

Celková průměrná denní produkce, tj. celkový počet vyplavaných cercárií z jednoho plže během 72 h, byla nejvyšší v květnu u obou druhů motolic (Obr. 10, Tab. 3); *O. ranae*: 2749 cercárií/plž/den (viz také Obr. 8a) a *E. recurvatum*: 1262 cercárií/plž/den (viz také Obr. 9a). V následujících měsících byl pak průměrný počet vyprodukovaných cercárií výrazně nižší, u *O. ranae* v červenci 3× méně a v září dokonce 9× méně než v květnu (Obr. 10, Tab. 3) a u *E. recurvatum* v září téměř 2,5× méně než v květnu (Obr. 10, Tab. 3). Při porovnání

sezónní denní produkce cercárií mezi druhy sledovaných motolic byla v květnu pozorována 2× vyšší produkce u druhu *O. ranae* než u druhu *E. recurvatum* (Obr. 10, Tab. 3). Naopak v září byla produkce cercárií *E. recurvatum* přibližně 2× (1,8×) vyšší než u *O. ranae* (Obr. 10, Tab. 3). Důvodem kontrastního rozdílu mezi počtem cercárií *O. ranae* a *E. recurvatum* v květnu a září mohou být rozdílné počty experimentálních plžů (6 vs 3 a 4 vs 8; Tab. 2 a 3), velikost experimentálních plžů v jednotlivých sezónách (Tab. 2) i mezi sezónami, intenzita infekce v plžích či teplota vody v jednotlivých sezónách (Tab. 1) (viz. Metodika pro přehled testovaných biotických a abiotických faktorů).



Obr. 10 Sezónní rozdíly v celkové denní produkci (ln transformovaná data) dvou druhů *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum*. Krabicová část diagramu (box) vyjadřuje průměr±SE, horizontální linie vyjadřuje aritmetický průměr a vousy (whiskers) vyjadřují aritmetický průměr±SD, tj. rozdíly mezi minimem a maximem.

5.2. Denní vzory ve vyplouvání cercárií

Vzory ve vyplouvání cercárií v průběhu 24 hodin byly sledovány s cílem definovat časový interval (východ slunce, den, západ slunce nebo noc), během kterého byla produkce cercárií z mezihostitelských plžů nejvyšší.

U obou druhů motolic *O. ranae* a *E. recurvatum* byla pozorována velká variabilita v počtu vyprodukovaných cercárií během jednotlivých časových úseků (Tab. 4 část vlevo). Vzhledem k jejich rozdílným délkám nebylo ale možné stanovit vzory ve vyplouvání. Až přepočítání cercárií na 60 min umožnil poskytnout zřetelnější informace o periodicitě ve vyplouvání cercárií (Tab. 4, část vpravo) a určit tak, že rytmy ve vyplouvání cercárií jsou u obou druhů motolic cirkadiánní a diurnální, tj. s jedním vrcholem v průběhu 24 h ve světlé části dne (Obr. 11 a 12). Produkce cercárií z jednotlivých plžů byly (až na pár výjimek) ve své periodicitě konzistentní pro oba druhy motolic (Obr. 11 a 12). Jinými slovy, mezi jednotlivými experimentálními plži nebyla zaznamenána téměř žádná variabilita v produkci cercárií, protože nejvyšší počet cercárií byl zaznamenán z většiny plžů ve stejný časový úsek přes všechny experimentální dny.

U druhu *O. ranae* byly cercárie nejvíce produkovány v průběhu západu slunce (Obr. 11). Tento trend byl pozorován ve všech 3 sezónách, ovšem s mírně větší variabilitou v červenci a září (Obr. 11b a 11c), kdy byla u některých jedinců plžů detekována vyšší produkce v průběhu noci nebo východu slunce. Tato mírná odchylka ve vyplouvání ale nebyla pro tyto plže konzistentní pro všechny experimentální dny (např. 8O-C, Obr. 11b; 1O-Z, 2O-Z a 3O-Z, Obr. 11c). Cercárie *O. ranae* pocházely z jednoho druhu plže *A. lagotis* (Tab. 2). U druhu *E. recurvatum* byl vrchol ve vyplouvání cercárií odlišný od druhu *O. ranae*, jelikož bylo nejvíce cercárií produkováno v průběhu časového intervalu den (Obr. 12). Tento trend byl pozorován v obou sezónách, jak v květnu (Obr. 12a), tak i v září (Obr. 12b). U některých jedinců plžů byla sice detekována vyšší produkce v průběhu západu slunce, ale nebyla konzistentní pro všechny experimentální dny (např. 2E-K, Obr. 12a; 8E-Z a 9E-Z, Obr. 12b). Cercárie *E. recurvatum* pocházely ze 3 druhů plžů *A. balthica*, *A. lagotis* a *R. auricularia*, a to konkrétně v září (Tab. 2). Avšak, u všech byly pozorovány stejné vrcholy ve vyplouvání cercárií během časového intervalu den v průběhu všech experimentálních dní (Obr. 12b), tudíž odlišné druhy plžů neměly vliv na denní rytmy ve vyplouvání cercárií druhu *E. recurvatum*.

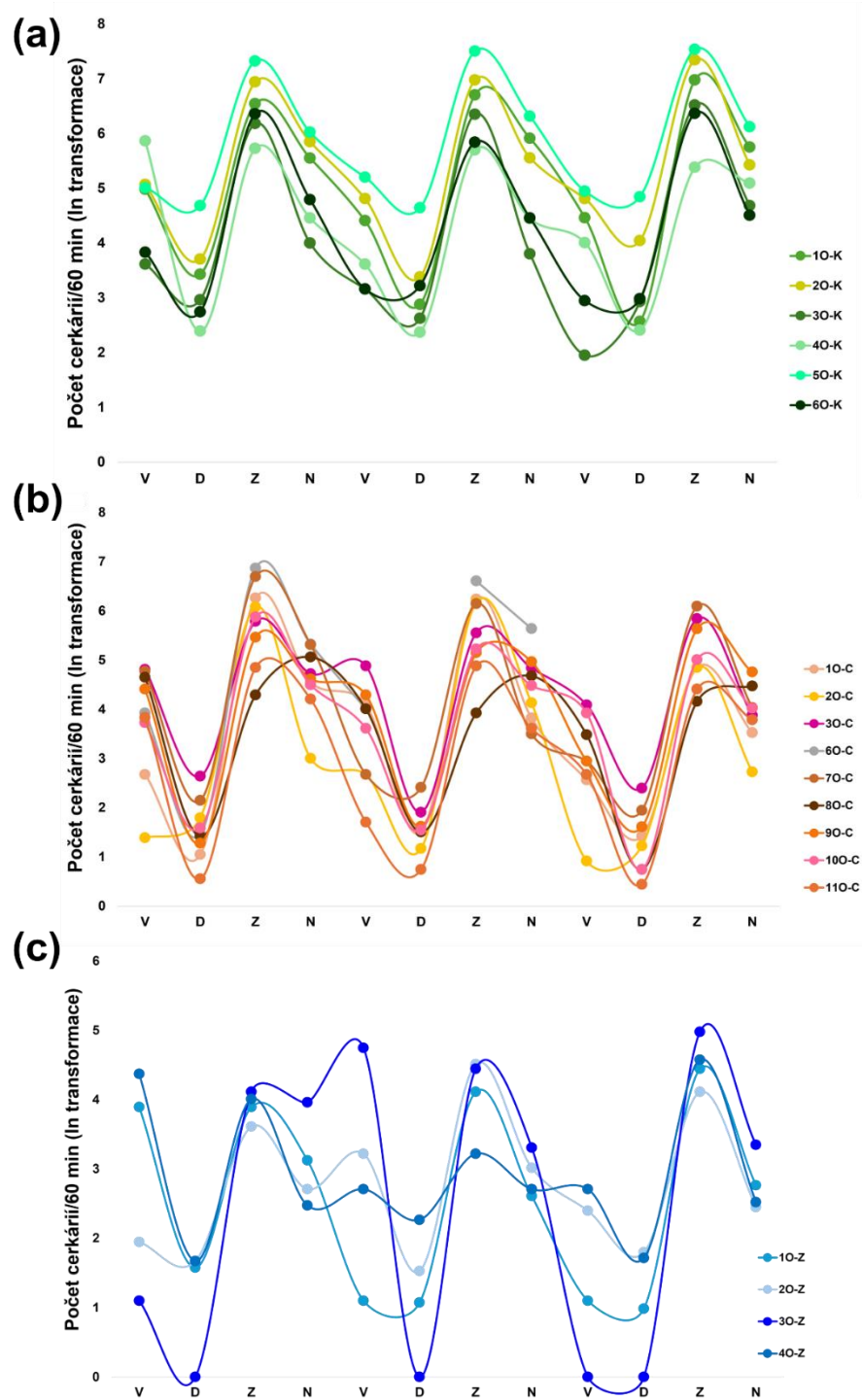
I přes mírnou variabilitu ve vrcholech vyplouvání cercárií, lze vzory ve vyplouvání cercárií považovat za konzistentní pro všechny plže, a tudíž jednotné pro každý druh motolice; u *O. ranae* během západu slunce (Obr. 11) a u *E. recurvatum* během dne (Obr. 12).

Tab. 4 Produkce cercárií druhů *Opisthioglyphe ranae* (květen, červenec, září) a *Echinoparyphium recurvatum* (květen, září) z plžů rodu *Ampullaceana* a *Radix* během jednotlivých denních úseků. Celkový počet vyplavaných cercárií a průměrný počet (v závorkách) je znázorněn pro pozorovaná data (vlevo) a pro přepočítaná data na 60 minut (vpravo). Zkratky: n, počet experimentálních plžů.

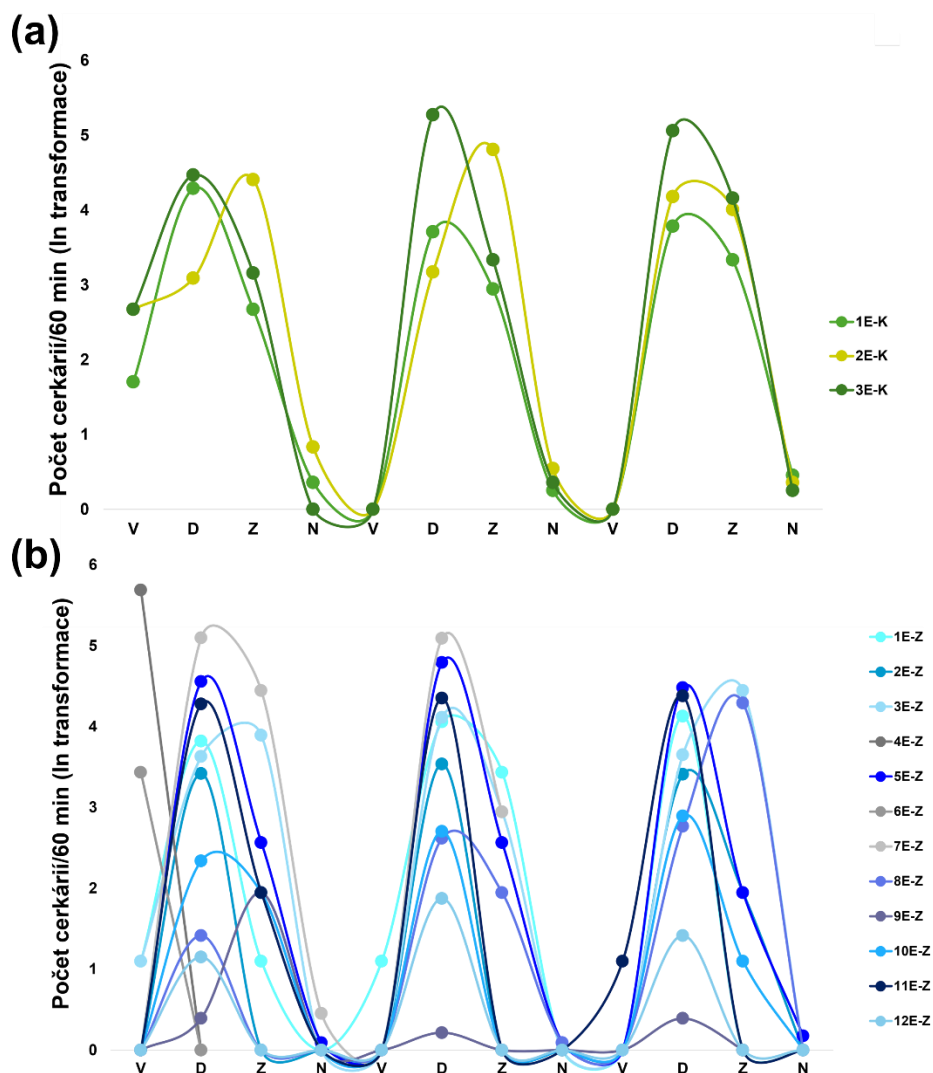
<i>Opisthioglyphe ranae</i>									
Sezóna	Den	Denní interval/Pozorovaný počet cercárií				Denní interval/Přepočítaný počet cercárií (60 min)			
Květen (n = 6)		Východ slunce (4:25-5:05)	Den (5:05-20:50)	Západ slunce (20:50-21:30)	Noc (21:30-4:25)	Východ slunce (4:25-5:05)	Den (5:05-20:50)	Západ slunce (20:50-21:30)	Noc (21:30-4:25)
	Den 1	588 (98)	3447 (575)	3066 (511)	8781 (1464)	882 (147)	219 (36)	3906 (767)	1014 (212)
	Den 2	309 (52)	3057 (510)	3273 (546)	9594 (1599)	464 (77)	194 (32)	240 (818)	218 (231)
	Den 3	283 (47)	3786 (631)	3972 (662)	9333 (1556)	425 (71)	240 (40)	5958 (993)	1349 (225)
	Celkem	1180 (66)	10290 (572)	10311 (573)	27708 (1539)	1770 (98)	653 (36)	14774 (859)	3750 (223)
Červenec (n = 8)		(4:35-5:15)	(5:15-21:00)	(21:00-21:40)	(21:40-4:35)	(4:35-5:15)	(5:15-21:00)	(21:00-21:40)	(21:40-4:35)
	Den 1	350 (44)	591 (74)	1917 (240)	5781 (723)	525 (66)	38 (5)	2876 (359)	836 (104)
	Den 2	255 (32)	552 (69)	1494 (187)	4389 (549)	383 (48)	35 (4)	2241 (280)	635 (79)
	Den 3	135 (17)	453 (57)	1071 (134)	3108 (389)	203 (25)	29 (4)	1607 (201)	449 (56)
	Celkem	740 (31)	1596 (67)	4482 (187)	13278 (553)	1110 (46)	101 (4)	6723 (280)	1920 (80)
Září (n = 4)		(6:10-6:40)	(6:40-19:10)	(19:10-19:40)	(19:40-6:10)	(6:10-6:40)	(6:40-19:10)	(19:10-19:40)	(19:40-6:10)
	Den 1	67 (17)	156 (39)	99 (25)	1029 (257)	134 (34)	12 (3)	198 (50)	98 (25)

Tab. 4 Pokračování

Den 2	77 (19)	177 (44)	129 (32)	759 (190)	154 (39)	14 (4)	258 (65)	72 (18)
Den 3	13 (3)	142 (36)	192 (48)	675 (169)	26 (7)	11 (3)	384 (96)	64 (16)
Celkem	157 (13)	475 (40)	420 (35)	2463 (205)	314 (26)	38 (3)	840 (70)	235 (20)
<i>Echinoparyphium recurvatum</i>								
Květen (n = 3)	Východ slunce (4:25-5:05)	Den (5:05-20:50)	Západ slunce (20:50-21:30)	Noc (21:30-4:25)	Východ slunce (4:25-5:05)	Den (5:05-20:50)	Západ slunce (20:50-21:30)	Noc (21:30-4:25)
Den 1	21 (7)	2817 (939)	78 (26)	12 (4)	32 (11)	179 (60)	117 (39)	2 (1)
Den 2	0 (0)	4044 (1348)	111 (37)	10 (3)	0 (0)	257 (86)	167 (56)	1 (0)
Den 3	0 (0)	4161 (1387)	96 (32)	9 (3)	0 (0)	264 (88)	144 (48)	1 (0)
Celkem	21 (2)	11022 (1225)	285 (32)	31 (3)	32 (4)	700 (78)	428 (48)	4 (0)
Září (n = 8)	(6:10-6:40)	(6:40-19:10)	(19:10-19:40)	(19:40-6:10)	(6:10-6:40)	(6:40-19:10)	(19:10-19:40)	(19:40-6:10)
Den 1	2 (0)	3633 (454)	37 (5)	1 (0)	328 (1)	453 (36)	164 (9)	1 (0)
Den 2	1 (0)	4728 (591)	33 (4)	2 (0)	2 (0)	540 (47)	84 (8)	0 (0)
Den 3	1 (0)	4110 (514)	85 (11)	2 (0)	2 (0)	329 (41)	170 (21)	0 (0)
Celkem	4 (0)	12471 (520)	155 (6)	5 (0)	332 (0)	1322 (42)	418 (13)	1 (0)

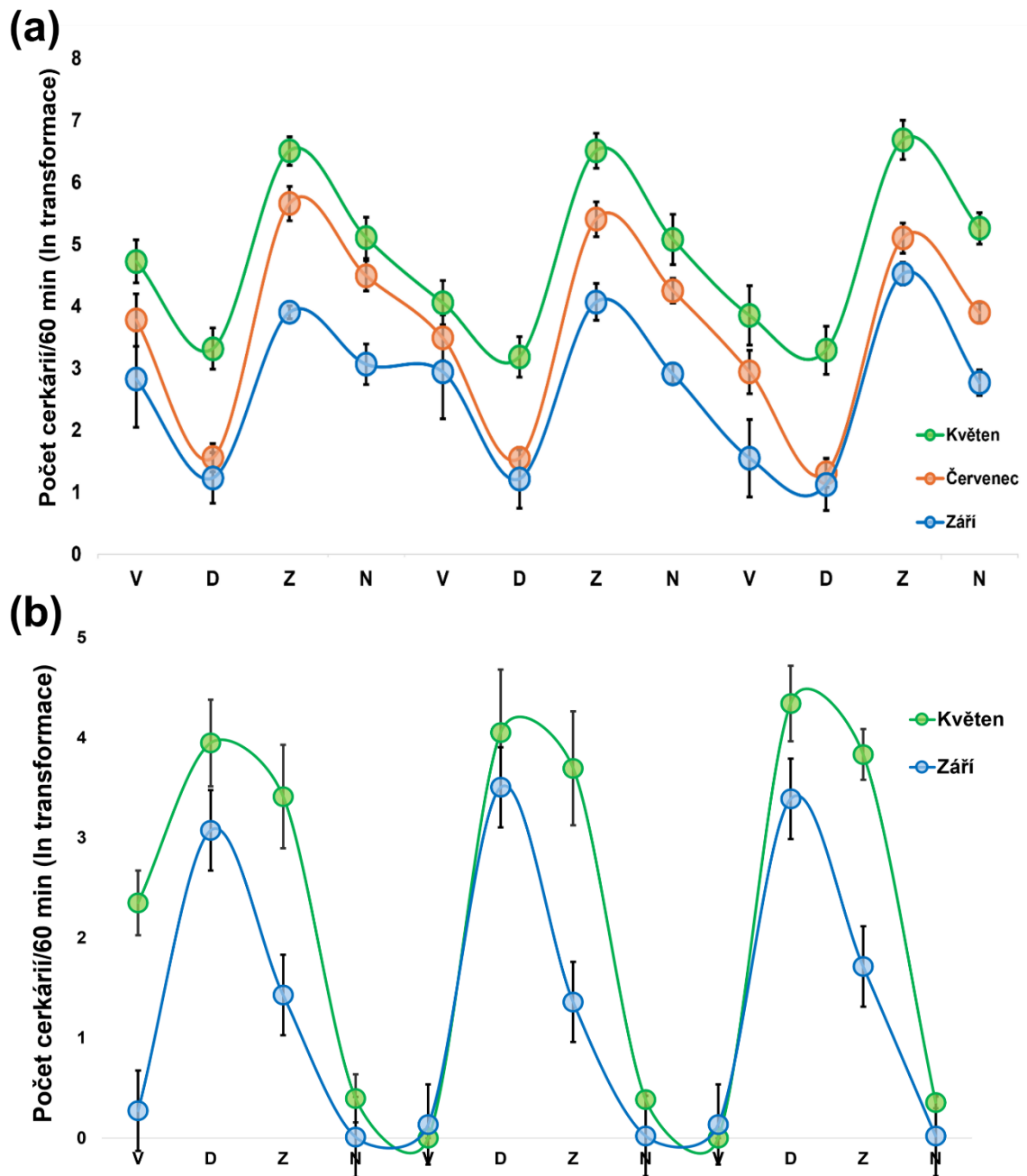


Obr. 11 Periodicita ve vyplouvání cercárií druhu *Opisthioglyphe ranae* z infikovaných plžů během jednotlivých časových úseků (V, východ slunce; D, den; Z, západ slunce; N, noc) v měsících (a) květen, (b) červenec a (c) září. Data jsou znázorněna pro jednotlivé jedince plžů a pro 3 po sobě jdoucí experimentální dny.

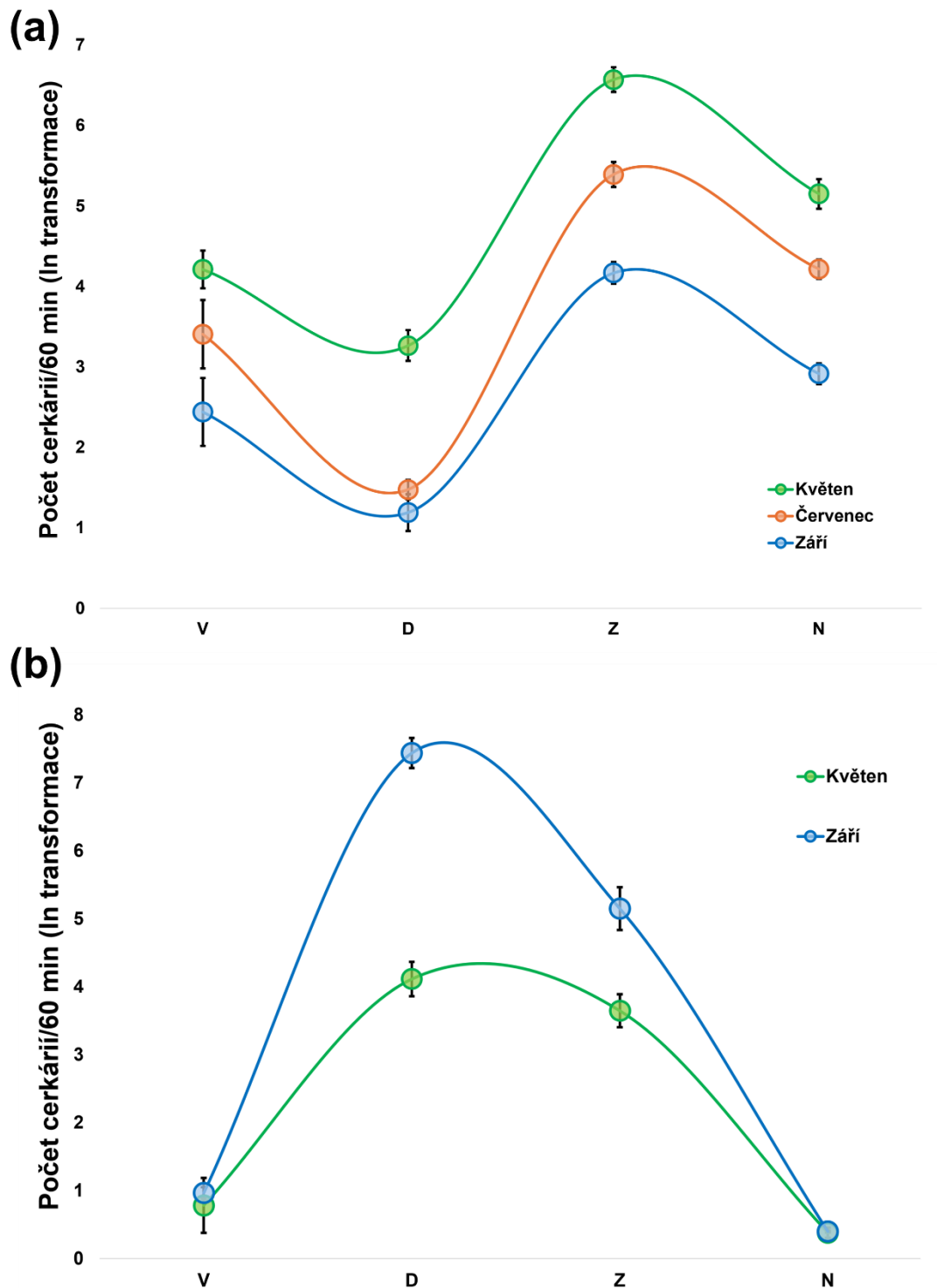


Obr. 12 Periodicita ve vyplouvání cercárií druhu *Echinoparyphium recurvatum* z infikovaných plžů během jednotlivých časových úseků (V, východ slunce; D, den; Z, západ slunce; N, noc) v měsících (a) květen, (b) září. Data jsou znázorněna pro jednotlivé jedince plžů a pro 3 po sobě jdoucí experimentální dny.

Následně bylo pro zhodnocení vlivu sezóny na rytmy ve vyplouvání cercárií zhotoveno přehlednější grafické znázornění dat v podobě průměru počtu vyplavaných cercárií přes všechny experimentální plže (Obr. 13) i přes experimentální dny (Obr. 14). V obou případech je zřetelná stejná sezónní periodicita v produkci cercárií v daných časových úsecích pro každý druh motolice. Cercárie *O. ranae* vykazují vrcholy v produkci během západu slunce v květnu, červenci i září (Obr. 13a a 14a) a *E. recurvatum* v průběhu dne v květnu i září (Obr. 13b a 14b), což naznačuje, že odlišná fotoperioda čili odlišné světelné podmínky v různých sezónách nemají vliv na denní rytmy ve vyplouvání cercárií studovaných motolic.



Obr. 13 Periodicita ve vyplouvání cercárií dvou druhů **(a)** *Opisthioglyphe ranae* a **(b)** *Echinoparyphium recurvatum* z plžů během jednotlivých časových úseků (V, východ slunce; D, den; Z, západ slunce; N, noc) ve třech sezónách (květen – zelená, červenec – oranžová a září – modrá); pro druh *O. ranae* a ve třech sezónách a pro druh *E. recurvatum* ve dvou sezónách. Data jsou znázorněna jako průměr vyplavaných cercárií ze všech plžů pro 3 po sobě jdoucí experimentální dny.



Obr. 14 Periodicita ve vyplouvání cercárií dvou druhů **(a)** *Opisthioglyphe ranae* a **(b)** *Echinoparyphium recurvatum* z plžů během jednotlivých časových úseků (V, východ slunce; D, den; Z, západ slunce; N, noc) ve třech sezónách (květen – zelená, červenec, oranžová a září – modrá); pro druh *O. ranae* a ve třech sezónách a pro druh *E. recurvatum* ve dvou sezónách. Data jsou znázorněna jako průměr vyplavaných cercárií za všech plžů a 3 experimentálních dní, tj. průměrný počet vyplavaných cercárií na plž/den.

Výše zmíněná pozorování o vrcholech ve vyplouvání cercárií (západ slunce pro *O. ranae* a den pro *E. recurvatum*) byla podpořena statisticky (Tab. 5). Testem Repeated measures ANOVA byl prokázán významný vliv 4 denních úseků na produkci cercárií druhu *O. ranae* ve všech sezónách (všechna $p < 0,001$; Tab. 5). Vliv faktoru den byl zjištěn pouze u experimentu v červenci (Tab. 5) kvůli výrazně vyšší produkci v prvním dni experimentu oproti třetímu dni (post-hoc, $p < 0,01$; Tab. 3). Interakce mezi dnem a denním intervalem (časovým úsekem) byla zjištěna pouze v květnu ($p < 0,05$; Tab. 5), která poukazuje na variabilitu v počtu vyplavaných cercárií v závislosti na obou faktorech. Dle Tukeyovy post-hoc metody mnohonásobného porovnání rozdílů byly v květnu a červenci statisticky prokázány rozdíly v počtu vyplavaných cercárií mezi všemi denními intervaly (Tab. 6, Obr. 14a). V září byly rozdíly potvrzeny hlavně pro počty cercárií produkovaných během západu slunce, které se ale zároveň nelišily od počtu vyplavaných během noci (Tab. 6, Obr. 14a). Nejvyšší produkce cercárií *O. ranae* při západu slunce byla tudíž potvrzena statisticky ve všech třech sezónách (Obr. 14a, Tab 4.). Produkce poté klesala k druhému nejvyššímu vrcholem v průběhu noci (kromě září) a nejnižší produkce byla pozorována během dne (Tab. 4 a 6, Obr. 14a).

U druhu *E. recurvatum* byl testem Repeated measures ANOVA také prokázán významný vliv 4 denních úseků na produkci cercárií ($p < 0,001$, Tab. 5). Vliv faktoru den ani interakce mezi dnem a denním intervalem nebyl prokázán (Tab. 5). Dle Tukeyovy post-hoc metody mnohonásobného porovnání rozdílů byly statisticky prokázány rozdíly v počtu vyplavaných cercárií mezi jednotlivými denními úseky, s výjimkou jednoho porovnání mezi východem slunce a nocí (Tab. 6). Nejvyšší produkce cercárií druhu *E. recurvatum* v průběhu dne byla tudíž potvrzena statisticky pouze v měsíci září (Tab. 6). Avšak vzhledem k podobnému průběhu periodicity i v květnu (Obr. 14b) se lze domnívat, že statistický výsledek by byl stejný, pokud by bylo k dispozici dostatečné množství pozorování. Produkce poté klesala k druhému nejvyššímu vrcholu v průběhu západu slunce a nejnižší produkce byla pozorována během noci (Tab. 4 a 6, Obr. 14b). Tyto výsledky opět prokazují, že odlišné světelné (do určité míry i teplotní) podmínky v různých sezónách nemají vliv na vzory ve vyplouvání cercárií, a to obou druhů studovaných motolic.

Tab. 5 Výsledky testu Repeated measures ANOVA hodnotící vliv sezóny a denního intervalu na počet vyplavaných cercárií druhů *Opisthio glyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum* z plžů dvou rodů *Ampullaceana* a *Radix*. Analýza byla provedena na základě přepočítaných dat na 60 min a za použití $\ln(x + 1)$ transformace. Zkratky: df, stupeň volnosti; MS, střední čtverec; F, hodnota testového kritéria; P, hladina významnosti. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny červeně.

	<i>Opisthio glyphe ranae</i>					<i>Echinoparyphium recurvatum</i>			
Experiment	Faktor	df	MS	F	P	df	MS	F	P
Květen	Intercept	1	1658,87	276,47	< 0,001	— ^a	— ^a	— ^a	— ^a
	Denní interval	3	35,67	67,33	< 0,001	—	—	—	—
	Den	2	0,261	3,98	0,05	—	—	—	—
	Denní interval*Den	6	0,38	2,84	< 0,05	—	—	—	—
Červenec	Intercept	1	1265,79	502,43	< 0,001	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b
	Denní interval	3	64,32	68,72	< 0,001	—	—	—	—
	Den	2	2,614	8,44	< 0,01	—	—	—	—
	Denní interval*Den	6	0,23	0,44	0,85	—	—	—	—
Září	Intercept	1	345,64	826,03	< 0,001	1	151,37	47,03	< 0,001
	Denní interval	3	17,95	15,16	< 0,001	3	56,16	34,07	< 0,001
	Den	2	0,392	0,51	0,62	2	0,114	0,19	0,83
	Denní interval*Den	6	0,83	1,18	0,36	6	0,22	0,49	0,81

^a Nízký počet plžů pro statistickou analýzu

^b Experiment nebyl proveden z důvodu úmrtí infikovaných plžů před experimenty

Tab. 6 Výsledky Tukeyovy post-hoc metody mnohonásobného porovnání rozdílů v počtu vyplavaných cercárií druhů *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum* z plžů rodu *Ampullaceana* a *Radix* mezi jednotlivými denními úseky. Analýza byla provedena na základě přepočítaných dat na 60 min pro jednotlivé časové úseky a za použití $\ln(x + 1)$ transformace. Zkratky: V, východ; D, den; Z, západ; N, noc; P, hladina významnosti. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny červeně.

<i>Opisthioglyphe ranae</i>			<i>Echinoparyphium recurvatum</i>	
Experiment	Denní interval	P	Denní interval	P
Květen	V > D	p < 0.01	– ^a	– ^a
	V < Z	p < 0.001	–	–
	V < N	p < 0.01	–	–
	D < Z	p < 0.001	–	–
	D < N	p < 0.001	–	–
	Z > N	p < 0.001	–	–
Červenec	V > D	p < 0.001	– ^b	– ^b
	V < Z	p < 0.001	–	–
	V < N	p < 0.05	–	–
	D < Z	p < 0.001	–	–
	D < N	p < 0.001	–	–
	Z > N	p < 0.01	–	–
Září	V = D	p = 0.09	V < D	p < 0.00
	V < Z	p < 0.05	V < Z	p < 0.01
	V = N	p = 0.71	V = N	p = 0.97
	D < Z	p < 0.001	D > Z	p < 0.001
	D < N	p < 0.05	D > N	p < 0.001
	Z = N	p = 0.08	Z > N	p < 0.01

^a Nízký počet plžů pro statistickou analýzu

^b Experiment nebyl proveden z důvodu úmrtí infikovaných plžů před experimenty

5.3. Vliv testovaných faktorů

Teplota vody v inkubátoru v průběhu všech experimentů výrazně nekolísala (průměr přes 3 dny experimentu, *O. ranae*: 19,3°C v květnu, 21,6°C v červenci a 17,9°C v září; *E. recurvatum*: 19,3°C v květnu a 17,9°C v září). Přesto byla prokázána negativní korelace mezi průměrnou teplotou a počtem vyplavaných cercárií *O. ranae* pro každý den experimentu v květnu (rozmezí teplot během 3 experimentálních dní: 19,1–19,5°C) a dva dny experimentu září (17,9–18,0°C), ale žádný významný vztah mezi těmito parametry nebyl zjištěn pro průměrné hodnoty teplot přes 3 experimentální dny (Tab. 7). U *E. recurvatum* nebyla prokázána korelace v produkci cercárií a experimentální teplotou (Tab. 7).

Světelné podmínky v průběhu všech experimentů výrazně kolísaly v závislosti na denní fotoperiodě v každé sezóně (Obr. 15a–e). U obou druhů motolic byl zjištěn signifikantní vztah mezi intenzitou světla a počtem vyplavaných cercárií mezi jednotlivými denními

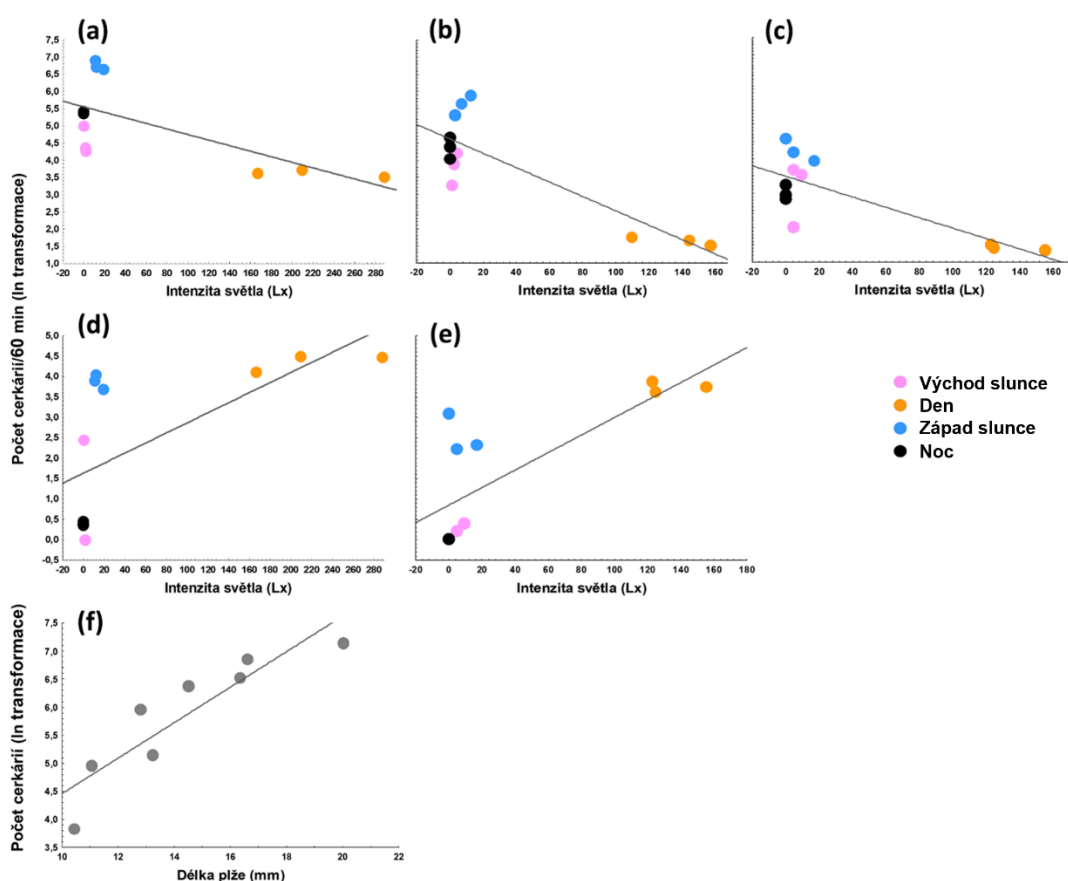
intervaly (Tab. 7). U druhu *O. ranae* byla prokázána negativní korelace, tzn. nejvyšší produkce cercárií byla pozorována při snížené intenzitě světla (Tab. 7), a to ve všech sezónách (Obr. 15a–c). U druhu *E. recurvatum* byla prokázána pozitivní korelace, tzn. nejvyšší produkce cercárií byla naopak pozorovaná při vyšší intenzitě světla (Tab. 7), a to opět v obou sezónách (Obr. 15d–e).

Tab. 7 Výsledky korelační analýzy testující vztah mezi produkcí cercárií druhů *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum* uvolněných z plžů rodů *Ampullaceana* a *Radix* a různými faktory, jako je teplota vody, intenzita světla, velikost (délka) plžů a intenzita infekce. Data jsou uvedena pro každý den experimentu i pro tři dny dohromady (sdružená data). Zkratky: r, Pearsonův lineární korelační koeficient; P, hladina významnosti. Statisticky významné výsledky jsou zvýrazněny červeně.

Druh motolice/ Experimenty	Počet plžů	Teplota		Intenzita světla		Délka plže		Intenzita infekce	
		r	P	r	P	r	P	r	P
<i>Opisthioglyphe ranae</i>									
Květen									
Den 1	6	-0,990	< 0,01	-0,789	0,21	0,648	0,16	0,466	0,35
Den 2	6	-0,978	< 0,05	-0,685	0,31	0,674	0,14	0,379	0,46
Den 3	6	-0,973	< 0,05	-0,605	0,40	0,799	0,06	0,466	0,35
Sdružená data	6	-0,555	0,06	-0,671	< 0,05	0,714	0,11	0,439	0,38
Červenec									
Den 1	8	-0,862	0,14	-0,896	0,10	0,216	0,60	0,356	0,39
Den 2	8	-0,874	0,13	-0,879	0,12	0,704	0,05	0,530	0,18
Den 3	8	-0,884	0,12	-0,830	0,17	0,631	0,09	-0,064	0,88
Sdružená data	8	-0,557	0,06	-0,845	< 0,01	0,579	0,13	0,370	0,37
Září									
Den 1	4	-0,965	< 0,05	-0,956	< 0,05	0,659	0,34	0,818	0,18
Den 2	4	-0,990	< 0,01	-0,878	0,12	0,859	0,14	0,157	0,84
Den 3	4	-0,854	0,15	-0,632	0,37	0,902	0,10	0,591	0,41
Sdružená data	4	-0,549	0,06	-0,793	< 0,01	0,879	0,12	0,671	0,33
<i>Echinoparyphium recurvatum</i>									
Květen									
Den 1	3	0,059	0,94	0,622	0,38	-0,766	0,44	0,990	0,09
Den 2	3	-0,053	0,95	0,679	0,32	-0,142	0,91	0,645	0,55
Den 3	3	-0,022	0,98	0,701	0,30	0,346	0,78	0,204	0,87
Sdružená data	3	0,061	0,85	0,644	< 0,05	-0,161	0,90	0,660	0,54
Září									
Den 1	8	0,405	0,60	0,821	0,18	0,896	< 0,01	0,578	0,13
Den 2	8	0,467	0,53	0,855	0,15	0,908	< 0,01	0,627	0,10
Den 3	8	0,246	0,75	0,705	0,3	0,861	< 0,01	0,499	0,20
Sdružená data	8	0,233	0,47	0,776	< 0,01	0,899	< 0,01	0,57	0,14

Délka plže měla vliv na produkci cercárií pouze u druhu *E. recurvatum* (Tab. 7), kdy bylo prokázáno, že větší plži produkují větší množství cercárií (Obr. 15f). Ačkoliv délka experimentálních plžů infikovaných druhem *O. ranae* se signifikantně lišila mezi sezónami (květnem, červencem a zářím; $F_{2,15}=18,66$, $p<0,001$), plži signifikantně menších rozměrů se vyskytovali pouze v září (post hoc Tukey's HSD test, obě $p<0,001$; průměrná délka plžů \pm SD: $13,39\pm 1,61$ mm), zatímco v květnu a červenci byla velikost plžů podobná ($p > 0,05$; $20,32 \pm 2,07$ mm a vs $20,07\pm 2,61$ mm). Délka plžů u druhu *E. recurvatum* se mezi jednotlivými sezónami, květen a září, nelišila ($F_{1,9}=4,00$, $p = 0,08$; $18,25\pm 0,95$ vs $14,34\pm 3,13$) nelišila.

Korelace mezi intenzitou infekce a počtem vyplavaných cercárií nebyla prokázána u žádného druhu motolice (Tab. 7).



Obr. 15 Grafické znázornění statisticky významného korelačního vztahu mezi průměrnou denní produkcí cercárií a intenzitou světla během jednotlivých časových úseků (východ slunce – růžová, den – žlutá, západ slunce – modrá a noc – černá). Negativní korelace u *Opisthio glyphe ranae* v měsících (a) květen, (b) červenec a (c) září a pozitivní korelace u *Echinoparyphium recurvatum* v (d) květnu a (e) září. (f) Pozitivní vztah mezi průměrnou denní produkcí cercárií a velikosti plžů detekován u *Echinoparyphium recurvatum* v září. Body znázorňují počet vyplavaných cercárií z jednotlivých plžů.

6. Diskuse

V této studii jsou poskytnuty první detailní údaje o sezónní denní produkci a rytmech ve vyplouvání cercárií dvou druhů motolic *O. ranae* a *E. recurvatum* z malých plovatkových plžů dvou rodů *Ampullaceana* a *Radix* (Lymnaeidae) jakožto prvních mezihostitelů. Informace o těchto zcela zásadních strategiích v přenosu motolic do dalších hostitelů jsou totiž u studovaných motolic velmi omezené (*O. ranae*: diplomová práce Bednářová, 2010; *E. recurvatum*: McCarthy a kol., 1999a; Morley a kol., 2003; Morley a kol., 2010). Tato studie je jedinečná i z důvodu zkoumání vyplouvání cercárií z malých plovatkových plžů, pro které jsou dosavadní informace na toto téma nedostatečné. V Evropě, kromě výše zmíněných studií, pouze 4 práce pojednávají o produkci a rytmech ve vyplouvání 6 druhů sladkovodních cercárií ze 3 druhů malých plovatek, konkrétně *Plagiorchis* sp. (*Plagiorchiidae*) z *Lymnaea peregra* (synonym *Peregriana peregra*; Aksenova a kol., 2018) (McCarthy a kol., 1999a), *Diplostomum gasterostei* (*Diplostomidae*) z *Myxas glutinosa* (Karvonen a kol., 2006b), *Diplostomum mergi*, *D. spathacaeum* a *D. parviventosum* (*Diplostomidae*) z *A. lagotis* (Vyhlídalová a Soldánová, 2020) a *Trichobilharzia* sp. peregra z *A. balthica* (Soldánová a kol., 2022).

Hlavní výsledky této studie jsou následující: i) sezónní teploty významně ovlivňují denní produkci cercárií obou motolic (celkové množství vyplavaných cercárií během 24 h), ii) denní rytmy ve vyplouvání cercárií (denní periodicita ve vyplouvání v průběhu 24 h) obou druhů motolic byly identifikovány jako diurnální a cirkadiánní, ale s rozdílnými vrcholy v odlišných časových intervalech (*O. ranae*: při západu slunce; *E. recurvatum*: během dne), iii) denní rytmy (na rozdíl od celkové denní produkce) nebyly ovlivněny podmínkami rozdílných foto- a hlavně termoperiod v různých sezónách. Periodicita ve vyplouvání cercárií byla s největší pravděpodobností podmíněna dynamikou infekce v přezimujících plžích a chronobiologickou aktivitou dalších hostitelů v životních cyklech obou druhů motolic.

Sezónnost spojená s výkyvy teplot může významně ovlivnit vyplouvání cercárií z prvních mezihostitelských měkkýšů, neboť výskyt cercárií v prostředí je vázaný na určitá období v roce, kdy se zvyšuje i pravděpodobnost interakce s dalšími hostiteli (Morley, 2012). V tomto období přenosu (tzv. transmission window) jsou populace cercárií ve vodním prostředí obvykle nízké v chladnějších sezónách a vysoké v teplejších obdobích, kdy jsou teplotní podmínky pro produkci cercárií optimální (Thieltges a Rick, 2006; Morley a Lewis, 2013; Nikolaev a kol., 2021). Ovšem informace o sezónních výkyvech v množství vyplavaných cercárií jsou omezené jen na pár studií, ve kterých byly zjištěny sezónní rozdíly

či dokonce sezónní posun ve vyplouvání cercárií právě v závislosti na teplotních podmínkách (Fingerut a kol., 2003; Koprivnikar a Poulin, 2009b; Kiatsopit a kol., 2014; Paull a Johnson, 2014; Prokofiev a kol., 2015; de Montaudouin a kol., 2016; Soldánová a kol., 2016; Vyhliđalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022; Taskinen a kol., 2022).

Rozdíly v sezónní produkci cercárií (denní produkce) byly detekovány i u studovaných druhů motolic *O. ranae* a *E. recurvatum*. Nejvyšší produkce cercárií byla pozorována na jaře v květnu (20°C) a v následujících sezónách postupně klesala přes červenec (22°C) směrem k podzimu v září (18°C). Tento trend byl pozorován u obou druhů studovaných motolic, a to až s mnohonásobným poklesem oproti květnu (*O. ranae*: 3× nižší produkce v červenci a až 9× nižší v září; *E. recurvatum*: 2,5× nižší v září). Tato zjištění se však slučují s první stanovenou hypotézou pouze částečně. Je zřejmé, že sezónní termoperioda má skutečně významný vliv na množství vyplavaných cercárií, ale oproti očekávání, nejvyšší denní produkce nebyla pozorována v měsíci s nejvyšší teplotou 22°C, tedy v červenci. Navíc tuto část hypotézy lze s jistotou zamítnout pouze u druhu *O. ranae*, kvůli absenci dat o celkové denní produkci cercárií u *E. recurvatum* v červenci. Obecně se uvádí, že motolice jsou extrémně citlivé na změny teplot, což je nevíce patrné právě u denního množství vyplavaných cercárií. U většiny druhů motolic (sladkovodních i mořských) se produkce cercárií zvyšuje v reakci na zvýšenou teplotu, tj., že největší množství cercárií vyplouvá při vyšších teplotách (Lyholt a Buchmann, 1996; Mouritsen, 2002; Thieltges a Rick, 2006; Al-Jubury a kol., 2020; Soldánová a kol., 2022), avšak jen do určité mezní teploty a poté produkce cercárií klesá (Poulin, 2006; Koprivnikar a Poulin, 2009a; Morley a kol., 2010; Selbach a Poulin, 2020; Khosravi a kol., 2023). Optimální produkce cercárií tedy probíhá pouze v rozmezí určitých teplot (Morley a Lewis, 2013), které jsou nejvíce příznivé pro funkční aktivitu cercárií čili pro jejich schopnost infekce a přenosu do dalších hostitelů (Morley, 2012; Nikolaev a kol., 2021). V této studii byla denní produkce cercárií sledována v rámci sezónních teplot třech měsíců, 20, 18 a 22°C (květen, červenec a září), což odpovídá rozmezí teplot 15–25°C pro optimální produkci cercárií v podmínkách mírného pásu (Morley a kol., 2010; Morley a Lewis, 2013). Nicméně, tento aspekt teplotní citlivosti motolic nevysvětluje nejvyšší produkci cercárií na jaře v květnu, a tudíž obecně přijímaný fakt, že produkce cercárií stoupá s rostoucí teplotou.

Výsledky této studie jsou i v rozporu s dostupnými, leč omezenými údaji o teplotní závislosti denní produkce cercárií *O. ranae* a *E. recurvatum* (Bednářová, 2010; McCarthy, 1999a; Morley a kol., 2003; Morley a kol., 2010). Bednářová (2010), která sledovala produkci cercárií 3 druhů motolic (*Plagiorchis elegans*, *O. ranae* a *Diplostomum pseudospathaceum*)

z prvního mezihostitelského plže *L. stagnalis* po dobu 11 měsíců uvádí, že množství vyprodukovaných cercárií se během jednotlivých ročních období lišilo, kdy na jaře byla produkce nejnižší, ale postupně se zvyšovala během léta a na podzim dosahovala nejvyšších hodnot (viz. diskuze Bednářové, 2010). Ovšem konkrétně u *O. ranae* je patrné, že produkce cercárií byla v průběhu roku velmi variabilní (Tab. 3; Bednářová, 2010) s podobnou produkcí v květnu (jaro, 3499 cercárií/plž/den) a září (podzim; 3741 cercárií/plž/den), ale s výrazně nižší produkcí v červenci (léto, 1328 cercárií/plž/den), a nejvyšší produkce byla pozorována v srpnu (léto, 6648 cercárií/plž/den). Zde je důležité upozornit na účinek matoucích faktorů, které při porovnávání údajů o produkci *O. ranae* mohou vést k chybné interpretaci výsledků. Bednářová a kol. (2010) sledovala produkci cercárií pouhých 15 h denně (od 7:00 do 22:00), což odporuje standardním metodikám běžně užívaným při studiu této problematiky (tj. sledování vyplouvání cercárií nejméně po dobu 24 h). Navíc její pokusy probíhaly v každém měsíci v laboratorních podmínkách v konstantní teplotě 17°C, tudíž nelze debatovat o sezónních změnách v produkci cercárií. V neposlední řadě, experimentální počet infikovaných plžů byl většinou velmi nízký (často 1–3 jedinci), což neposkytuje spolehlivá data o průměrném množství vyplavaných cercárií a tím i dostatečně robustní analýzu. Nicméně v květnu vyplouvaly cercárie *O. ranae* z *A. lagotis* ve srovnatelném množství jako v květnu z *L. stagnalis* (2749 vs 3499 cercárií/plž/den), což naznačuje, že i menší plovatkovití plži mají relativně vysokou kapacitu pro produkci cercárií ve srovnání s mnohem větším plžem.

Produkci cercárií druhu *E. recurvatum* lze porovnat se studii McCarthy (1999a), Morley a kol. (2003) a Morley a kol. (2010), ve kterých byla sledována produkce stejného druhu motolice z malého plovatkovitého plže *Lymnaea peregra* (synonym: *Peregiana peregra*, Aksenova a kol., 2018), tedy blízce příbuzného druhu k druhům plžů použitých v této studii: *A. balthica*, *A. lagotis* a *R. auricularia* (Aksenova a kol., 2018). Ačkoliv se autoři v těchto studiích nezaměřovali konkrétně na sezónní změny v produkci cercárií, produkce byla monitorována v rozmezí podobných teplot, které odpovídají měsíčním teplotám v této studii. Morley a kol. (2003) uvádějí rozmezí 200–250 cercárií (c./plž/den) při teplotě 20°C (odpovídající květnu) a McCarthy (1999a) uvádí 573–742 c./plž/den při teplotě 18°C (odpovídající září). Morley a kol. (2003), kteří sledovali produkci cercárií v 6 různých teplotách (10, 14, 17, 21, 25, 29°C), potvrdili, že teplota je rozhodující faktor pro množství vyplavaných cercárií. Minimální produkce probíhala při teplotě 10°C, pak se postupně zvyšovala s rostoucí teplotou až do 17°C, kdy bylo dosaženo termálního optima (mezi 17–

25°C) a poté se opět snížila při nejvyšší teplotě 29°C. Morley a kol. (2003) uvádějí 1401 c./plž/den při 21°C (odpovídající květnu, ale i červenci) a 1122 c./plž/den při 17°C (odpovídající září). Výsledky z těchto třech studií jsou rozporuplné a s produkcí cercárií *E. recurvatum* v této studii se shodují jen částečně. Zatímco počet vyplavaných cercárií v září v této studii (562 c./plž/den) se shoduje s prací McCarthy a kol. (1999a), Morley a kol. (2010) uvádějí produkci dvojnásobně vyšší. Naopak v květnu, kdy byla produkce v této studii vysoká (1262 c./plž/den), se výsledky shodují s Morley a kol. (2010), ale v dřívější studii Morley a kol. (2003) naopak zaznamenali produkci 4× nižší.

Hypotéza o nevyšší produkci cercárií druhu *E. recurvatum* v červenci zde nemohla být potvrzena ani vyvrácena kvůli úmrtí plžů během zpracování vzorků nebo během aklimatizace. Nicméně, na základě údajů z Morley a kol. (2010) a Šarounová (2011) lze předpokládat, že produkce cercárií *E. recurvatum* v červenci může být shodná nebo dokonce vyšší než v květnu. Morley a kol. (2010) zjistili podobné množství vyplavovaných cercárií ve 21°C (odpovídající květnu a červenci) jako v této studii ve 20°C (květen) (1401 c./plž/den vs 1262 c./plž/den). Šarounová (2011) ve své diplomové práci studovala vyplouvání cercárií blízce příbuzných druhů echinostomních motolic *Echinoparyphium aconiatum* Dietz, 1909 z plže *L. stagnalis* (Lymnaeidae) a *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 z plže *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) (Planorbidae) ve třech experimentálních teplotách (17,5°C; 22,5°C a 27,5°C; vždy s rozdílem 5°C mezi teplotami). I zde byla potvrzena teplotní závislost v množství produkovaných cercárií u obou druhů s výrazným poklesem při nejvyšší teplotě. Ovšem v teplotě 22,5°C (odpovídající červenci v této studii) byl zaznamenán rapidní nárůst v produkci cercárií obou druhů. Obzvláště u *E. aconiatum* byla produkce vysoká v rozmezí 810–2180 c./plž/den a dosahovala až 4800 c./plž/den, což je ve shodě s výše uvedenou domněnkou, že produkce cercárií studovaného druhu *E. recurvatum* by mohla být nejvyšší (nebo alespoň srovnatelná) v červenci. Dalším důkazem může být skutečnost, že cercárie těchto tří echinostomních motolic pocházely z plžů sbíraných ve sladkovodních ekosystémech mírného pásu (Česká republika: Šarounová, 2011; Anglie: McCarthy, 1999a; Morley a kol., 2003; Morley a kol., 2010), tedy v rozmezí teplotního optima 15–25°C pro produkci cercárií ve středních zeměpisných šířkách (36–60°) (Morley a Lewis, 2013). Reakce cercárií na teplotní změny v jednotlivých sezónách ve smyslu denní produkce by tedy měly být podobné, zvláště pokud se jedná o motolice stejné skupiny (zde čeleď Echinostomatidae). Pro potvrzení hypotézy o nejvyšší produkci cercárií *E. recurvatum* v červenci je v budoucnu potřeba získat více údajů z teplotního rozmezí letní sezóny.

Vzhledem k nejvyšší produkci cercárií *O. ranae* v květnu je zřejmé, že existují i jiné mechanismy než teplota vody, které ovlivnily sezónní produkci. Velikost plže a intenzita infekce byly již v předchozích studiích prokázány jako signifikantní (Massoud, 1974; Graham, 2003; Karvonen a kol., 2006a; Morley a kol., 2010; Soldánová a kol., 2016; Vyhlídalová a Soldánová, 2020). Plži větších rozměrů zpravidla produkují větší množství cercárií, protože tak poskytují více prostoru k namnožení larev (sporocyst/redií), čímž se zvyšuje i produkce cercárií. Intenzita infekce zahrnuje promořenost tkáně plže larvami motolic a zpravidla větší jedinci se vyznačují i vyšší intenzitou infekce (Morley a kol., 2010; Vyhlídalová a Soldánová, 2020). Experimentální plži pocházeli z přirozeného prostředí a kvůli relativně nízké prevalenci studovaných druhů motolic nebylo možné standardizovat metodiku experimentů z hlediska zamezení potenciálních vlivů těchto dvou faktorů, tj. zahrnout plže podobných velikostí. Nicméně, intenzita infekce v této studii nebyla prokázána jako faktor ovlivňující produkci cercárií ani u jednoho druhů motolice. Přestože se plži infikovaní *O. ranae* větších rozměrů vyskytovali v květnu a červenci, vliv velikosti plžů na produkci cercárií nebyl potvrzen. Toto se neshoduje s předchozími výsledky Bednářové (2010), která zdůvodnila nejvyšší produkci cercárií *O. ranae* právě kvůli větší velikosti plovatek *L. stagnalis*. Naopak u druhu *E. recurvatum* se infikovaní plži ve velikosti mezi jednotlivými sezónami nelišily, ale produkce cercárií v září signifikantně korelovala s velikostí plžů. Tento konkrétní výsledek přesto není dostačujícím vysvětlením pro nejvyšší produkci cercárií obou druhů v květnu, neboť produkce cercárií byla nejnižší právě v září.

Dalším možným faktorem, který by mohl ovlivňovat dynamiku sezónní produkce cercárií je cyklický vývoj infrapopulací larev v plži, kdy se střídá fáze vývoje cercárií jakožto plně vyvinutých larev v dceřiných sporocystách/rediích (tzn. vysoká produkce cercárií v určitých sezónách) s fází dozrávání cercárií nebo teprve produkcí dceřiných sporocyst/redií z těch mateřských (tzn. nízká produkce cercárií v určitých sezónách) (Galaktionov a Dobrovoslkiij, 2003). Tato charakteristika je typická pro motolice čeledi Schistosomatidae s cyklickým larválním vývojem přibližně 35–40 dní (Théron, 2015) a vliv tohoto jevu na produkci cercárií byl také diskutován u ptačích schistosom (Soldánová a kol., 2016). Avšak, toto se v případě druhu *E. recurvatum* zdá být nepravděpodobné, jelikož vliv cyklického vývoje larev na produkci cercárií nebyl prokázán (Morley a kol., 2010). V případě druhu *O. ranae* žádné údaje nejsou známy. Nicméně, hypoteticky, pokud by se larvy *O. ranae* vyvíjeli periodicky každých 35–40 dní, výrazně vyšší produkce cercárií by měla být patrná již o měsíc dříve v dubnu. Pak lze nalézt souvislost ve schopnosti přežívání larev motolic v přezimujících

plžích. V nepříznivých sezónách (podzim a zima) je produkce cercárií některých druhů motolic pozastavena a probíhá pouze množení larev (sporocyst/redií) uvnitř plže (Watertor, 1968; Brassard a kol., 1982; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). Na jaře, kdy teplota vody dosáhne určité hodnoty pro stimulaci produkce cercárií, dochází k opětovnému množení cercárií a následnému masivnímu vyplouvání cercárií z hostitelského plže do okolního prostředí (Galaktionov a Dobrovolskij, 2003). V podmínkách mírného pásu se jako minimální rozmezí teplot pro vyplouvání cercárií uvádí 4–10°C (Morley, 2012) a možnost akumulace larev s potlačenou produkcí cercárií ve sporocystách druhu *O. ranae* během zimního období byla zdokumentována u plže *L. stagnalis* (Soldánová a kol., 2011). V dubnu se teplota vody v uměle vytvořených vodních nádržích pohybuje mezi 10–18°C (Vyhlídalová a Soldánová, 2020) a teplota vody v jezeře Most, odkud pochází plži infikovaní druhem *O. ranae*, se v dubnu pohybovala mezi 7–19°C, což koresponduje s mezní teplotou 14°C pro zvýšenou aktivitu plžů (Morley a kol., 2010) i s výskytem infikovaných plžů již v dubnu (Žbikowska a kol., 2006; Soldánová a kol., 2011). Tudiž pokud by cyklický vývoj larev *O. ranae* před hibernací plžů v zimním období byl ve fázi dozrávání cercárií ve sporocystách, zvýšená produkce ve smyslu množství vyplavaných cercárií může tedy skutečně probíhat brzy na jaře v dubnu, jakmile nastanou příznivé podmínky pro obnovenou aktivitu plžů a produkci cercárií. To by ovšem znamenalo, že sezónní výkyvy v produkci by byly pozorovatelné každý 1–1,5 měsíce. Jelikož první experiment v této studii probíhal na konci května (25.–28.5.), kdy byla zaznamenána nevyšší produkce cercárií, další zvýšení produkce by měla být patrná také na konci nebo v polovině každého následující měsíce. Avšak následné experimenty v červenci a září byly uskutečněny přibližně o týden dříve než v květnu (17.–20.7. a 16.–18.9.), tudíž nelze s jistotou určit, zda tento faktor má skutečně vliv na produkci cercárií. Potvrzení této teorie by v budoucnu vyžadovalo řadu experimentů alespoň každých 14 dní.

Jelikož cercárie mají velmi omezený čas na infikování dalšího hostitele (Nikolaev a kol., 2021), jejich produkce z nakaženého plže musí být efektivní. Vyplouvání cercárií je obvykle synchronizováno s chronobiologickou aktivitou dalších hostitelů v životním cyklu motolic, protože správné načasování zvyšuje šance na přenos a maximalizuje tak pravděpodobnost dokončení životního cyklu (Combes a kol., 1994; Combes a kol., 2002; Soldánová a kol., 2016; Soldánová a kol., 2022). Ačkoliv se tento fenomén nejvýrazněji projevuje v rytmech ve vyplouvání cercárií (Prokofiev a kol., 2015), denní produkce cercárií také může být ovlivněna sezónním výskytem a aktivitou hostitelů, obzvláště během jejich reprodukčního období, kdy je setkání cercárií s vhodným hostitelem nejpravděpodobnější a

přenos nejvíce realizovatelný (Anderson, 1976; Combes a kol., 1994, 2002; Théron, 2015; Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022). Jako nejpravděpodobnější vysvětlení nejvyšší produkce cercárií *O. ranae* v květnu se jeví přítomnost vhodných hostitelů ve správném čase na správném místě. Výskyt infikovaných plžů, kteří přezimovali a začali aktivovat v průběhu dubna (viz. dynamika infekce v přezimujících plžích výše), se překrývá s výskytem žab (Stebins a Cohen, 1997), kteří slouží jako definitivní hostitelé (ale i jako mezihostitelé) pro *O. ranae* (Grabda-Kazubská, 1969). Až na některé výjimky se žáby v podmínkách mírného pásu rozmnožují brzy z jara (obvykle začátkem března) hned po jejich přezimování (Zwach, 2009; Gaisler a Zima, 2018), načež se během 14 dní líhnou z vajíček pulci, kteří slouží jako druzí mezihostitelé druhu *O. ranae*. Vývoj pulců v dospělé žáby trvá přibližně 2,5–3 měsíce (Zwach, 2009). To znamená, že vývojová stádia žab setrvávají ve vodě přibližně do půlky června, což koresponduje s nejvyšší produkcí cercárií v květnu. Ovšem vzhledem k nevyšší akumulaci pulců přibližně v půlce dubna je pravděpodobné, že vyšší produkce cercárií může probíhat právě i v tomto období. V budoucnu by bylo třeba monitorovat produkci cercárií nejen každých 14 dní během produktivního období v roce, ale hlavně v brzkých jarních měsících. Výzkum ale může být náročný kvůli omezenému množství infikovaných plžů a chybějícím údajům o rozmezí minimálních teplot, při kterých cercárie *O. ranae* ještě vyplouvají nebo je produkce zastavena úplně.

Synchronizace produkce cercárií s výskytem druhých mezihostitelů pravděpodobně probíhá i u druhu *E. recurvatum*. Plži jako druzí mezihostitelé pro tento druh jsou nejvíce abundantní v letních měsících (Vinarski a kol., 2023), což koresponduje s hypoteticky nejvyšší produkcí druhu *E. recurvatum* v červenci. Vyšší produkce cercárií v květnu může opět souviset s dynamikou infekce v přezimujících plžích, ale také jejich velikostí (Watertor, 1968; Brassard a kol., 1982; Galaktionov a Dobrovolskij, 2003; Poulin, 2006). Ačkoliv nebyly zjištěny signifikantní rozdíly ve velikosti infikovaných plžů mezi oběma sezónami, plži na jaře byli průměrně větší než na podzim. Jedná se právě o plže z předchozího roku, kteří přezimovali a na jaře začali opět produkovat cercárie.

Denní rytmy ve vyplouvání cercárií byly studovány mnoha autory a jsou rozpoznávány jako adaptivní mechanismus vedoucí ke zvýšení pravděpodobnosti přenosu motolic do dalších hostitelů (např. Anderson, 1976; Jourdane a Théron, 1987; Shostak a Esch, 1990; Umadevi a Madhavi, 1997; Toledo a kol., 1999). U různých druhů motolic tak lze pozorovat různě vysoké počty vyprodukovaných cercárií v konkrétním čase během dne, a to opět v závislosti na řadě environmentálních faktorů, z nichž se jako nejdůležitější většinou uvádí výskyt a aktivita

dalších hostitelů v životním cyklu motolic (Anderson a kol., 1976; Combes a kol., 1994, 2002; Théron, 2015) (viz diskuze níže). Denní rytmy ve vyplouvání cercárií obou sledovaných druhů *O. ranae* a *E. recurvatum* byly diurnální a cirkadiální (nevyšší počet cercárií pouze jednou ve světlé části dne), avšak s rozdílnými vrcholy během 24 h. Oba druhy zároveň vykazovaly konstantní periodicitu v cirkadiálních rytmech produkovaných cercárií během všech sezón. To znamená, že cercárie vyplouvaly ve stejné části dne bez ohledu na odlišné sezónní světelné podmínky, tj. sezónní délku světlé a tmavé části dne. Navíc, experimenty byly prováděny ve standardizovaných teplotách každé sezóny, a tudíž bez možnosti fluktuace teplot v průběhu dne, které u některých motolic mohou denní rytmy ovlivnit (Prokofiev a kol., 2015). Lze tedy potvrdit druhou hypotézu o tom, že sezónní foto- a termoperioda nemá vliv na denní rytmy ve vyplouvání cercárií *O. ranae* a *E. recurvatum*. Podobné výsledky byly prokázány i pro jiné druhy motolic infikujících sladkovodní plže (Kiatsopit a kol., 2014; Soldánová a kol., 2016; Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022).

Cercárie druhu *O. ranae* nejvíce vyplouvaly z prvního mezihostitelského plže *A. lagotis* během západu slunce, dále vyplouvání klesalo k druhému nejvyššímu vrcholu v průběhu noci. Tyto výsledky jsou v rozporu s výsledky práce Bednářové (2010), která detekovala rytmy ve vyplouvání cercárií pouze u druhu *P. elegans* (Obr. 17; Bednářová, 2010), ale u druhů *D. pseudospathaceum* a *O. ranae* vyplouvání cercárií v průběhu dne výrazně nekolísalo (Obr. 17; Bednářová, 2010). Tento výsledek je zvláštní, protože infradiální rytmy, tj. bez periodicity ve vyplouvání, jsou typické pro motolice bez druhého mezihostitele v životních cyklech, kdy se cercárie encystují jako adoleskárnie např. na vodní vegetaci (např. motolice čeledi Fasciolidae; Théron, 2015; Maggioli a kol., 2020). I přesto, že Bednářová (2010) sledovala produkci cercárií každé 3 h pouze po dobu 15 h denně (od 7:00 do 22:00), časový úsek západu slunce byl zahrnut po čas experimentů v každém měsíci (v této studii se západ slunce podle sezón pohyboval mezi 19 a 22 h s délkou trvání 30–40 min). Vzhledem k tomu, že periodičita ve vyplouvání cercárií *O. ranae* byla v této studii konstantní ve všech sezónách, je nutno přistupovat k výsledkům Bednářové (2010) opatrně.

Na rozdíl od *O. ranae*, cercárie druhu *E. recurvatum* nejvíce vyplouvaly z mezihostitelských plžů ve světlé části dne (tj. v intervalu den). Produkce poté klesala k druhému nejvyššímu vrcholu během západu slunce a nejnižší pozorované počty cercárií byly zaznamenány v průběhu noci. Tento trend byl pozorován u všech 3 druhů plžů *A. balthica*, *A. lagotis* a *R. auricularia*, tudíž lze konstatovat, že odlišné druhy plžů neměly vliv na denní rytmy ve vyplouvání cercárií druhu *E. recurvatum*. Stejně diurnální a cirkadiální rytmy druhu

E. recurvatum s nejvyšším vrcholem během světlé části dne byly potvrzeny i u dřívějších studií, navíc také z jiného druhu malého plovatkovitého plže *L. peregra* (McCarthy, 1999a; Morley a kol., 2003; Morley a kol., 2010). Tito autoři počítali cercárie v pravidelných 1 h intervalech a dospěli k podobným závěrům i přes malé odlišnosti v experimentálních podmínkách. McCarthy (1999a) detekoval vrchol ve vyplouvání cercárií dopoledne mezi 9 a 10h v laboratoři při standardní teplotě 18°C a fotoperiodě 12 h:12 h (světlo/tma). Morley a kol. (2003) zaznamenali vrchol ve vyplouvání odpoledne mezi 13 a 14h v laboratoři při standardní teplotě 20°C a fotoperiodě 12 h:12 h a Morley a kol. (2010) mezi 10 a 13 h v laboratoři při standardní teplotě 21°C za přirozených světelných podmínek. V této studii byla periodicita ve vyplouvání cercárií sledována pouze v rámci hlavních částí dne (východ a západ slunce, den a noc), ale na základě údajů z výše zmíněných studií lze předpokládat, že vrchol ve vyplouvání cercárií druhu *E. recurvatum* by mohl být hlavně v dopoledních hodinách, avšak s možností prodloužení do hodin odpoledních. Potvrzení této teorie by v budoucnu vyžadovalo další experimenty, při nichž by cercárie byly počítány v krátkých časových intervalech, ideálně každou hodinu. Diurnální a cirkadiánní rytmy s největším množstvím vyplavaných cercárií během intervalu den se jeví jako běžné a typické u motolic čeledi Echinostomatidae, jelikož byly potvrzeny i u jiných druhů echinostom infikující různé druhy plžů. Například cercárie druhu *Euparyphium albuferencis* (Esteban, Toledo, Sanchez a Munoz-Antoli, 1997) (vyplouvaly z okružákovitého plže *Gyraulus chinensis* (Dunker, 1848) (Planorbidae) nejvíce mezi 13 a 14 h (Toledo a kol., 1999). Cercárie *Echinostoma* sp. z plže druhu *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) opět mezi 9 a 11h (Hannon a kol., 2017).

Stejně jako u denní produkce cercárií i denní rytmy ve vyplouvání cercárií mohou být ovlivňovány biotickými i abiotickými faktory jako je velikost plže, intenzita světla, teplota či chronobiologická aktivita dalších hostitelů (např. Anderson a kol., 1976; Combes a kol., 1994; Combes a kol., 2002; Pietrock a Marcogliese, 2003; Thieltges a kol., 2008; Prokofiev a kol., 2015; Théron, 2015). Ačkoliv vliv teploty byl prokázán u motolic mořských druhů jako významný faktor korelující s vyšší produkcí cercárií v určitých denních intervalech (Prokofiev a kol., 2015), ve sladkovodním prostředí se vliv teploty, na rozdíl od světelných podmínek, zdá být nepatrný (Vyhlídalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022). Světlo a teplota jsou pro vyplouvání cercárií zcela klíčové, avšak často mají synergický účinek nebo se jinak vzájemně doplňují (Prokofiev a kol., 2015). Z tohoto důvodu se při studiu vyplouvání cercárií z plžů v laboratorních podmínkách často uplatňují standardizované podmínky, které vedou k vyloučení vlivu jednoho faktoru, aby bylo možno prokázat vliv druhého faktoru v závislosti

na testovaných hypotézách. Dle výsledků této studie je zřejmé, že ani zde teplota neměla výrazný vliv na rytmy ve vyplouvání cercárií u obou druhů sledovaných motolic. Nicméně je třeba zmínit, že i přes experimenty v konstantních teplotách bylo pozorováno nižší množství cercárií *O. ranae* v nižších teplotách v květnu a září. Tento výsledek je matoucí, hlavně z toho důvodu, že experimentální teplota v průběhu pokusů v květnu významně nekolísala, neboť se pohybovala v rozmezí pouhých 0,4–0,9°C. Jelikož kolísání experimentální teploty v září také bylo jen v rámci 0,1°C bez prokázání signifikantního vztahu a také korelace mezi počty vyplavaných cercárií v jednotlivých denních úsecích přes 3 dny experimentu nebyly průkazné, lze usuzovat, že vliv teploty skutečně významný není.

Naopak světelné podmínky jsou pro periodicitu v počtech vyplavaných cercárií naprosto zásadním faktorem. Při zvýšené intenzitě světla, např. přímým osvětlením umělým světlem nebo v závislosti na přirozené fluktuaci světla během denního cyklu 24h, dochází ke stimulaci vyplouvání cercárií (např. Kaewkes a kol., 2012; Théron, 2015; Soldánová a kol., 2016; Vyhliđalová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2022). I v této studii byl zjištěn významný vliv světelných podmínek na rytmy ve vyplouvání cercárií obou druhů studovaných motolic. U *O. ranae* vyplouvalo nejvíce cercárií při nižší intenzitě světla, zatímco u *E. recurvatum* nejvíce cercárií vyplouvalo při nejvyšší intenzitě světla, což se shoduje s vrcholy ve vyplouvání během západu slunce (*O. ranae*), protože intenzita světla byla nízká, a zároveň s vrcholy vyplouvání během dne (*E. recurvatum*), kdy intenzita světla byla nejvyšší. Pozitivní korelace s nejvyšší intenzitou světla během dne od 10 do 13h a počtem vyprodukovaných cercárií byla u *E. recurvatum* prokázána již dříve (Morley a kol., 2010), ale pro druh *O. ranae* tato studie poskytuje zcela nové informace.

Dalším faktorem mohla být velikost prvního mezihostitelského plže. V této studii vliv různých velikostí plžů ve vztahu k denním rytmům cercárií nebyl zkoumán z důvodu omezeného počtu experimentálních plžů odlišných velikostí a stanovených hypotéz, které se týkaly jiných aspektů zkoumané problematiky. Nicméně, Morley a kol. (2010) prokázali, že načasování ve vyplouvání cercárií *E. recurvatum* sice započalo dříve u menších jedinců plžů (mezi 10 a 11h) než u větších (mezi 12 a 13h), ale celkový trend v periodicitě ve vyplouvání cercárií během světlé části dne tak nebyl nijak ovlivněn.

Nejpravděpodobnějším faktorem stimulujícím vyplouvání cercárií obou druhů studovaných motolic v určitých částech dne (rytmy ve vyplouvání) tak, aby vyplouvání cercárií bylo co nejefektivnější pro zvýšení pravděpodobnosti dokončení životního cyklu, se zdá být synchronizace s chronobiologickou aktivitou dalších hostitelů (Combes a kol., 1994;

Esch a kol., 2001; Combes a kol., 2002). Tento často zjištěný fakt pro mnoho různých druhů motolic (Karvonen a kol., 2006b; Faltýnková a kol., 2009; Prokofiev a kol., 2015; Vyhřídálová a Soldánová, 2020; Soldánová a kol., 2016; Soldánová a kol., 2022) je též v souladu s druhou testovanou hypotézou z následujících důvodů. Druh *O. ranae* nejčastěji využívá pulce a žáby jako druhé meziphostitele (Grabda-Kazubská, 1969), jejichž zástupci se hojně vyskytují i v severních Čechách (Zwach, 2009), především druhy *Bufo bufo* (Bufonidae), *Pseudepidalea viridis* (Bufonidae), *Rana temporaria*, *R. dalmatina*, *Pelophylax kl. esculentus* a *P. ridibundus* (Ranidae). Dospělé žáby většiny uvedených druhů jsou nejvíce aktivní za soumraku a v průběhu noci (Zwach, 2009) kvůli zvýšené aktivitě jejich potravy jsou pavouci, hmyz či slimáci (Zwach, 2009). I pulci žab mohou být aktivní v průběhu západu slunce a noci (i když v menší míře než běžně během dne) v důsledku jejich antipredační strategie v chování či potravními návyky (Oishi a kol., 2004; Fraker, 2008). Cerkárie druhu *E. recurvatum*, jejichž jediný vrchol ve vyplouvání je v rámci časového úseku den, nejčastěji infikují plže jako druhé meziphostitele (Našincová, 1992; Huffman a Fried, 2012). Plži jsou obecně nejvíce aktivní během poledne a časného odpoledne, kdy se nejčastěji živí perifytonem při nejvyšší fotosyntéze a tím zároveň regulují jejich biomasu v prostředí (Lombardo a kol., 2010). Synchronizace rytmů ve vyplouvání cercárií s denní aktivitou plžů byla potvrzena nejen u *E. recurvatum* (Morley a kol., 2010), ale i jiných druhů echinostomních motolic, jejichž druhými meziphostiteli jsou taktéž plži (Toledo a kol., 1999; Hannon, 2017). Jelikož denní aktivita hostitelů, zde žab a plžů, v průběhu sezón zůstává konstantní, je logické, že i sezónní rytmy ve vyplouvání cercárií obou druhů motolic byly neměnné. Z výše popsaných výsledků je též patrné, že cirkadiánní rytmy cercárií se u obou druhů liší, jelikož zahrnují jiné druhé meziphostitele s odlišnou chronobiologickou aktivitou v jiné části dne, což je v souladu se třetí stanovenou hypotézou.³

Dosažené výsledky v této i v předchozích studiích o extrémní citlivosti motolic na změny teplot v jejich vyplouvání (hlavně produkci) z meziphostitelských plžů jsou klíčové v pochopení biologických a ekologických aspektů druhů motolic především ve smyslu šíření patogenních druhů za hranice běžného geografického výskytu v důsledku globálního oteplování (Kurane, 2010; Morley a Lewis, 2013; Goedknecht, 2015). Teplota je nejvýznamnějším abiotickým faktorem ovlivňující nejenom vyplouvání cercárií, ale i délku vývoje larev v meziphostitelském plži (Ataev 1991; Mouritsen 2002; Poulin 2006; Thielges a Rick 2006), přirozenou délku přežívání, aktivity a schopnosti infekce cercárií ve vnějším prostředí (Lyholt a Buchmann; 1996; Kutz a kol., 2009; Born-Torrijos a kol., 2022) nebo

úroveň predace nehostitelskými organismy (Goedknecht a kol., 2015; Koprivnikar a kol., 2023). Zvyšování průměrných teplot v souvislosti s globálním oteplováním (Benjamin a kol., 2017; You a kol., 2022) může obecně vést k vyšší produkci cercárií, prodloužení sezónního produkčního období či posunu v jejich sezónní produkci (Marcogliese, 2001; Poulin, 2006; Galaktionov, 2017; Taskinen a kol., 2022). Navíc při změně klimatu může docházet k nárůstu populace plžů v důsledku zvýšené eutrofizace vod a produkce řas jakožto potravy pro plže (McKenzie a Townsend, 2007), a tím i vyšší pravděpodobnosti kolonizace plžů motolicemi (Soldánová a Kostadinova, 2011). V konečném výsledku tyto aspekty vedou ke zvýšení populačních hustot cercárií v prostředí, čímž se zvyšuje i riziko nálezů pro další hostitele, včetně lidí i volně žijících a hospodářských zvířat (Marcogliese, 2001; Kutz a kol., 2009; Mas-Coma a kol., 2009). Avšak je velmi pravděpodobné, že možné hrozby globálního oteplování ve smyslu zvýšeného počtu infekčních stádií v prostředí nebudou až tak závažné kvůli omezenému rozmezí termálního optima v produkci cercárií, na které jsou motolice ve svých přirozených geografických podmínkách adaptované (Morley a Lewis, 2013) (nad hranici tohoto optima se produkce obecně snižuje; např. Koprivnikar a Poulin, 2009a; Khorsavi a kol., 2023). Dále, zvýšená produkce cercárií v teplejším prostředí může být kompenzována nižší tolerancí nakažených plžů vůči vyšším teplotám (Żbikowska a Marszewska, 2018), zvýšenou úmrtností nakažených plžů (Karvonen a kol., 2006a; Morley a kol., 2010) a sníženou životností, infektivitou (Lowenberger a Rau, 1994; Pechenik a Fried, 1995; Paull a kol., 2012, Born-Torrijos a kol., 2022) a predačním tlakem cercárií (Goedknecht a kol., 2015). Právě znalost chronobiologického vyplouvání cercárií z mezihostitelských plžů je důležitá pro plánování a implementaci opatření kontroly a prevence infekce, včetně cíleného monitorování a intervencí v prostředí, které mohou ovlivnit populaci cercárií patogenních druhů motolic a snížit riziko infekce pro hostitele, včetně člověka.

7. Závěr

V této studii jsou poskytnuta nová komplexní data o denní produkci a rytmech ve vyplouvání cercárií dvou druhů motolic *Opisthioglyphe ranae* a *Echinoparyphium recurvatum* z malých plovatkovitých plžů dvou rodů *Ampullaceana* a *Radix* (Lymnaeidae), a to ve vztahu k biotickým a abiotickým faktorům, které usnadňují přenos cercárií do dalších hostitelů v životním cyklu těchto motolic. Základní poznatky jsou následující:

- 1. Denní produkce** cercárií *O. ranae* a *E. recurvatum* se v jednotlivých sezónách lišila. Nejvyšší produkce cercárií byla pozorována na jaře (květen) u obou sledovaných druhů motolic, avšak je pravděpodobné, že tento trend je výraznější u produkce cercárií *O. ranae* (tato studie) ve srovnání s druhem *E. recurvatum*, jehož cercárie jsou pravděpodobně nejvíce produkovány v červenci (dle dat z literatury).
- 2. Denní produkce** cercárií *O. ranae* a *E. recurvatum* se v jednotlivých sezónách lišila v závislosti na teplotních podmínkách dané sezóny, avšak mohla být ovlivněna i dalšími součinnými faktory, jako je dynamika infekce v přezimujících plžích či cyklický vývoj infrapopulací larev v mezihostitelském plži. Nicméně, synchronizace produkce cercárií s výskytem dalších hostitelů se jeví jako nejpravděpodobnější příčina sezónních rozdílů ve vyplouvání cercárií obou druhů motolic.
- 3. Denní rytmy** ve vyplouvání cercárií *O. ranae* a *E. recurvatum* byly identifikovány jako diurnální a cirkadiánní u obou druhů motolic, avšak s odlišnými vrcholy ve vyplouvání cercárií v průběhu 24h, nehledě na odlišné sezónní teplotní a světelné podmínky. Ačkoliv intenzita světla měla vliv na intenzitu vyplouvání cercárií, periodicita v cirkadiánních rytmech spíše souvisí s chronobiologickou aktivitou dalších hostitelů.
- 4. Ve výsledku bylo prokázáno, že obě strategie ve vyplouvání cercárií (produkce i rytmy) jsou závislé především na přítomnosti hostitelů, kteří jsou nezbytní pro pokračování životních cyklů motolic *O. ranae* a *E. recurvatum*. Reprodukční období a následný nárůst populací hostitelů v daných fázích roku jsou klíčové hlavně pro celkovou denní produkci cercárií, zatímco denní aktivita a výskyt hostitelů jsou důležité pro denní rytmy ve vyplouvání cercárií.**

8. Použitá literatura

- Aksenova, O. V., Bolotov, I. N., Gofarov, M. Y., Kondakov, A. V., Vinarski, M. V., Bespalaya, Y. V., Kolosova, Y. S., Palatov, D. M., Sokolova, S. E., Spitsyn, V. M., Tomilova, A. A., Travina, O. V., Vikhrev, I. V. (2018). Species richness, molecular taxonomy and biogeography of the radicine pond snails (Gastropoda: Lymnaeidae) in the old world. *Scientific reports*, 8, 1-17.
- Al-Jubury, A., Kania, P., Bygum, A., Buchmann, K. (2020). Temperature and light effects on *Trichobilharzia szidati* cercariae with implications for a risk analysis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 65, 1-9.
- Anderson, P. A., Nowosielski, J. W., Croll, N. A. (1976). The emergence of cercariae of *Trichobilharzia ocellata* and its relationship to the activity of its snail host *Lymnaea stagnalis*. *Canadian Journal of Zoology*, 54, 1481-1487.
- Bassard, P., Curtis, M. A., Rau, M. E. (1982). Seasonality of *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Strigeidae) transmission to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in northern Quebec, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 60, 2258-2263.
- Bažant, J. (2017). Ptactvo mokřadu „Betynka“ u Vtelna (severozápadní Čechy, Most). Sborník Oblastního muzea v Mostě, 38: 92-99. (v češtině)
- Bednářová, A. (2010). *Životní strategie motolic (Digenea) se zaměřením na vývojové stádium cercárie*. [Diplomová práce]. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. (v češtině)
- Bell, A. S., Sommerville, C., Gibson, D. I. (1999). Cercarial emergence of *Ichthyocotylurus erraticus* (Rudolphi, 1809), *I. variegatus* (Creplin, 1825) and *Apatemon gracilis* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Strigeidae): contrasting responses to light:dark cycling. *Parasitology Research*, 85, 387-392.
- Benjamin, D., Por, H. H., Budescu, D. (2017). Climate change versus global warming: Who is susceptible to the framing of climate change? *Environment and Behavior*, 49, 745-770.
- Berkhout, B. W., Lloyd, M. M., Poulin, R., Studer, A. (2014). Variation among genotypes in responses to increasing temperature in a marine parasite: evolutionary potential in the face of global warming? *International Journal for Parasitology*, 44, 1019-1027.
- Bespalaya, Y. V., Kondakov, A. V., Travina, O. V., Khrebtova, I. S., Kropotin, A. V., Aksenova, O. V., Gofarov, M. Y. U., Lyubas, A. A., Tomilova, A. A., Vikhrev, I. V. (2022). First record of metacercariae trematodes *Opisthioglyphe ranae* (Digenea: Telorchidae) and *Echinostoma bolschewense* (Digenea: Echinostomatidae) in *Dreissena polymorpha*

- (Bivalvia: Dreissenidae) from the Don and Volga river basins, Russia. *Ecologica Montenegrina*, 54, 57-76.
- Birmani, N. A., Naz, S., Mouahid, G. (2019). First record of *Echinoparyphium recurvatum* (Trematoda, Echinostomatidae) in Pakistan with new avian definitive host, *Vanellus leucurus*. *Archives on Veterinary Science and Technology*, 3, 1-6.
- Born-Torrijos, A., van Beest, G. S., Vyhliđalová, T., Knudsen, R., Kristoffersen, R., Amundsen, P. -A., Thieltges, D. W., Soldánová, M. (2022). Taxa-specific activity loss and mortality patterns in freshwater trematode cercariae under subarctic conditions. *Parasitology*, 149, 457-468.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575-583.
- Caravedo, M. A., Cabada, M. M. (2020). Human fascioliasis: Current epidemiological status and strategies for diagnosis, treatment, and control. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 11, 149-158.
- Carlson, C. J., Dallas, T. A., Alexander, L. W., Phelan, A. L., Phillips, A. J. (2020). What would it take to describe the global diversity of parasites? *Proceedings of the Royal Society B. Biological Science*, 287, 1-12.
- Combes, C. (2001). *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press, Chicago, USA, 164, S90–S103.
- Combes, C., Bartoli, P., Théron, A. (2002). trematode transmission strategies, (str. 1-12). V: Lewis, E. E., Campbel, J. F., Sukhdeo, M. V. K. (Eds.). *The behavioural ecology of parasites*. CABI Publishing, NY, USA, 384 str.
- Combes, C., Fournier, A., Moné, H., Théron, A. (1994). Behaviours in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and processes. *Parasitology*, 109, S3-S13.
- Cribb, T. H., Bray, R. A., Olson, P. D., Littlewood, D. T. J. (2003). Life Cycle evolution in the Digenea: A new perspective from phylogeny. *Advances in Parasitology*, 54, 197-253.
- Cwiklinski, K., O'Neill, S. M., Donnelly, S., Dalton, J. P. (2016). A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunology*, 38, 558-568.
- de Montaudouin, X., Blanchet, H., Desclaux-Marchand, C., Lavesque, N., & Bachelet, G. (2016). Cockle infection by *Himasthla quissetensis* – I. From cercariae emergence to metacercariae infection. *Journal of Sea Research*, 113, 99-107.
- Dlouhá, D., Dubovský, V., Pospíšil, L. (2021). The evaporation estimation on lake Most. *MAPE*, 4, 221-231.

- Dobrovolskij, A. A. (1965). Some new data on the life-cycle of *Opisthioglyphe ranae* Fröhlich, 1791 (Plagiorchiidae). *Helminthologia*, 6, 205-221. (v ruštině)
- Esch, G. W., Curtis, L. A., Barger, M. A. (2001). A perspective on the ecology of trematode communities in snails. *Parasitology*, 123, S57-S74.
- Esch, G. W., Fernández, J. C. (1993). *A functional biology of parasitism: Ecology and evolutionary implications*. Chapman & Hall, Kalifornie, USA, 337 str.
- Faltýnková, A., Karvonen, A., Jyrkkä, M., Valtonen, E. T. (2009). Being successful in the world of narrow opportunities: Transmission patterns of the trematode *Ichthyocotylurus pileatus*. *Parasitology*, 136, 1375-1382.
- Faltýnková, A., Kudlai, O., Pantoja, C., Jouet, D., Skírnisson, K. (2023). Prey-mimetism in cercariae of *Apatemon* (Digenea, Strigeidae) in freshwater in northern latitudes. *Parasitology Research*, 122, 815-831.
- Faltýnková, A., Našincová, V., Kablásková, L. (2007). Larval trematodes (Digenea) of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.), (Gastropoda, Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. *Parasite*, 14, 39-51.
- Faltýnková, A., Sures, B., Kostadinova, A. (2016). Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe. *Systematic Parasitology*, 93, 283-293.
- Fingerut, J. T., Zimmer, C. A., Zimmer, R. K. (2003). Patterns and processes of larval emergence in an estuarine parasite system. *Biological Bulletin*, 205, 110-120.
- Fraker, M. E. (2008). The influence of the circadian rhythm of green frog (*Rana clamitans*) tadpoles on their antipredator behavior and the strength of the nonlethal effects of predators. *The American Naturalist*, 171, 545-552.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018). *Zoologie obratlovců* (3. dopl. vyd.). Academia, Praha, Česká republika, 693 str. (v češtině)
- Galaktionov, K. V. (2017). Patterns and processes influencing helminth parasites of Arctic coastal communities during climate change. *Journal of Helminthology*, 91, 387-408.
- Galaktionov, K. V., Dobrovolskij, A. A. (2003). *The biology and evolution of trematodes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nizozemsko, 620 str.
- Gibson, D. I., Bray, R. A., Harris, E. A. (Compiler). (2005). Host-Parasite Database of the Natural History Museum, London. Dostupné online: <https://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/> (navštíveno 11. dubna 2024)

- Goedknecht, M. A. (2015). Climate change and parasite transmission: how temperature affects parasite infectivity via predation on infective stages. *Ecosphere*, *96*, 1-9.
- Gopko, M., Mikheev, V. N. (2017). Parasitic manipulations of the host phenotype: Effects in internal and external environments. *Biology Bulletin Reviews*, *9*, 16-48.
- Grabda-Kazubska, B. (1969). Studies on abbreviation of the life cycle in *Opisthioglyphe ranae* (Frölich, 1791) and *O. rastellus* (Olsson, 1876) (Trematoda: Plagiorchiidae). *Acta Parasitologica Polonica*, *16*, 249-269.
- Grabda-Kazubska, B., Kisieliené, V. (1989). Chaetotaxy and excretory system of the cercaria of *Echinoparyphium recurvatum* (Linstow, 1873) (Digenea, Echinostomatidae). *Acta Parasitologica Polonica*, *34*, 325-335.
- Graham, A. L. (2003). Effect of snail size and age on the prevalence and intensity of avian schistosome infection: relating laboratory to field studies. *Journal of Parasitology*, *89*, 458-463.
- Gustafson, K. D., Bolek, M. G. (2015). Tradeoff Between establishing an infection and killing the host: Response of snails (*Physa acuta*) to a gradient of trematode (*Halipegus eccentricus*) Exposures. *Journal of Parasitology*, *101*, 104-107.
- Haas, W. (2003). Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology*, *106*, 349-364.
- Hannon, E. R., Calhoun, D. M., Chadalawada, S., Johnson, P. T. J. (2017). Circadian rhythms of trematode parasites: applying mixed models to test underlying patterns. *Parasitology*, *145*, 1-9.
- Hawking, F. (1975). Circadian and other rhythms of parasites. *Advances in Parasitology*, *13*, 123-182.
- Horák, P. (2010). Motolice – parazitičtí červi s nejkomplicovanějšími životními cykly. *Živa*, (5), 230-232.
- Huffman, J. E., Fried, B. (2012). The biology of *Echinoparyphium* (Trematoda, Echinostomatidae). *Acta Parasitologica*, *57*, 199-210.
- Infantes, L. R. R. H., Yataco, G. A. P., Ortiz-Martínez, Y., Mayer, T., Terashima, A., Franco-Paredes, C., Gonzalez-Diaz, E., Rodriguez-Morales, A. J., Bonilla-Aldana, D. K., Barahona, L. V., Grimshaw, A. A., Chastain, D. B., Sillau, S., Marcos, L. A., Henao-Martínez, A. F. (2023). The global prevalence of human fascioliasis: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, *10*, 1-18.

- Jamieson, B. G. M. (Ed.). (2017). *Schistosoma: Biology, pathology and control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 523 str.
- Johnson, P. T. J., Thieltges, D. W. (2010). Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *Journal of Experimental Biology*, 213, 961-970.
- Jourdane, J., Théron, A. (1987). Larval development: eggs to cercariae. *From genes to latrines*, 83-113.
- Kaewkes, S., Kaewkes, W., Boonmars, T. (2012). Effect of light intensity on *Opisthorchis viverrini* cercarial shedding levels from *Bithynia* snails – A preliminary study. *Parasitology International*, 61, 46-48.
- Karvonen, A., Savolainen, M., Seppälä, O., Valtonen, E. T. (2006a). Dynamics of *Diplostomum spathaceum* infection in snail hosts at a fish farm. *Parasitology research*, 99, 341-345.
- Karvonen, A., Terho, P., Seppälä, O., Jokela, J., Valtonen, E. T. (2006b). Ecological divergence of closely related *Diplostomum* (Trematoda) parasites. *Parasitology*, 133, 229-235.
- Khosravi, M., Díaz-Morales, D. M., Thieltges, D. W., Wahl, M., Vajedsamiei, J. (2023). Thermal optima of cercarial emergence in trematodes from a marine high-temperature ecosystem, the Persian Gulf. *Scientific Reports*, 13, 1-10.
- Kiatsopit, N., Sithithaworn, P., Kopolrat, K., Andrews, R. H., Petney, T. N. (2014). Seasonal cercarial emergence patterns of *Opisthorchis viverrini* infecting *Bithynia siamensis goniomphalos* from Vientiane Province, Lao PDR. *Parasites & Vectors*, 7, 1-6.
- Klohe, K., Koudou, B. G., Fenwick, A., Fleming, F., Garba, A., Gouvras, A., Harding-Esch, E. M., Knopp, S., Molyneux, D., D'Souza, S., Utzinger, J., Vounatsou, P., Waltz, J., Zhang, Y., Rollinson, D. (2021). A systematic literature review of schistosomiasis in urban and peri-urban settings. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15, 1-19.
- Koprivnikar, J., Poulin, R. (2009a). Effects of temperature, salinity, and water level on the emergence of marine cercariae. *Parasitology Research*, 105, 957-965.
- Koprivnikar, J., Poulin, R. (2009b). Interspecific and intraspecific variation in cercariae release. *Journal of Parasitology*, 95, 14-19.
- Koprivnikar, J., Thieltges, D. W., Johnson, P. T. J. (2023). Consumption of trematode parasite infectious stages: from conceptual synthesis to future research agenda. *Journal of Helminthology*, 97, 1-19.

- Korshunova, T., Martynov, A., Bakken, T., Picton, B. (2017). External diversity is restrained by internal conservatism: New nudibranch mollusc contributes to the cryptic species problem. *Zoologica Scripta*, 46, 1-10.
- Krupenko, D., Miroljubov, A., Faure, L., Minemizu, R., Haag, L., Lundgren, M., Kameneva, P., Kastriti, M. E., Adameyko, I. (2023). Polymorphic parasitic larvae cooperate to build swimming colonies luring hosts. *Current Biology*, 33, 4524-4531.
- Kundid, P., Pantoja, C., Janovcová, K., Soldánová, M. (2024). Molecular diversity of the genus *Plagiorchis* Lühe, 1899 in snail host of Central Europe with evidence of new lineages. *Diversity*, 16, 1-28.
- Kurane, I. (2010). The effect of global warming on infectious diseases. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 1, 4-9.
- Kuris, A. M., Hechinger, R. F., Shaw, J. C., Whitney, K. L., Aguirre-Macedo, L., Boch, C. A., Dobson, A. P., Dunham, E. J., Fredensborg, B. L., Huspeni, T. C., Lorda, J., Mababa, L., Mancini, F. T., Mora, A. B., Pickering, M., Talhouk, N. L., Torchin, M. E., Lafferty, K. D. (2008). Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries. *Nature*, 454, 515-518.
- Kutz, S. J., Jenkins, E. J., Veitch, A. M., Ducrocq, J., Polley, L., Elkin, B., Lair, S. (2009). The Arctic as a model for anticipating, preventing, and mitigating climate change impacts on host–parasite interactions. *Veterinary Parasitology*, 163, 217-228.
- Lawson, J. R., Wilson, R. A. (1980). The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. *Parasitology*, 81, 337-348.
- Lepš, J., Šmilauer, P. (2016). *Biostatistika*. EPISTEME nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, České Budějovice, Česká republika, 440 str. (v češtině)
- Lo, C. T., Lee, K. M. (1996). Pattern of emergence and the effects of temperature and light on the emergence and survival of heterophyid cercariae (*Centrocestus formosanus* and *Haplorchis pumilio*). *Journal of Parasitology*, 82, 347-350.
- Loker, E. S., Hofkin, B. V. (2015). *Parasitology: A conceptual approach*. Garland Science, NY, USA, 550 str.
- Lombardo, P., Miccoli, F. P., Giustini, M., Cicolani, B. (2010). Diel activity cycles of freshwater gastropods under natural light: Patterns and ecological implications. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 46, 29-40.

- Lowenberger, C. A., Rau, M. E. (1994). *Plagiorchis elegans*: emergence, longevity and infectivity of cercariae, and host behavioural modifications during cercarial emergence. *Parasitology*, *109*, 65-72.
- Lucius, R., Poulin, R. (2017). General aspects of parasite biology, str. 1–94. V: R. Lucius, B. Loos-Frank, R. P. Lane, R. Poulin, C. Roberts, R. K. Grensis (Eds.), *The biology of parasites*. Wiley-VCH, Weinheim, Německo, 472 str.
- Lyholt, H. C. K., Buchmann, K. (1996). *Diplostomum spathaceum*: Effects of temperature and light on cercarial shedding and infection of rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, *25*, 169-173.
- Maggioli, G., Salazar, C., Fossa, F., Carmona, C. (2020). Liver fluke vaccine assessment in cattle, str. 205-212. V: Cancela, M., Maggioli, G. (Eds.), *Fasciola hepatica methods and protocols*. Humana Press, New York, USA, 235 str.
- Marcogliese, D. J. (2001). Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment. *Canadian Journal of Zoology*, *79*, 1331-1352.
- Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, M. D. (2009). Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, *163*, 264-280.
- Massoud, J. (1974). The effect of variation in miracidial exposure dose on laboratory infections of *Ornithobilharzia turkestanicum* in *Lymnaea gedrosiana*. *Journal of Helminthology*, *48*, 139-144.
- McCarthy, A. M. (1999a). Photoperiodic cercarial emergence patterns of the digeneans *Echinoparyphium recurvatum* and *Plagiorchis* sp. from a mixed infection in *Lymnaea peregra*. *Journal of Helminthology*, *73*, 59-62.
- McCarthy, A. M. (1999b). Phototactic responses of the cercaria of *Echinoparyphium recurvatum* during phases of sub-maximal and maximal infectivity. *Journal of Helminthology*, *73*, 63-65.
- McKenzie, V. J., Townsend, A. R. (2007). Parasitic and infectious disease responses to changing global nutrient cycles. *EcoHealth*, *4*, 384-396.
- Moore, S., Siwertsson, A., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., Soldánová, M., Morton, D., Primicerio, R., Amundsen, P. A. (2024). Parasites alter food-web topology of a subarctic lake food web and its pelagic and benthic compartments. *Oecologia*, *204*, 257-277.
- Morley, N. J. (2011). Thermodynamics of cercarial survival and metabolism in a changing climate. *Parasitology*, *138*, 1442-1452.

- Morley, N. J. (2012). Cercariae (Platyhelminthes: Trematoda) as neglected components of zooplankton communities in freshwater habitats. *Hydrobiologia*, 691, 7-19.
- Morley, N. J. (2020). Cercarial swimming performance and its potential role as a key variable of trematode transmission. *Parasitology*, 147, 1369-1374.
- Morley, N. J., Adam, M. E., Lewis, J. W. (2010). The effects of host size and temperature on the emergence of *Echinoparyphium recurvatum* cercariae from *Lymnaea peregra* under natural light conditions. *Journal of Helminthology*, 84, 317-326.
- Morley, N. J., Crane, M., Lewis, J. W. (2003). Cadmium toxicity and snail – digenean interactions in population of *Lymnaea* spp. (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Helminthology*, 77, 49-55.
- Morley, N. J., Lewis, J. W. (2013). Thermodynamics of cercarial development and emergence in trematodes. *Parasitology*, 140, 1211-1224.
- Mouritsen, K. N. (2002). The *Hydrobia ulvae*–*Maritrema subdolum* association: influence of temperature, salinity, light, water-pressure and secondary host exudates on cercarial emergence and longevity. *Journal of Helminthology*, 76, 341-347.
- Nadler, L. E., Adamo, S. A., Hawley, D. M., Binning, S. A. (2023). Mechanisms and consequences of infection-induced phenotypes. *Functional Ecology*, 37, 796-800.
- Našincová, V. (1992). *Vývojová stádia motolic v našich vodních plžích a vývojové cykly vybraných druhů čeledi Omphalometridae a Echinostomatidae* [Kandidátská disertační práce]. Parazitologický ústav ČSAV.
- Nikolaev, K. E., Levakin, I. A., Galaktionov, K. V. (2021). A month for the mission: using a sentinel approach to determine the transmission window of digenean cercariae in the subarctic White Sea. *Journal of Helminthology*, 95, e50.
- Olson, P. D., Cribb, T. H., Tkach, V. V., Bray, R. A., Littlewood, D. T. J. (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33, 733-755.
- Paull, S. H., Johnson, P. T. J. (2014). Experimental warming drives a seasonal shift in the timing of host-parasite dynamics with consequences for disease risk. *Ecology Letters*, 17, 445-453.
- Paull, S. H., Lafonte, B. E., Johnson, P. T. J. (2012). Temperature-driven shifts in a host-parasite interaction drive nonlinear changes in disease risk. *Global Change Biology*, 18, 3558-3567.

- Paull, S. H., Raffael, T. R., LaFonte, B. E., Johnson, P. T. J. (2014). How temperature shifts affect parasite production: testing the roles of thermal stress and acclimation. *Functional Ecology*, 29, 941-950.
- Pechenik, J. A., Fried, B. (1995). Effect of temperature on survival and infectivity of *Echinostoma trivolvis* cercariae: a test of the energy limitation hypothesis. *Parasitology*, 111, 373-378.
- Pešout, P., Porteš, M., Pixová, K. Č., Hendrychová, M., Kříž, P., Lacina, D. (2022). Ecosystem restoration of brown coal open-pit mines. *The Nature Conservation Journal*, 77, 34-39.
- Pietroock, M., Marcogliese, D. J. (2003). Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. *Trends in Parasitology*, 7, 293-299.
- Poulin, R. (2006). Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132, 143-151.
- Poulin, R. (2010). Parasite manipulation of host behavior: An update and frequently asked questions. *Advances in the Study of Behaviour*, 41, 151-186.
- Poulin, R., Morand, S. (2000). The diversity of parasites. *The quarterly review of biology*, 75, 277-293.
- Preston, D. L., Orlofske, S. A., Lambden, J. P., Johnson, P. T. J. (2013). Biomass and productivity of trematode parasites in pond ecosystems. *Journal of Animal Ecology*, 82, 509-517.
- Příkryl, I., Havel, L. (2010). Hydrická rekultivace zbytkových jam po těžbě hnědého uhlí II – Barbora a Chabařovice. *Limnologické noviny*, 4, 1-6.
- Reece, S. E., Prior, K. F., Mideo, N. (2017). The life and times of parasites: Rhythms in strategies for within-host survival and between-host transmission. *Journal of Biological Rhythms*, 32, 516-533.
- Selbach, C., Poulin, R. (2020). Some like it hotter: trematode transmission under changing temperature conditions. *Oecologia*, 194, 745-755.
- Selbach, C., Rosenkranz, M., Poulin, R. (2019). Cercarial behavior determines risk of predation. *Journal of Parasitology*, 105, 330-333.
- Seppälä, O., Louhi, K. R., Karvonen, A., Rellstab, C., Jokela, J. (2015). Relative reproductive success of co-infecting parasite genotypes under intensified within-host competition. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 36, 450-455.

- Shostak, A. W., Esch, G. W. (1990). Photocycle-dependent emergence by cercariae of *Halipegus occidualis* from *Helisoma anceps*, with special reference to cercarial emergence patterns as adaptations for transmission. *Journal of Parasitology*, *76*, 790-795.
- Soldánová, M., Born-Torrijos, A., Kristoffersen, R., Knudsen, R., Amundsen, P. A., Scholz, T. (2022). Cercariae of a bird schistosome follow a similar emergence pattern under different subarctic conditions: First experimental study. *Pathogens*, *11*, 1-23.
- Soldánová, M., Faltýnková, A., Scholz, T., Kostadinova, A. (2011). Parasites in a man-made landscape: contrasting patterns of trematode flow in a fishpond area in Central Europe. *Parasitology*, *138*, 789-807.
- Soldánová, M., Selbach, C., Sures, B., Kostadinova, A., Pérez-del-Olmo, A. (2010). Larval trematode communities in *Radix auricularia* and *Lymnaea stagnalis* in a reservoir system of the Ruhr River. *Parasites & Vectors*, *3*, 1-13.
- Soldánová, M., Selbach, C., & Sures, B. (2016). The early worm catches the bird? Productivity and patterns of *Trichobilharzia szidati* cercarial emission from *Lymnaea stagnalis*. *PLoSOne*, *11*, 1-21.
- Stanicka, A., Soldánová, M., Migdalski, Ł., Szopieray, K., Lesiak, K., Cichy, A., Żbikowska, E., Jermacz, Ł. (2023). New species, new story: The impact of invasive non-host predators on host-trematode interactions. *Freshwater Biology*, *68*, 1-12.
- Stebbins, R. C., Cohen, N. W. (1997). *A natural history of amphibians*. Princeton University Press, Princeton, NY, USA, 332 str.
- Struck, T. H., Cerca, J. (2019). Cryptic species and their evolutionary significance. *European Lisp Symposium*, 1-9.
- Studer, A., Lamare, M. D., Poulin, R. (2012). Effects of ultraviolet radiation on the transmission process of an intertidal trematode parasite. *Parasitology*, *139*, 537-546.
- Studer, A., Poulin, R. (2013). Differential effects of temperature variability on the transmission of a marine parasite. *Marine Biology*, *160*, 2763-2773.
- Sukhdeo, M. V. K., Sukhdeo, S. C. (2004). Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. *Canadian Journal of Zoology*, *82*, 292-315.
- Sures, B., Nachev, M., Pahl, M., Grabner, D., Selbach, C. (2017). Parasites as drivers of key processes in aquatic ecosystems: facts and future directions. *Experimental Parasitology*, *180*, 1-24.
- Szopieray, K., Żbikowska, E. (2021). Positive ecological roles of parasites. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, *67*, 289-300.

- Šarounová, P. (2011). *Effect of temperature on emergence of cercariae of model freshwater trematodes* [Bc. Thesis]. Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice.
- Taskinen, J., Choo, J. M., Mironova, E., Gopko, M. (2022). Contrasting temperature responses in seasonal timing of cercariae shedding by *Rhipidocotyle* trematodes. *Parasitology*, *149*, 1045-1056.
- Théron, A. (1981). Dynamics of larval populations of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *75*, 71-77.
- Théron, A. (2015). Chronobiology of trematode cercarial emergence: From data recovery to epidemiological, ecological and evolutionary implications. *Advances in Parasitology*, *88*, 123-164.
- Thieltges, D. W., Jensen, K. T., Poulin, R. (2008). The role biotic factors in the transmission of free-living endohelminth stages. *Parasitology*, *135*, 407-426.
- Thieltges, D. W., Rick, J. (2006). Effect of temperature on emergence, survival and infectivity of cercariae of the marine trematode *Renicola roscovita* (Digenea: Rencolidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, *73*, 63-68.
- Toledo, R., Esteban, G. (2016). An update on human echinostomiasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*, 37-45.
- Toledo, R., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J.G. (1999). Production and chronobiology of emergence of the cercariae of *Euparyphium albufereensis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology*, *85*, 263-267.
- Umadevi, K., Madhavi, R. (1997). Effects of light and temperature on the emergence of *Haplorchis pumilio* cercariae from the snail host, *Thiara tuberculata*. *Acta Parasitologica*, *42*, 12-17.
- Vavřík, M., Šírek, J., Šindel, M., Mlíkovský, J., Horáček, J., Heyrovský, D., Šimek, J. (2019). Revize záznamů vzácných druhů ptáků v České republice: Revision of records of rare bird species in the Czech Republic. *Sylvia*, *55*, 1-74.
- Vinarski, M. V., & Aksenova, O. V. (2023). Ecology of lymnaeid snails, str. 227-263. V: M. V. Vinarski & A. A. Vázquez (Eds.), *The Lymnaeidae*. Springer Nature Switzerland AG.
- Vyhliďalová, T., Soldánová, M. (2020). Species-specific patterns in cercarial emergence of *Diplostomum* spp. from snails *Radix lagotis*. *International Journal for Parasitology*, *50*, 1177-1188.

- Watertor, J. L. (1968). Effect of temperature stress on growth and development of larval and adult *Telorchis bonnerensis* (Trematoda: Telorchidae). *Journal of Parasitology*, 54, 506-508.
- You, Q., Jiang, Z., Yue, X., Guo, W., Liu, Y., Cao, J., Li, W., Wu, F., Cai, Z., Zhu, H., Li, T., Liu, Z., He, J., Chen, D., Pepin, N., Zhai, P. (2022). Recent frontiers of climate changes in East Asia at global warming of 1.5°C and 2°C. *Climate and atmospheric science*, 5, 1-17.
- Žbikowska, E., Kobak, J., Žbikowski, J., Kałkowski, J. (2006). Infestation of *Lymnaea stagnalis* by digenean flukes in the Jeziorak Lake. *Parasitology Research*, 99, 434-439.
- Žbikowska, E., Marszewska, A. (2018). A Thermal preferences of bird schistosome snail hosts increase the risk of swimmer's itch. *Journal of Thermal Biology*, 78, 22-26.
- Zhytova, E., Romanchuk, L. D., Gural'ska, S. V., Andreieva, O. Y., Shvets, M. V. (2019). Circulation pathways of trematodes of freshwater gastropod mollusks in forest biocenoses of the Ukrainian Polissia. *Vestnik Zoologii*, 53, 13-22.
- Zwach, I. (2009). *Obojživelníci a plazi České republiky*. Grada Publishing, Praha, Česká republika, 496 str. (v češtině)
- Žižka, L., Burda, J. (2020). Chapter I: Post exploitation lakes in Czech Republic – lake Most, str. 11-45. V: Burda, J., Bajcar, A. (Eds.), *Post exploitation lakes, risk assessment of final pits during flooding*. Zpravodaj Hnědé Uhlí, Most, Česká republika, 96 str.
- Žižka, L., Valvoda, P., Burda, J. (2020). Chapter I: Post exploitation lakes in Czech Republic – lake Medard, str. 47-59. V: Burda, J., Bajcar, A. (Eds.), *Post exploitation lakes, risk assessment of final pits during flooding*. Zpravodaj Hnědé Uhlí, Most, Česká republika, 96 str.