

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Experimentální in-vitro chovy invazního druhu škeblice
asijská (*Sinanodonta woodiana*)**

Bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Jeřábková

Obor studia: ABPS

Vedoucí práce: Ing. Karel Douda, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Experimentální in-vitro chovy invazního druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za vstřícnost, ochotu a pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Poděkování také patří mým rodičům za trpělivost, podporu a umožnění studia.

Experimentální in-vitro chovy invazního druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*)

Souhrn

Tato bakalářská práce pojednává o složitém rozmnožovacím cyklu mlžů z čeledi Unionidae. První část se skládá z rešerše, druhá část sestává z experimentu s glochidii druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) (Lea, 1834).

Cílem rešeršní části bakalářské práce je přiblížit problematiku rozmnožování této čeledi a laboratorní podmínky chovu in vitro. Je zde rozebrán reprodukční cyklus v přirozených podmínkách u čeledi Unionidae a konkrétně u zkoumaného druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*). Dále se zde pojednává o in vitro chovech mlžů v laboratorních podmínkách a dosažení úspěšné transformace glochidií do stádia juvenilů bez hostitelské ryby. V práci jsou také zmíněny dva postupy odběru glochidií z gravidních samic a popis přípravy na kultivaci. Problematickými faktory pro kultivaci byla teplota CO₂ inkubátoru, koncentrace CO₂, pH hodnota kultivačního média a doba ukončení kultivace. Dále je řešeno složení kultivačního média. V této části se pojednává o jednotlivých komponentech, které jsou použity pro sestavení celkového kultivačního média. Komponenty zahrnují připravené médium, zdroj bílkovin v podobě séra, antibiotika, antimykotika a zdroje lipidů. Hlavním cílem první části bylo shrnout in vitro metody chovu glochidií.

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo provést experiment, ve kterém by došlo k transformaci glochidií druhu škeblice asijské *Sinanodonta woodiana* v in vitro podmínkách do juvenilního stádia. Transformace proběhla za pomoci kultivačního média a CO₂ inkubátoru. Kultivační médium M199 bylo použito už namíchané. Transformace proběhla úspěšně. Z výsledků je patrné, že tímto způsobem lze dosáhnout úspěšné transformace.

V diskuzi je nastíněno využití in vitro chovu, a jak důležitou roli hraje v reprodukci druhů mlžů, které mají jako hostitele vzácné nebo chráněné druhy ryb.

Klíčová slova: invazní druhy, experimentální chovy, parazitické stádium, biologické invaze

Experimental in-vitro culture of the invasive species

Sinanodonta woodiana

Summary

This bachelor thesis deals with the complex reproductive cycle of bivalvia from the Unionidae family. The first part includes a review, the second part contains an experiment with glochidia of the species *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834).

The aim of the research part of the thesis is to describe problems of reproduction of this family and also laboratory conditions of in-vitro culture. There is also analysed the reproductive cycle of the family Unionidae in natural conditions and specifically the examined species *Sinanodonta woodiana*. This thesis also deals with the in-vitro culture of bivalvia in laboratory conditions and also with the attainment of the successful transformation of glochidia up to the stadium of juvenile without host fish. In this thesis, there are also mentioned two methods of taking the glochidia from gravid females and a description of preparing for the cultivation. Problematic factors for the cultivation were: the temperature of CO₂ in the incubator, the concentration of CO₂, pH of the cultivating medium and the period of the end of the cultivation. Then there is also solved the composition of the cultivating medium. In this part, particular components which are used for the composition of the whole cultivating medium are treated. The components include the prepared medium, the source of proteins in the form of the serum, antibiotics, antimycotics, and the sources of lipids. The main aim of the first part was to summarize in-vitro methods of the glochidia cultivation.

The aim of the practical part of this bachelor thesis was to perform an experiment in which it could come to the transformation of glochidia of the species *Sinanodonta woodiana* in in-vitro conditions up to juvenile stadium. The transformation was run with the aid of the cultivating medium and CO₂ incubator. The cultivating medium M199 was already used mixed. The transformation was successful. From the results, it is apparent that it is possible to achieve a successful transformation when using this method. In the discussion, the application of the in-vitro culture is outlined and also how it is important when speaking about the reproduction of species, whose hosts are rare or protected fishes.

Keywords: invasive species, experimental culture, parasitic stage, biological invasion

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Rozmnožovací cyklus mlžů z čeledi velevrubovití (Unionidae)	3
3.1.1	In vitro chov	4
3.1.2	Získ materiálu a technika in vitro	6
4	Metodika.....	9
4.1	Experimentální druh	9
4.2	Průběh experimentu.....	10
4.2.1	Odběr glochidií.....	10
4.2.2	Materiál	11
4.2.3	Časový plán	12
4.2.4	Kultivace	13
4.3	Medium	13
4.3.1	Příprava media M199	13
4.3.2	Složky obsažené v médiu	14
5	Výsledky	16
5.1.1	Statistické vyhodnocení.....	16
5.1.2	Výsledné hodnoty	17
6	Diskuze.....	20
6.1	Srovnání experimentů in vitro	20
6.2	Výhody in vitro a možné využití v průmyslu	21
6.3	In vitro z hlediska ochrany živočichů	23
6.3.1	Potřeba hostitelské ryby.....	23
6.3.2	Invazní druh	24
7	Závěr	28
8	Literatura	29
9	Přílohy	34

1 Úvod

Nepůvodní druhy živočichů a rostlin jsou jednou z hlavních příčin ohrožení řady původních společenstev a někdy i celých ekosystémů (Beran, 2017). Většina mlžů z čeledi velevrubovití (Unionidae) je zařazena mezi ohrožené, zranitelné nebo dokonce vyhynulé druhy. Je to z důvodu jejich složitého rozmnožovacího cyklu, kdy během transformace larvy (glochidia) v mladého jedince (juvenila) dochází k parazitaci na vhodné hostitelské rybě (Lima et al. 2012). Řadí se mezi jednu z nejvíce ohrožených taxonomických skupin na světě (Lydeard et al. 2004).

V práci se však pojednává o laboratorních podmínkách chovu těchto mlžů a jako metody se využívají in vivo a in vitro. V in vivo dochází k infestaci ryb (ryba v nádrži s glochidii odebranými z gravidní samice) a v in vitro se glochidia umístí do kultivačního media, kde dokončí svůj vývoj. V textu se pojednává pouze o in vitro metodě chovu. Tato metoda představuje nový a alternativní způsob transformace mlžů, který nabízí možnost získat větší počet juvenilů bez přítomnosti hostitelské ryby a také za nižší náklady na jedince (Lima et al. 2012).

Zkoumaným druhem je škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) (Lea, 1834), která je zařazena do čeledi Unionidae, tudíž by měla patřit mezi ohrožené druhy, ale řadí se do invazních druhů a její vývojový cyklus a biologie jsou velmi specifické. Její vývojový cyklus obsahuje larvální parazitické stádium, které může využít jako hostitele téměř každý rybí druh, s nímž přijde do kontaktu (Douda et al. 2016).

Z hlediska využití byli sladkovodní mlži v minulosti využíváni jako důležité zdroje potravy, ozdoby oblečení nebo domácnosti, ale také se řadili mezi indikátory znečištěné vody a invazní škůdce. Teprve nedávno si ekologové uvědomili, že sladkovodní mlži hrají v našem ekosystému velmi důležitou roli. Avšak jejich funkční význam není zatím zcela doceněn (Strayer et al. 1999).

2 Cíl práce

Cílem práce je rozšířit možnosti výzkumu invazního druhu škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) v laboratorních podmínkách prostřednictvím vývoje in-vitro technik chovu. Součástí práce je odběr glochidií a experimentální test ověření podmínek pro larvální stádium tohoto invazního druhu. Součástí je inkubace odebraných glochidií v CO₂ inkubátoru.

3 Literární rešerše

3.1 Rozmnožovací cyklus mlžů z čeledi velevrubovití (Unionidae)

Sladkovodní mlži z čeledi Unionidae se vyskytují po celém světě. Největší zastoupení však mají v Severní Americe (Lydeard et al. 2004). Životní cyklus této skupiny sladkovodních mlžů je velice specifický a zahrnuje část života, kdy larvy parazitují na hostitelské rybě, pro ně vhodného druhu a uchycují se na jejím těle. Tímto procesem zahajují svůj vývoj z larválního stádia do volně žijícího mladého jedince, který dále pokračuje ve svém vývoji do dospělého jedince (Lima et al. 2012).

Mlži z této čeledi mají oddělená pohlaví, jedná se tedy o gonochoristy. Samice klade neoplozená vajíčka do marsupíí, což jsou komory uvnitř žaberních listů mlžů. Samec poté vypustí do vodního sloupce spermie, které samice nasává sifonem a dochází k oplození. Uvnitř samice jsou oplozená vajíčka uchována do doby, než dosáhnou larválního stádia (Barnhart, 2008). Larvální stádium se nazývá glochidium a po uvolnění z gravidní samice se připojuje na rybího hostitele (Blažek & Gernar, 2006). Glochidia jsou morfologicky jednoduchá a mají pouze jeden sval, který umožňuje pohyb lastury (Kern, 2017). Jsou tvořena dvěma trojúhelníkovitými lasturkami se zaoblenými okraji a jejich velikost je v zavřené poloze 360 - 400 μm . Rozdílný tvar od ostatních sladkovodních škeblí můžeme pozorovat u zkoumané škeblice asijské, která má lasturu mírně asymetrickou (Douda et al. 2016).

Typickou funkcí parazitické larvy je přichycení na kůži hostitelské ryby, kde dochází k obklopení larvy tenkou hyalinní membránou hostitelského původu (Blažek & Gernar, 2006). Vzhledem k tomuto procesu by se přichycení mělo nazývat zapouzdrění, ale tento jev se stále zkoumá a je o něm známo velmi málo informací (Reis et al. 2014). Poté co se zapouzdrí, zůstávají glochidia na hostitelské rybě, až do doby kdy je přeměna dokončena. Tato doba trvání závisí na teplotě vody. Je nutno podotknout, že přichycení k hostitelské rybě není u všech druhů stejné, glochidia jsou uvolňována v různých obdobích roku a jejich připojení na rybího hostitele je zcela náhodný proces (Blažek & Gernar, 2006).

Dle uzpůsobení se glochidia dělí na glochidia s háčky a bez háčků. Glochidia s háčky mají schopnost se zapouzdrít na ploutvích a povrchu těla u mnoha hostitelských druhů ryb. Glochidia bez háčků se zapouzdrí na žábřácích a tím si snižují množství možných hostitelů (Reis et al. 2014). Většina sladkovodních mlžů, kteří jsou hostitelsky specifictí je řazena do čeledi Margaritiferidae, podčeledi Ambleminae a Lamprosilinae. Jedinci z této čeledi parazitují

většinou na žábrách, což je bezpečnější pro jejich glochidia bez háčků. Tento fakt je poněkud nepřesný, protože glochidia s háčky, která patří do čeledi Unionidae se přichycují také na žábry. Příkladem může být druh *Unio tumidiformis* (parazituje pouze na rybách z rodu *Squalius*), který upřednostňuje parazitaci glochidií na žábrách rybiho hostitele. Z několika studií bylo zjištěno, že se glochidia připojují zejména na ryby žijící ve stejném prostředí jako samice, ze kterých pochází, ale jen pár z nich úspěšně završí transformaci v juvenilního jedince. Pokud se glochidia připojí na nevhodného hostitele, vytvoří se cysta, která do několika hodin nebo dnů eliminuje glochidia a ta následně umírají (Blažek & Gernar, 2006). Proto je specifikace hostitelské ryby velmi důležitá a glochidia mohou parazitovat na více nebo jen na jednom druhu ryb (Lima et al, 2012).



Obrázek č. 1: *Glochidia škeblice asijské* (foto K. Douda)

Zdroj: (Douda et al. 2016)

3.1.1 In vitro chov

Odchov in vitro je uměle aplikovaná metoda, která umožňuje mlžům dokončit svůj vývoj z larválního stádia do mladistvého jedince bez použití hostitelské ryby (Lima et al. 2012). Aktuálně bylo touto metodou úspěšně transformováno 42 druhů, včetně několika ohrožených

(například: *Cyprogenia stegaria* , *Epioblasma capsaeformis* , *Epioblasma brevidens* a *Lampsilis abrupta*) (Lima et al. 2012). Za použití současných metod in vitro jsou glochidia schopna dokončit svůj životní cyklus larvy v Petriho misce, která obsahuje umělé médium pro kultivaci buněk, rybí sérum a mix antibiotik, čímž ztrácí potřebu zapouzdřit se do hostitelské tkáně (Lima et al. 2012). Vzhledem k tomu, že se populace sladkovodních mlžů pozvolna snižuje, odchov in vitro se stává velmi důležitou metodou pro jejich zachování. Zatímco obecné parametry se u sladkovodních mlžů moc neliší, nutriční a technické parametry, např. strava, proudění a kvalita vody, kontrola dravce a velikost sedimentu, se mohou lišit jak druhově tak specificky (Lima et al. 2012). Současně s in vitro metodou odchovu glochidií je známa metoda umělé infestace ryb, která již byla v mnoha případech úspěšná stejně jako in vitro. Metoda in vitro představuje alternativní proces umožňující úspěšnou produkci velkého množství juvenilů, kteří mohou být později využiti pro průmysl ke zpracování perel a laboratorní práci (Lima et al. 2012).

První snahy o reprodukci sladkovodních mlžů byly podobné infestaci ryb, což je proces, ke kterému dochází ve volné přírodě. Do akvária umístěného v laboratoři se přidala gravidní samice, ke které byly poté dodány vybrané druhy hostitelských ryb. Glochidia vypuštěná z gravidní samice volně plavala v nádrži a přichytila se na dodanou hostitelskou rybu, která byla tímto způsobem infikována. Tento experiment byl však časově náročný, tudíž nedošlo ke kontrolám a nejsou o něm další informace (Lima et al. 2012).

Další snahy o reprodukci zahrnovaly umělý odběr glochidií z gravidní samice. Tento způsob zahrnoval dvě metody infestace - přímou a suspenzační. U metody přímé se cíleně mířilo na ústa a žábry ryby pipetou, která obsahovala glochidia. U metody suspenzační se využila provzdušněná nádrž s volně pohybujícími se glochidii, do které se umístila ryba. Suspenzační infestace byla dle poznatků úspěšnější, z důvodu více přichycených glochidií. (Lima et al. 2012). Některé druhy glochidií se lépe vyvíjejí v médiích, kde je přítomna plasma hostitelských ryb, které jsou pro daný druh vhodné. Z tohoto zjištění plyne, že úspěšnost metody in vitro může také záviset na informovanosti o hostiteli a jeho plasmě (Lima et al. 2012).

První pokusy in vitro metody byly prováděny dle Ellis & Ellis (1926), kteří publikovali techniku, kde docházelo k vyříznutí glochidií ze zaplněných žaberních tkání. Detaily médií použitých v tomto experimentu nebyly nikdy zveřejněny. Tato technika se dostala do podvědomí o něco později, když Isom & Hudson použili techniku buněčné kultury a úspěšně transformovali glochidia z několika druhů sladkovodních mlžů bez potřeby rybiho hostitele.

V této práci se autoři zasloužili o vznik nové kultury média složené z modifikované *Unionid Ringers*. Vznik tohoto média byl obohacen o rybí plazmu a roztok antibiotik (Lima et al. 2012). Co se týče fyziologických solí, základní modifikovaná *Unionid Ringers* zahrnovala odstranění K_2HPO_4 a přidání 2,2 g $NaHCO_3$ na liter. Použitý $NaHCO_3$ pufr vyžadoval jiné atmosférické hodnoty, tudíž optimální koncentrace CO_2 , která sloužila k regulaci pH byla stanovena na 5%. V další jednoduché modifikaci byly přidány vitamíny a aminokyseliny. V použitém médiu s buněčnou kulturou byl přítomen taurin a ornitin, které se přirozeně vyskytují v rybí krvi. Nejkritičtějším bodem sestavení média bylo přidání rybí plazmy, která slouží jako zdroj živin a růstových hormonů přirozeně se vyskytujících v rybím hostiteli a jsou nezbytné pro vývoj glochidií (Lima et al. 2012).

3.1.2 Zisk materiálu a technika in vitro

In vitro metoda chovu umožňuje glochidiím dokončit svůj vývoj v mladistvého jedince bez potřeby přítomnosti hostitelské ryby. Tato metoda zahrnuje využití media (M199 nebo DMEM) a koncentrace 1 – 5 % CO_2 , které je důležité pro udržení stabilního fyziologického roztoku, pH a pro dokončení vývoje bez přítomnosti rybího hostitele (Wen et al. 2018). Ve srovnání s tradiční infestací ryb má kultura in vitro mnoho výhod, např. velký počet vyprodukovaných jedinců, nižší náklady na juvenilny, využití glochidií a nízká míra úmrtnosti. Tato metoda je velmi důležitá pro rozmnožení druhů mlžů, u kterých je neznámý rybí hostitel (Wen et al. 2018). Mezi nevýhody lze zařadit možnost zakalení média (ztížené kontroly jedinců) nebo náchylnost k plísňovým a bakteriálním infekcím (Lima et al. 2012).

Glochidia jsou schopna dokončit svůj vývoj v juvenilny za přítomnosti média, které se podobá rybí plazmě a funguje jako zdroj bílkovin (Uthaiwan et al. 2001a). Zisk glochidií z dospělého jedince může být proveden dvěma způsoby. Přirozeným způsobem, kdy glochidia samice přirozeně vypustí nebo přímým narušením žaberních tkání a následným proplachem (Barnhart & Roberts, 1999). Glochidia, která jsou přirozeně vypuštěna samicí do vody, mohou být více náchylná na kontaminaci bakteriální nebo plísňovou infekcí na rozdíl od glochidií odebraných uměle přímo z marsupíí samice mlže (Barnhart & Roberts, 1999). Odběr glochidií z gravidní samice probíhá dvěma způsoby. V jednom případě se marsupia ze samice vyříznou a propláchnou deionizovanou vodou (Isom & Hudson, 1982), v druhém případě se lastura otevře speciálními kleštěmi a marsupia se naříznu. Prostor s glochidii se poté vypláchne sterilizovanou vodou a tím dojde k jejich zisku. Způsob, ve kterém se marsupia samice

naříznu je vůči glochidiím ohleduplnější (Barnhart & Roberts, 1999). K proplachu je zapotřebí injekční stříkačka s adekvátními rozměry vůči velikosti samice, u které k odběru dochází. Metoda s umělým odběrem glochidií z marsupia samice byla již využita v mnoha úspěšných experimentech (Barnhart & Roberts, 1999; Lima et al. 2006; Taskinen et al. 2011). Glochidia získaná z přirozeného uvolnění samicí a poté kultivována, byla rychleji kontaminována organismy, než glochidia odebraná přímo z marsupii samice a přesunuta do sterilní vody (Barnhart & Roberts, 1999).

Když glochidia dokončují svůj vývoj v mladistvého jedince, zabarvují se do hnědé barvy, jinak je jejich barva žlutá. Z tohoto důvodu byla pro úspěšnou kultivaci vybrána glochidia odebraná ze zralých samic s hnědě zabarvenými marsupii (Kovitvadhi, 2012).

Jedinci z vhodné samice byli po odběru z marsupii propláchnuti sterilizovanou destilovanou vodou. Poté byli pomocí sterilizované 1 ml injekční stříkačky aplikováni do misky se sterilizovanou destilovanou vodou a pozorováni pod světelným mikroskopem (x 400). Pokud bylo zaznamenáno periodicky se opakující zavírání a otevírání lasturek, byla glochidia pomocí sterilizované destilované vody zbavena zbytku tkání a nečistot a připravena pro následnou kultivaci (Kovitvadhi, 2012). Před již zmíněným vložením glochidií do kultivačních misek je důležité zkontrolovat množství a životnost studovaných jedinců. Životnost lze zjistit náhledem mikroskopu o zvětšení x100, pokud se glochidia pohybují (zavírání a otevírání lastury), jejich životnost je velmi dobrá (Lima et al. 2006). Vitalitu glochidií je možné také zjistit, přidáním roztoku NaCl. Při kontaktu s touto chemickou látkou dochází k uzavření lastury. Pokud na tuto chemickou látku někteří jedinci nezareagovali a jejich lastura zůstala otevřená, považujeme jedince za mrtvé. V zámku lastury je přítomen sval, který po smrti jedince přestane plnit svojí funkci a lastura tudíž zůstane otevřená (Barnhart & Roberts, 1999). Glochidia po odebrání z marsupii samice musí být přesunuta do kultivačního media maximálně do 5 hodin od odběru (Kovitvadhi, 2012).

Dále je potřeba se zaměřit na vhodnou teplotu, kterou stanovili Isom a Hudson pro in vitro podmínky 23°C (při vyšší teplotě klesá schopnost vývoje) (Roberts & Barnhart, 1999). Při pokusech pro zjištění vhodné teploty došlo k několika experimentům s rybími hostiteli. Pokud se teplota pohybovala kolem 10°C, došlo k metamorfóze více jedinců než při teplotě nad 10°C. U pokusů provedených in vitro metodou tomu bylo naopak (Roberts & Barnhart, 1999). Tvrzení Isoma a Hudsona, že při teplotě 23° C klesá možnost vzniku bakteriálních a plísňových infekcí se potvrdilo a tato informace je důležitější pro in vitro chovy než informace o potřebě určité teploty (Roberts & Barnhart, 1999).

Při in vitro experimentech jsou glochidia umístěna do Petriho misek, kde je přítomno kultivační médium. Následně se pak přemístí do CO₂ inkubátoru, kde je koncentrace CO₂ nastavena na 5%, koncentrace O₂ na 195 % a vlhkost vzduchu na 50 %. Vnitřní teplota v inkubátoru je udržována na $\pm 23^{\circ}\text{C}$, do té doby, než glochidia dokončí svůj vývoj v juvenilny. Dokončení vývoje značí pohybující se noha mimo lasturu. Zastoupení mrtvých glochidií a jejich celkové počty jsou zjištěny za pomoci světelného mikroskopu. V této fázi se také vyhodnocuje celkový počet úspěšně transformovaných glochidií (Roberts & Barnhart, 1999).

4 Metodika

V této kapitole je popsán experiment na druhu škeblice asijská. Cílem experimentu bylo úspěšné dokončení vývoje glochidií (larev) v juvenilny (mladistvé jedince) v laboratorních podmínkách metodou in vitro.

4.1 Experimentální druh

Jako experimentální druh pro tento pokus byl zvolen sladkovodní mlž z čeledi Unionidae, škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*).

Škeblice asijská je původně z Asie a do Evropy se zřejmě dostala v larválním stádiu na žábrách asijských amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*) či tolstolobiků bílých (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Beran, 2014). V České republice obývá hlavně rybníky, ramena řek, pomalu tekoucí toky a kanály v záplavových oblastech, kde se nejčastěji vyskytuje v blátivých sedimentech (Beran, 2008). Škeblice asijská je druhem, který využívá velmi široké pásmo rybích hostitelů. Může tak využívat i ryby, na které jsou vázány naše původní druhy mlžů, a snížit tak nejen fitness rybích hostitelů, ale i možnost jejich parazitace (Douda et al. 2017).

Škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) je gonochorista, ale můžeme vzácně nalézt i hermafrodita. Jedinci se dožívají kolem 15 let a pohlavně dospívají kolem 2 roku života. Samice nasává spermie, které vypouští do vody samec a poté dochází k oplození vajíček v suprabranchiální komoře mlže, kde jsou vajíčka přesunuta do marsupii (žaberní lupeny mlžů). Zde jsou uchována vajíčka do doby, než dozrají do parazitické fáze (glochidia). Když parazitické larvy dozrají, jsou vypuštěny do vody a infikují hostitelské ryby. Samice produkují glochidia během vegetační sezóny opakovaně. Nejvyšší riziko infikace ryb nastává v letních měsících (červen - září), jelikož v tuto dobu produkují samice nejvíce glochidií (Douda et al. 2016). Dospělá samice je schopna každý rok vyprodukovat až sto tisíc glochidií (Douda et al. 2017). Glochidium se pohybuje volně ve vodě a samostatně dokáže žít jen několik dní. Když dojde ke kontaktu s tkání ryby, lasturka se prudce zaklapne a v okolí glochidia se vytvoří cysta, která je tvořena tkání hostitele. Nejčastěji se glochidium uchytí a vyvíjí na ploutvích a žábrách, ale je zaznamenáno, že se uchytilo i na jiných částech těla ryby (např. ústa, skřele, nozdry). K úspěšnému vývoji je zapotřebí imunologicky kompatibilní

hostitel a v mnoha případech velké množství glochidií nedokončí svůj vývoj. Předpokládá se, že škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) dokáže využívat všechny druhy ryb vyskytující se na území České Republiky (Douda et al. 2016). Údaje z roku 2014 informují o výskytu škeblice asijské v Odře u Studénky a v kanále u rybníka Prošňák u Jistebníku. Lze předpokládat, že je škeblice v této oblasti rozšířena (Beran, 2014). Glochidium parazituje uvnitř cysty 4 - 20 dní (délka závisí na teplotě vody). V teplejší vodě (20°C) se vývoj pohybuje kolem 4 dnů, čím nižší teplota vody, tím delší doba vývoje. Dokončení vývoje začíná prasknutím cysty, kdy juvenilní jedinec opustí rybího hostitele, spadne na dno a začne přijímat potravu filtrací (Douda et al. 2016).

4.2 Průběh experimentu

Příprava na experiment trvala přibližně týden. Bylo potřeba připravit akvárium o celkovém objemu 1 350 l pro gravidní samice, zařídit cirkulaci a filtraci vody. Zajistit všechn potřebný materiál a nastavit CO₂ inkubátor na požadovanou teplotu.

4.2.1 Odběr glochidií

Odchyt dospělých jedinců proběhl 15. května roku 2018 v řece na Moravě se souřadnicemi 48.6866664 N, 16.9883225 E. K pokusu bylo vybráno šest samic mlže, ale zde jsou podrobně vyhodnoceny výsledky pouze ze tří jedinců. Zkoumaní jedinci byli vloženi do nádrže s chlazením a filtrací. Byla jim poskytnuta neustálá cirkulace vody. V den zahájení experimentu 17. 5. 2018 se vybraly tři vhodné gravidní samice. Otevřením lastury pomocí kleští, dále naříznutím marsupii a výplachem sterilizovanou vodou se odebrala glochidia. Samice byly při odběru glochidií označeny písmeny A, B a C na vrchní část lastury. Stejně poté byly označeny Petriho misky (A1 - A12, B1 - B12, C1 - C12). V prvním běhu experimentu se zkoumalo 36 misek s médiem, které bylo aplikováno do Petriho misek pomocí injekční stříkačky. V druhém běhu bylo zkoumáno také 36 misek označených D1 - D6, E1 - E6, F1 - F6, M1 - M6, P1 - P6, R1 - R6, ale medium bylo aplikováno do Petriho misek přes filtr (0,45 μ m). Při kontrole druhý den bylo medium zakalené, tudíž byla snížena viditelnost glochidií. Kontroly proběhly v prvním běhu u všech jedinců, v druhém běhu pouze u

některých. V druhém běhu byla z každé skupiny vybrána jedna miska, u které poté proběhla kontrola počtu jedinců (D2, E6, F6, M5, P6, R6). Poslední den kultivace byly vyhodnoceny všechny misky s juvenilními jedinci.

V podobném experimentu na druhu *Hyriopsis myersiana*, který byl uskutečněn Kovitvadhi et al. (2001a) byly gravidní samice tohoto druhu před začátkem experimentu očištěny a zbaveny písku a řas, které se uchytily na jejich lasturách. Jemným narušením lastury kleštěmi, bylo zjištěno, že samice mají hnědou barvu marsupíí, což značí o jejich zralosti a počínajícím embryonálním vývoji glochidií. Barva je informačním faktorem zralosti glochidií. Žlutá barva značí nezralost jedinců, hnědá barva naopak zralost a blížící se vypuštění glochidií (Kovitvadhi et al. 2001a). V experimentu na druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) proběhla tato část naprosto stejně. Došlo také ke kontrole životaschopnosti glochidií pomocí odebraného vzorku z každé samice a jejich následným přesunem do Petriho misky. Pod světelným mikroskopem byla zjištěna aktivita odebraných glochidií. Pokud glochidia otvírala a zavírala periodicky své lasturky, byla označena za vhodná k následné kultivaci (Kovitvadhi et al. 2001a). V experimentu na druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*), byla životaschopnost glochidií zkoumána ještě pomocí přidání roztoku NaCl do Petriho misky s přítomnými glochidii. Při kontaktu s touto chemickou látkou došlo u jedinců k uzavření lastury (požadovaná aktivita). Pokud na chemickou látku NaCl jedinci nereagovali a jejich lastura zůstala otevřená, byli považováni za mrtvé (Barnhart & Roberts, 1999). Po ověření, že jsou jedinci aktivní a vhodní pro kultivaci, došlo k odběru glochidií pipetou z nádrží pojmenovaných po samicích (A, B, C). V lázni bylo zvoleno místo s nejhojnějším zastoupením glochidií a z něho bylo odebráno několik jedinců (cca 2ml), kteří byli poté aplikováni do připraveného kultivačního média (3 kapky s glochidii).

4.2.2 Materiál

1) Sérum

Koňské sérum (Sigma Aldrich)

2) Medium

M199 (Sigma Aldrich)

3) Antibiotika

A = 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin a 200 µg/ml neomycin
Antibiotikum typu A, které bylo připraveno za pomoci PSN mixture, Sigma Aldrich

4) Antimykotika

Amphotericin B 5 µg/ml (Sigma Aldrich)

5) Rybí olej (tresčí olej, Sigma Aldrich)

- 6) Petriho misky (cca 60ks), CO₂ inkubátor (NB-203, N-Biotek, Korea), světelný mikroskop, spotřební materiál (injekční stříkačky, pipety)

4.2.3 Časový plán

Gravidní samice druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) byly přivezeny 15.5.2018, tři dny před zahájením experimentu.

Den před začátkem experimentu byl nastaven CO₂ inkubátor na 23°C při obsahu CO₂ 5%. Také byla připravena sterilizovaná voda z autoklávu o 121°C k proplachu marsupíí u gravidních samic.

První běh experimentu:

- 1.den - odběr glochidií ze tří vybraných samic
 - příprava kultivačního media
 - kultivace glochidií in vitro a jejich umístění do CO₂ inkubátoru
- 2.den – vyhodnocení počtu glochidií s uzavřenou a otevřenou lasturou
- 6. den – kontrola pH, transformace a zakalení media
- 8. den – kontrola transformace v juvenily a případného zakalení media
- 9. den – kontrola pH a transformace v juvenily

Druhý běh experimentu:

- 1. den – glochidia byla odebrána z jedinců D(M), E(P) a F(R)
 - příprava kultivačního media a jeho aplikace přes filtr do Petriho misek
 - kultivace glochidií in vitro a jejich umístění do CO₂ inkubátoru

- 2. den - vyhodnocení počtu jedinců z 6 vybraných misek (D2, E6, F6, M5, P5, R6)
 - z důvodu zakalení media nebylo možné vyhodnocení u všech misek
- 3. den – kontrola pH
- 4. den – další dny byl postup stejný, jako u prvního běhu experimentu

4.2.4 Kultivace

Kultivace proběhla v CO₂ inkubátoru, kde obsah CO₂ byl 5% (v atmosférickém složení vzduchu je obsah CO₂ 0,04 %). Aby bylo dosaženo požadované vlhkosti prostředí, byla na dno inkubátoru instalována nádoba s vodou k evaporaci. V experimentu bylo použito medium M199 (Sigma Aldrich), s koncentrací antibiotik (A = 100 µg / ml penicilinu, 100 µg / ml streptomycinu a 200 µg / ml neomycinu) připraveny za použití směsi PSN, Sigma Aldrich). Médium obsahovalo koňské sérum (Sigma Aldrich). Vycházelo se z poměru 4: 2: 1 (Roberts a Barnhart 1999) pro médium, sérum a antibiotika. Médium bylo doplněno 5 µg/ml antimykotik (amfotericin B, Sigma Aldrich) a 50 µl na misku oleje z tresčích jater (Sigma Aldrich). Do 36 Petriho misek (15 x 60 mm) bylo přidáno po 5 ml kultivačního média. Před přidáním glochidií byly všechny misky umístěny do inkubátoru CO₂ (NB-203, N-Biotek, Korea) s UV světlem po dobu jedné hodiny. V prvním i druhém běhu experimentu byly misky udržovány v atmosféře 5 % CO₂ a 23°C po dobu 9 dní. V průběhu prvního běhu experimentu nebyla pozorována žádná plísňová nebo bakteriální infekce a nebyly provedeny změny média. Inkubace byla úspěšně ukončena 9. den, kdy byla provedena kvantifikace úspěšnosti metamorfózy.

4.3 Medium

4.3.1 Příprava media M199

Médium je složeno z komerčního média pro kultivaci buněk (např. M199 a DMEM) v kombinaci s antibiotiky a antimykotickými směsmi k prevenci infekcí. Také je obohaceno o různé druhy séra (sérum z přirozených hostitelských ryb nebo uměle upravené, sérum koňské či telecí) (Escobar-Calderon & Doua, 2018).

Médium se převážně připravuje tak, že jedno balení M199 v prášku přisypeme do 1 litru sterilního roztoku destilované vody a přidáme 2 g NaHCO₃. Poté M199 přefiltrujeme přes 0,45 a 0,20 µm filtračního papíru a udržujeme při 4°C (Kovitvadhi et al. 2001b). V našem experimentu bylo použito již hotové medium M199.

4.3.2 Složky obsažené v médiu

Dle Ellis a Ellis (1926) byl uskutečněn první experiment s úspěšnou transformací glochidií pomocí uměle vytvořeného média v in vitro podmínkách. Podrobnosti o médiu však nebyly nikdy zveřejněny, takže není jasné, jestli živiny získané z rybích žaber pomohly glochidiím k jejich úspěšné transformaci. V roce 1982, Isom a Hudson uskutečnili experiment, ve kterém došlo k úspěšné transformaci glochidií v několika upravených médiích bez přítomnosti rybích hostitelů. Rybí plasma byla použita jako zdroj bílkovin. Médium dále obsahovalo roztok solí, směs antibiotik a pufr hydrogenuhličitanu sodného. Jelikož rybí plasma nebyla snadno dostupným produktem, byly provedeny pokusy s cílem nalézt vhodnou náhradu tohoto séra. Keller a Zam ve svém experimentu zjistili, že nejvhodnější náhradou za rybí sérum je sérum koňské. Další pokusy poté modifikovaly již proběhlé experimenty a vylepšily kombinaci antibiotik, směs lipidů a celkový proces in vitro metody (Fox, 2014).

1. Lipidy (Rybí olej)

Z již proběhlých experimentů je patrné, že hladina lipidů je velmi důležitá při kultivaci glochidií. Po přidání zdroje lipidů (olej z tresčích jater nebo menhadenový olej) do média se zvýšila kvalita kultivovaných juvenilů. V experimentech se aktuálně přidává 50 µl rybího oleje na jednu Petriho misku. Také se vyrábí uměle vytvořené lipidové směsi, které obsahují olej z tresčích jater a nahrazují nerozpustné oleje z tresčích jater, které nebyly tak úspěšné při kultivacích (Lima et al. 2012). V experimentu s druhem škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) byl jako zdroj lipidů použit olej z tresčích jater (= Cod Liver Oil) (Sigma Aldrich)

2. Antibiotika / antimykotika

V uskutečněném experimentu dle Isom & Hudson byl použit mix tří antibiotik, karbencilinu, gentamicin sulfátu a rifampinu v množství 100 $\mu\text{g/l}$ spolu s amfotericinem B v množství 5 $\mu\text{g/l}$. Tento mix byl použit jako součást kultivačního média, aby zabránil mikrobiální kontaminaci. Uvedené koncentrace nejsou toxické pro glochidia a jejich účinek proti kontaminaci je spolehlivý. Bylo uskutečněno několik pokusů, kdy byly odebrány výtěrem bakterie ze žaber vybraných ryb. Tyto bakterie byly vystaveny zmíněným antibiotikům a byla zkoumána jejich účinnost. Došlo k namíchání několika vhodných antibiotických směsí, ale žádná ze směsí nebyla tak úspěšná jako mix antibiotik od Isom & Hudson. Některá antimykotika mohou mít negativní vliv na transformaci glochidií, a proto je velmi důležité dodržet vhodnou koncentraci (Lima et al. 2012). Jak již bylo zmíněno výše v kultivaci glochidií druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) byl použit mix antibiotik A= 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin a 200 $\mu\text{g/ml}$ neomycin a antimykotikum typu Amphotericin B 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich).

5 Výsledky

Metamorfóza v prvním i druhém běhu experimentu proběhla úspěšně. Už 9. den byla pozorována první aktivita u jednotlivých juvenilů.

Podle jednotlivých pozorování za pomoci světelného mikroskopu byla glochidia na začátku experimentu rozdělena na jedince se zavřenou, polootevřenou a otevřenou lasturou. Na konci experimentu už byla glochidia, která dokončila vývoj, rozdělena na juvenily aktivní, poloaktivní, zavřené/mrtvé a otevřené. Míra úspěšnosti metamorfózy byla vypočtena jako součet životaschopných juvenilů ku celkovému počtu (Escobar-Calderon & Douda, 2018).

5.1.1 Statistické vyhodnocení

Srovnáním všech tří jedinců A, B, C bylo zjištěno, že na konci prvního běhu experimentu bylo v průměru nejvíce aktivních juvenilů u jedince B. Ovlivňujícím faktorem úspěšného dokončení byla aplikace kultivačního média přes filtr (0,45 μ m), který způsobil zakalení v druhém běhu experimentu. Z tohoto důvodu jsou zde uvedeny ucelené výsledky pouze z prvního běhu. Zkoumala se aktivní glochidia odebraná ze třech jedinců (A, B, C) a byla u nich pomocí analýzy dat v Microsoft Excel provedena celková vyhodnocení (Příloha 6).

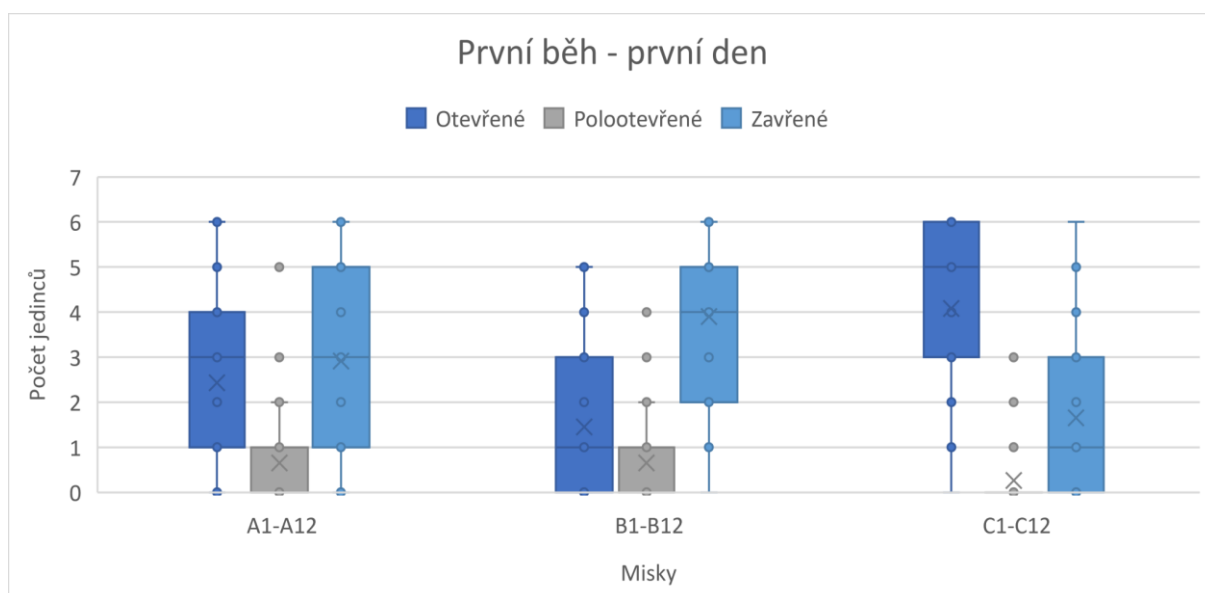
Pomocí metody ANOVA v Microsoft Excel byla vyhodnocena glochidia odebraná od jedinců označených A, B, C s hypotézou rozdílu aktivních juvenilů na konci experimentu. Z tabulky plyne, že $p > 0,05$ což znamená, že na hladině významnosti 0,05 nelze zamítnout nulovou hypotézu, že mezi počtem aktivních juvenilů od jednotlivých samic není rozdíl. Hodnota F je velmi malá, z toho plyne, že rozdíly mezi počtem aktivních juvenilů od jednotlivých vyhodnocených jedinců jsou zanedbatelné.

Zdroj	Stupeň volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	Hodnota F rozdělení	Pravděpodobnost nulové hypotézy
Faktor	2	5.2	2.6	0.9	0.408421921
Reziduum	177	511.75	2.89		
Celkem	179	516.95			

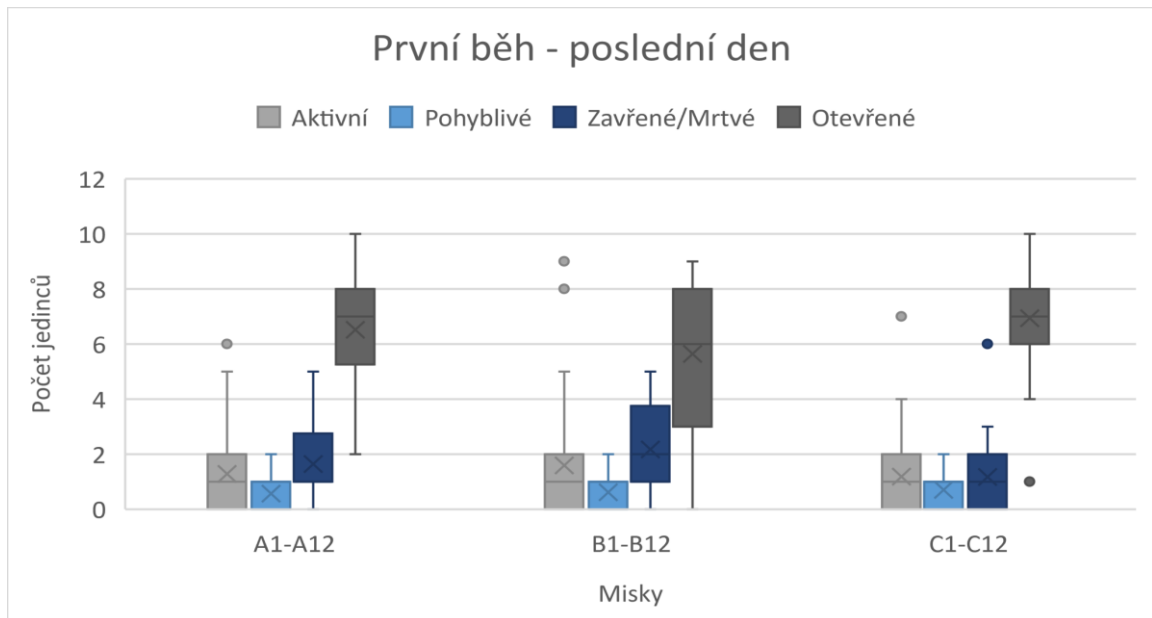
Tabulka č. 1: Statistické vyhodnocení aktivních juvenilů v prvním běhu experimentu

5.1.2 Výsledné hodnoty

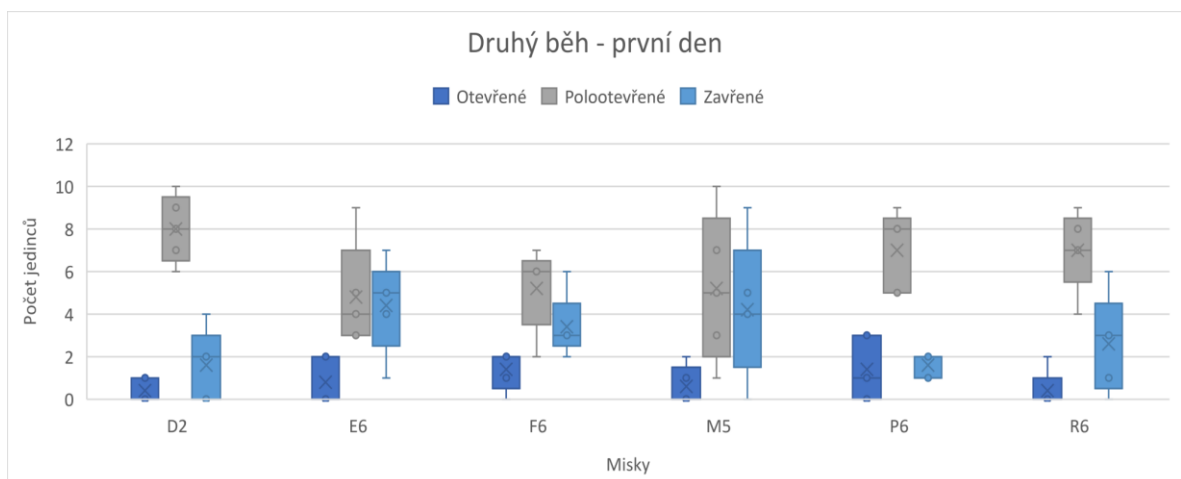
Graf č. 1 - První běh byl uskutečněn dne 18.5.2018. V grafu je patrný podíl otevřených, polootevřených a zavřených glochidií. Z grafu vyplývá, že u jedinců A a B je průměr zavřených glochidií vyšší než u jedince C. Jedinec C má v průměru nejvyšší obsah otevřených glochidií a průměr polootevřených glochidií je nejvyšší u jedince B. U jedinců A a C se liší minimálně.



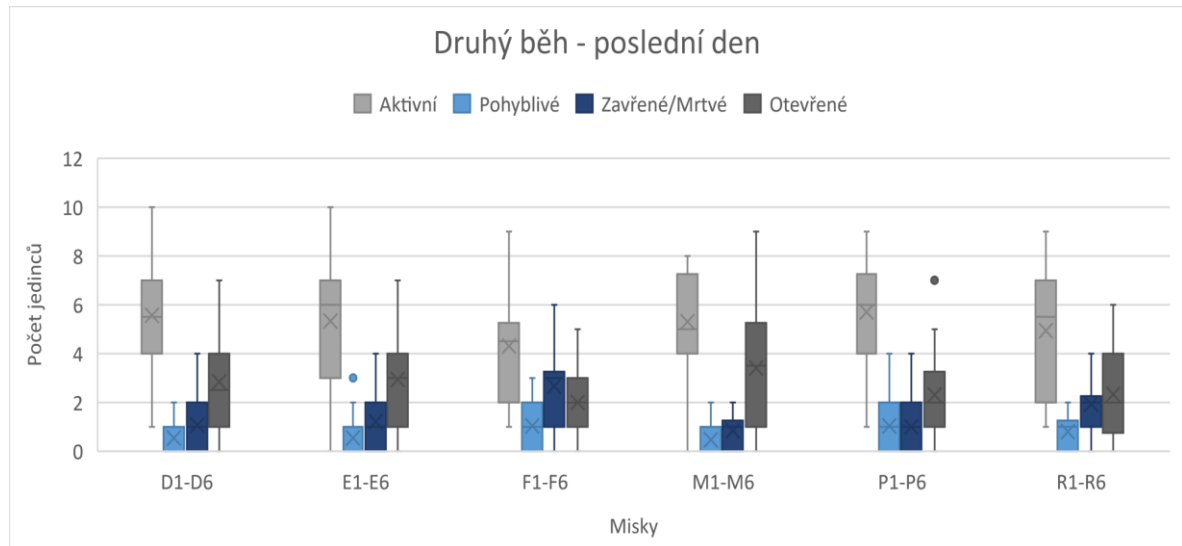
Graf č. 2 – První běh končil 26.5.2018. V grafu jsou již patrní živý juvenilové. Zastoupeni jsou zde aktivní jedinci, mrtvý jedinci a jedinci, kteří měli otevřenou lasturu. Z grafu vyplývá, že nejvíce aktivních juvenilů bylo u jedince B a nejvíce pohyblivých juvenilů bylo u jedince C.



Graf č. 3 – Druhý běh začínal 6.6. 2018. V tomto běhu bylo médium aplikováno přes filtr, tudíž byla změněna technika aplikace. Zároveň došlo druhý den k lehkému zakalení média. Z tohoto důvodu máme jen částečné počty začátku tohoto běhu.



Graf č. 4 – Druhý běh končil 13.6.2018. Z grafu je patrné, že zde došlo k úspěšnému vývinu glochidií v juvenilní jedince. U jedinců D, E a P, R bylo výrazně více aktivních jedinců než u jedinců F, M.



6 Diskuze

Výsledky, které byly získány, jsou velmi důležité pro nadcházející chov *in vitro* metodou. Použití CO₂ inkubátoru a další ukazatele, které byly v experimentu využity, mohou zdokonalit chov sladkovodních mlžů bez potřeby vhodného hostitelského druhu. Tudíž bude možnost tento fakt využít v praxi (např. v průmyslu, při ochraně živočichů, ale také pro další pokusy v laboratorních podmínkách). Z výsledků, které jsme získaly, také plyne, že i když se na začátku experimentu něco jeví za nefunkční (např. aplikování média přes filtr a následné zakalení) nemusí to tak být. Z grafů, kde jsou vyhodnoceny počty aktivních juvenilů je patrné, že glochidia využitá v druhém běhu experimentu i přes zakalené médium dokončila svůj vývoj a transformovala se v aktivní juvenilny.

6.1 Srovnání experimentů *in vitro*

V různých studiích byly pozorovány odlišné přístupy k metodě *in vitro* chovu. V některých případech se jedinci spočítali hned druhý den po inkubaci (Roberts a Barnhart, 1999; Lima et al. 2006; Taskinen et al. 2011) a v některých případech byly juvenilové přesunuti během 24 – 48 hodin do vody a následně pak spočítáni (Kern, 2017). Za velmi důležitý faktor je považováno načasování a ředění média na konci inkubace. V některých případech se na konci inkubace médium vůbec neředilo (Lima et al. 2006; Uthaiwan a kol., 2001), zatímco v jiných případech se juvenilové hned po dokončení vývoje přesunuli do vody a následně byli spočítáni (Roberts a Barnhart, 1999; Fox, 2014; Kern, 2017). Při některých experimentech se provádí postupné ředění (Lima a Avelar, 2010; Taskinen et al. 2011), což znamená, že se před koncem experimentu provede částečná výměna nebo zředění média destilovanou nebo sterilizovanou vodou a poté se poslední den experimentu médium zcela nahradí vodou. Gąsienica-Staszeczek et al. (2018) studovali jaký má účinek doba ukončení pokusu a ředění *in vitro* metody na daný druh. V tomto případě se jednalo o experiment na druhu *Unio crassus* a zjistilo se, že čas ukončení experimentu je velmi zásadním faktorem pro úspěšnou transformaci v *in vitro* podmínkách. Časné ukončení pokusu může zapříčinit vyšší úmrtnost glochidií (Gąsienica-Staszeczek et al. 2018).

Výsledky pokusu *in vitro* na druhu *Anodonta cygnea* v médiu M199, který realizoval Lima et al. (2006), měly podíl živých jedinců 34,38 % a jedinců s úspěšně dokončeným vývojem 60,87 %. Počet jedinců, kteří dokončili vývoj v rybí plasmě, byl nižší ve srovnání s podobně

uskutečněnými experimenty (v pokusech podle Isom & Hudson, který uskutečnili Keller & Zam byla úspěšnost jedinců s dokončeným vývojem 81,88 %). Z aktuálních výsledků chovu *in vitro* je patrné, že doba transformace glochidií kultivovaných v rybí plasmě má nižší variabilitu, jelikož médium M199 je dostupnější než ostatní aplikovaná média. I díky těmto informacím se v Evropě poprvé povedlo získat při experimentu znatelné výsledky (Lima et al. 2006).

Počet úspěšně transformovaných jedinců v médiu s rybí plasmou podle popsaného pokusu dle Isom & Hudson, který aplikovali na svém experimentu Keller & Zam, byl vysoký a vedl k inaktivním i letargickým jedincům. Naopak umělé médium (M199; DMEM) s koňským sérem, které nahradili Keller & Zam za rybí, mělo za následek výrazně nižší podíl úspěšně transformovaných jedinců. Avšak po zdravotní stránce na tom byli lépe. Na druhou stranu, Kovitvadi et al. (2001a, 2001b) uskutečnili experiment, kde zkombinovali umělé médium (M199) s rybí plasmou a výsledky byly úspěšné jak po zdravotní stránce, tak i z hlediska transformace jedinců. Vysoké procento zkoumaných jedinců dokončilo svoji transformaci v juvenilního jedince a úspěšně žilo další 3 měsíce. Tento vzorec dle Kovitvadi et al. byl použit v experimentu dle Lima et al. (2006), výsledkem byl zisk zdravých a aktivních juvenilů. Mělo by se zapracovat na vylepšení kultivačních podmínek, jelikož juvenilní jedinci po 15 dnech uhynuli.

6.2 Výhody *in vitro* a možné využití v průmyslu

Zachování populace sladkovodních mlžů primárně závisí na prostředí, ve kterém žijí. Místo se musí nacházet v klidné, nerušené lokalitě se zdravou populací. Je tedy potřeba zajistit obnovu stanovišť, kde mlži žijí nebo zajistit jejich úspěšný chov v zajetí (Geist, 2010). Z hlediska ochrany těchto živočichů je důležité rozšiřovat a zdokonalovat metodu *in vitro* chovu. Tím by se mohlo zajistit rozmnožení ohrožených druhů bez přítomnosti jejich přirozeného hostitele. K tomuto kroku je nutné, aby řeky a jezera byly monitorovány, čímž by poskytovaly informace o celkovém počtu jedinců, počtu zdravých jedinců a informace o jejich genetické stránce. V dnešní době je ohrožení života sladkovodních mlžů a jejich blízké vyhynutí aktuální téma, a proto je umělý odchov v laboratorních podmínkách velmi důležitou součástí života těchto živočichů (Lima et al. 2012).

Bylo provedeno několik pokusů umělé infestace ryb u různých druhů sladkovodních mlžů a všechny proběhly úspěšně. Nicméně in vitro metoda chovu mlžů z řádu Unionid představuje alternativní proces v programech ochrany sladkovodních mlžů, nejen pro průmysl na výrobu perel, ale také pro laboratorní práci a výzkum (Lima et al. 2012). Kromě toho se eliminuje potřeba hostitelské ryby pro úspěšnou transformaci v juvenilního jedince, což je velmi užitečné v případě, kdy zkoumaný jedinec má specifického hostitele k rozmnožování, jenž se obtížně shání, je náchylný na manipulaci a špatně se udržuje jeho životaschopnost v zajetí. Tato metoda je zejména důležitá pro druhy mlžů, které mají za hostitelské druhy vzácné nebo chráněné ryby (Lima et al. 2012).

Metoda in vitro má také schopnost snižovat citlivost různých hostitelských druhů ryb na parazitické glochidium. Ačkoliv našim hlavním cílem je ochrana a správa sladkovodních mlžů v jejich přirozeném prostředí, tento poznatek je velmi důležitý a může být velkým přínosem pro jiné oblasti (ne pouze pro ochranu populace sladkovodních mlžů) (Lima et al. 2012).

V Číně se nachází velký průmysl pro zpracování perel, které jsou produkovány sladkovodními mlži. Pokud by se díky umělým odchovům dosáhlo nižších nákladů na produkci jedince, vzrostla by produkce perel pro nábytkářský průmysl a jiné předměty. Kromě toho, nový výzkum produkce syntetických materiálů využívá organické tekutiny získané ze sladkovodních mlžů s cílem podpořit jejich specifický povrch nebo dokonce krystalickou ultrastrukturu na syntetických membránách (Lima et al. 2012).

Základem pro průmysl se zaměřením na zpracování perel byli v první třetině 20. století v Severní Americe sladkovodní mlži. Dnes jsou ve velkém chováni a chytáni pro tento účel v Japonsku. S ohledem na určité případy, měl odchyt mnoha jedinců pro perlový průmysl negativní dopad na populaci druhu *Margaritifera margaritifera* v Evropě (Young & Williams, 1984). Tyto lidské aktivity každoročně ničí velké množství dospělých jedinců a na některých místech vážně ovlivňují celé populace. Pokud má druh omezenou lokalitu výskytu, může u něj dojít až k vyhynutí (Lima et al. 2012).

Rozšíření základních znalostí o procesech a mechanismech, které jsou součástí biomineralizace, může přispět k rozvoji nových multifunkčních materiálů a procesů pro celou řadu průmyslových aplikací, např. bioimplantátů, inteligentních mikrostruktur (MEMS) nebo nanokatalyzátorů (Grabarkiewicz & Davis, 2008). Za další praktické využití pro organickou tekutinu získanou ze sladkovodních mlžů je považován antibakteriální prostředek (Lima et al. 2012).

Mladí jedinci (juvenilové) jsou v důsledku své extrémní citlivosti stále častěji využíváni v ekotoxikologických studiích k hodnocení parametrů kvality vody a většina jich slouží k monitoringu kontroly kvality vody (Grabarkiewicz & Davis, 2008). Juvenilní jedinci, kteří byli uměle odchováni v laboratorních podmínkách, jsou využíváni k testování znečištění vody, na přítomnost toxických látek a na změny při přesunu mimo přirozenou lokalitu výskytu (Augspurger et al. 2007).

Mnoho druhů vyhynulo díky znečištění vod kovy, pesticidy a odpadními látkami. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby se u mladých jedinců, kteří se vyskytují v jezerech a vodních tocích, prováděly testy na kontaminaci těmito toxiny. S větším množstvím juvenilních jedinců je možné provádět více testů a experimentů s cílem toxikologických a základních procesů, které by pomohly lépe porozumět faktorům ovlivňujících volně žijící populace s následkem jejich vymírání (Lima et al. 2012).

6.3 In vitro z hlediska ochrany živočichů

Faktory, které ovlivňují druh natolik, že vedou k jeho vyhynutí, jsou různé a obvykle spolu souvisí. Sladkovodní mlži jsou dlouhověcí živočichové, proto důvod jejich vymírání nemusí být hned zřetelný.

6.3.1 Potřeba hostitelské ryby

Nejsložitější částí života sladkovodních mlžů je parazitické stádium na hostitelské rybě. Pokud vhodná hostitelská ryba pro určitý druh mlže chybí, stane se funkčně vyhynulým a zcela vyhynulým, až když zemře poslední jedinec daného druhu mlže (Bogan, 1993). Příkladem jsou mlži *Obovaria retusa* Lamarck, 1819; *Plethobasus cooperianus* Lea, 1834; *Pleurobema taitianum* Lea, 1834. Žádný z těchto faktorů by sám o sobě nebyl tak nebezpečný, ale vzhledem k tomu, že jsou sladkovodní mlži z řádu Unionida dlouhověcí (Bauer (1992) uvedl délku života mlžů až 130 let), jednotlivé dopady na ně jsou malé. Vzhledem k časovým možnostem se nakumulují a jsou pro druh nebezpečné až devastující (Bogan, 1993).

Z důvodu potřeby hostitelské ryby pro reprodukční cyklus se stav sladkovodních mlžů žijících v řekách, které se přehradily, nebo se významně změnila jejich struktura, výrazně snížil. Stav

se snížil, protože zásah do přirozeného prostředí může být v mnoha případech destruktivní pro hostitelské ryby, které potřebují tyto mlži ke svému vývoji. Ve 20. století byl vytvořen seznam vhodných hostitelských ryb pro určité druhy glochidií sladkovodních mlžů. Získané údaje pokrývají asi jednu čtvrtinu populace sladkovodních mlžů, kteří žijí v Severní Americe. Údaje o hostitelských druzích pro určité druhy mlžů ve zbytku světa jsou podstatně nižší. Informace o tom, jaký druh hostitelské ryby je potřeba pro určitý druh sladkovodního mlže, je velmi důležitá z hlediska ochrany a zachování ohrožených druhů. Když budou hostitelské ryby, které jsou nezbytné pro rozmnožení daných druhů chybět, bude veškeré úsilí o zachování sladkovodních mlžů marné (Bogan, 1993). Z tohoto důvodu je velmi důležité rozšiřovat metodu in vitro chovu.

Např. pro druh *Margaritifera margaritifera* je v současnosti jedinou hostitelskou rybou pstruh potoční (*Salmo trutta fario*). Jejich vztah prošel dlouhou koevolucí a vznikla mezi nimi silná vazba, která roste s geografickou blízkostí. Tento vztah je v mnoha případech narušen antropogenními zásahy. Jedná se o přidávání nepůvodních linií pstruhů do povodí nebo přidávání nepůvodních druhů ryb, např. pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) (Geist & Auerswald 2007). V podmínkách České republiky bohužel v minulosti často docházelo k míchání a přesazování populací pstruha mezi zdrojovými povodími. Hostitelská kompatibilita tak není v našich podmínkách vždy geograficky provázána. V rámci jednotlivých populací existuje také významná variabilita v kvalitě hostitelů. Pro úspěšný průběh parazitické fáze je tedy vždy vhodné ověřit kvalitu používaných hostitelů (Douda, 2015).

6.3.2 Invazní druh

Největší koncentrace výskytu nepůvodních druhů je v případě České republiky v nivách větších řek. Velké řeky a jejich nivy tak často fungují při šíření nepůvodních druhů jako koridory. Velké řeky a navazující biotopy jsou zároveň vhodným stanovištěm pro řadu těchto druhů společně s různými antropogenně vzniklými a ovlivněnými stojatými vodami jako jsou přehradní nádrže, pískovny či lomy. Na řadě stanovišť patří nepůvodní druhy mezi dominantní zástupce a výjimkou nejsou ani lokality, kde tvoří převážnou část druhového spektra místních malakocenóz (Beran, 2017). Výskyt několika invazních druhů sladkovodních mlžů v jejich nepůvodních lokalitách (např. *Dreissena polymorpha* nebo *Limnoperna fortunei*) měl za následek změny v ekosystémech po celém světě. Rozsáhlé

následky této invaze jsou přisuzovány výskytu glochidií invazních druhů, které mají vysoké disperzní schopnosti (Douda et al. 2012).

Škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) je invazivní sladkovodní mlž pocházející z východní Asie (Graf, 2007). Z původní oblasti výskytu se tento druh rozšířil do jihovýchodní Asie, střední a severní Ameriky, Evropy, Španělska, Francie, Itálie, Německa, Rakouska, Slovenska, Maďarska, České republiky, Polska, Chorvatska, Srbska, Rumunska, Moldavska, Ukrajiny a Švédska (Cianfanelli et al. 2007).

Reprodukční cyklus škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) zahrnuje parazitickou fázi života, kdy se glochidium uchytlí na rybího hostitele a zapouzdří se na něm. Specifita hostitelské ryby u škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) je velice nízká, tudíž je možné, aby glochidia tohoto druhu dokončila transformaci u různých druhů hostitelských ryb, včetně druhu *R. amarus*, který byl označen za druh odolávající parazitaci glochidií od původních druhů sladkovodních mlžů (Douda et al. 2012). Mezdruhové rozdíly ohledně úspěchu transformace byly u škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) velmi nízké, což znamená, že i u nejméně vhodných jedinců byl úspěch transformace více než 17%, a mohli být považováni za funkční hostitele. Každopádně možná úmrtnost glochidií se většinou pohybuje kolem 50% a to i v situaci, kdy parazitují na vhodném jedinci a dochází k velmi kompatibilnímu vztahu mezi mlžem a rybou (Douda et al. 2012). V pokusu, který se uskutečnil v Hong kongu, byla zkoumána parazitace u 4 hostitelských ryb (*Gambusia affinis* – čeleď Poeciliidae; *Puntius semifasciolatus*, *Metzia takakii* a *Rhodeus sinensis* – čeleď Cyprinidae), kdy nejvíce jedinců s dokončeným vývojem bylo pozorováno na nepůvodním druhu *G. affinis*. V Japonsku, Fukuhara et al. uskutečnili experiment, kdy použili pět hostitelských ryb k parazitaci glochidii škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) (*Rhodeus ocellatus*, *Pseudorasbora parva* – čeleď Cyprinidae; *Oryzias latipes* – čeleď Adrianichthyidae; *Rhinogobius brunneus* – čeleď Gobiidae a *Lepomis macrochirus* – čeleď Centrarchidae), nejvíce jedinců s dokončeným vývojem bylo nalezeno u druhu *R. brunneus* (Douda et al. 2012). Další pokus uskutečnil Kiss, který choval glochidia získaná ze škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) na vhodných hostitelských rybách. Většina jich byla získána ve východní Asii. Bohužel, v tomto experimentu nebyla měřena míra úspěšnosti hostitele ku vývoji jedinců. Souhrnně však tyto údaje dokazují, že škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) je schopna dokončit svůj vývoj z glochidia v juvenila na širokém spektru hostitelských druhů ryb. Škeblici asijskou tedy můžeme zařadit mezi parazity. Přirozená strategie parazita zahrnuje schopnost při nepřítomnosti vhodného hostitele, udělat si hostitele z dostupného jedince v jeho blízkosti,

tudíž se může rychle stát nezávislým na svém původním hostiteli. Např. rybí parazit, který pochází z Asie, *Bothriocephalus acheilognathi*, byl rozšířen hlavně vývozem kaprů. Nyní využívá velké množství původních ryb ke své parazitaci, což způsobuje významné hospodářské ztráty v oblasti rybolovu na celém světě (Brouder & Hoffnagle, 1997).

Předpokládá se, že škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) se bude rozšiřovat dále. Dovoz ryb z různých zemí používaných v akvakultuře pravděpodobně přispěje k dalšímu šíření a rozmnožení tohoto druhu. Prognóza je taková, že se škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) může setkat s vhodnými hostitelskými druhy ryb až na 75% lokalit v České republice (Lucas & Baras, 2001).

Vzhledem k tomu, že pro škeblici asijskou není náročné sehnat vhodného hostitele a není ani citlivá na okolní teplotu, lze předpokládat rychlé rozšíření do evropských vod. Ze získaných informací o tomto druhu nelze určit potravní specializaci. Je tudíž možné, že její rozšíření může být omezeno v oblastech s nižší dostupností živin. Škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) se vyskytovala hojněji v oblastech bohatých na živiny pro tento druh, jako jsou nivy nížin a rybníky (Paunovic et al. 2006). Tento invazní druh má negativní vliv na původní sladkovodní druhy mlžů. Prvním problémem je potravinová rivalita mezi invazním druhem škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) a původními druhy sladkovodních mlžů. Pokud populace invazního nepůvodního druhu bude větší, než populace původního, může dojít k rapidnímu snížení zdrojů potravy v lokalitách, které jsou přirozené pro původní sladkovodní mlže (Douda et al. 2012).

Předpokládá se, že se jedná o primární mechanismus konkurence mezi mlži (Strayer, 1999). Tato rivalita o potravu se považuje za jeden z hlavních faktorů ohrožujících přirozeně se vyskytující populace v severoamerických oblastech (Haag et al. 1993). Druhým problémem je soupeření o hostitele. Může dojít ke konfliktu mezi glochidii od nepůvodní škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) a mezi glochidii z původních druhů mlžů, jelikož oba druhy se zapouzdřují v létě. Třetím problémem je považována infekce, kterou glochidia vyvolají adaptivní imunitní reakci na rybím hostiteli a ten je poté imunní proti opakovaným infekcím (Douda et al. 2012). Předpokládá se tedy, že zmíněná rezistence významně sníží podíl hostitelů dostupných pro původní druhy sladkovodních mlžů. Výskyt tohoto invazního druhu v České republice se v posledních letech dramaticky zvýšil. První zprávy o výskytu škeblice asijské (*Sinanodonta woodiana*) pochází z roku 1996 (Douda et al. 2012). Informace k roku 2008 však informují o tom, že se škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) rapidně rozšířila a stala se v některých lokalitách i dominantním druhem (Beran, 2008). Podobný děj mělo její

rozšíření i v jiných evropských zemích (Cianfanelli et al. 2007; Paunovic et al. 2006; Popa et al. 2007; Pou-Rovira et al. 2009).

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat složitost reprodukčního cyklu mlžů čeledi Unionidae a demonstrovat to na pokusu in vitro za použití CO₂ inkubátoru v laboratorních podmínkách. Experiment probíhal ve dvou fázích, z nichž první běh byl úspěšnější z hlediska funkčnosti média, kdežto v druhém běhu došlo k zakalení média a zhoršení podmínek pro kontrolu. V experimentu bylo použito komerční medium typu M199. Došlo ke kontrolám pH, byl použit CO₂ inkubátor při teplotě 23°C a při koncentraci CO₂ 5% pro kultivaci misek s jedinci. Na základě toho byla zjištěna úspěšná transformace glochidií v juvenilny druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*). Médium se v průběhu kultivace neměnilo.

8 Literatura

- Augspurger, T., F. J. Dwyer, C. G. Ingersoll & C. M. Kane, 2007. Advances and opportunities in assessing contaminant sensitivity of freshwater mussel (Unionidae) early life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(10): 2025–2028.
- Barnhart, M. Ch., Haag, W. R., Roston, W. N. 2008. Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 27. 370-394.
- Bauer, G. 1992. Variation in the life span and size of the freshwater pearl mussel. *J. Anim. Ecol.* 61: 425–436.
- Beran, L. Škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) – další nepůvodní druh byl nalezen v Poodří. *Poodří. Společnost přátel Poodří, Oblá 11, 709 00 Ostrava – Mariánské Hory*, 2014, 17(2).
- Beran, L. Nepůvodní druhy vodních měkkýšů v ČR. *Fórum ochrany přírody*. 2017(3), 4.
- Blažek, R., Gelnar M. Temporal and spatial distribution of glochidial larval stages of European unionid mussels (Mollusca: Unionidae) on host fishes. Brno, Czech Republic, 2006. Masaryk University.
- Bogan, A. E. Freshwater Bivalve Extinctions (Mollusca: Unionoida): A Search for Causes [online]. *Invertebrate Zoology, Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh, Pennsylvania 15213-4080*, 1993 [cit. 2019-04-06].
- Brouder M.J., Hoffnagle T.L. (1997) Distribution and prevalence of the Asian fish tapeworm, *Bothriocephalus acheilognathi*, in the Colorado River and tributaries, Grand Canyon, Arizona, including two new host records. *J Helminth Soc Wash* 64:219–226
- Cianfanelli S., Lori E., Bodon M. (2007) Non-indigenous freshwater molluscs and their distribution in Italy. In: Gherardi F (ed) *Biological invaders in inland waters: profiles, distribution and threats*. Springer, Dordrecht, pp 103–121
- Douša K., 2015: Analýza potravních a hostitelsko-parazitických aspektů raných vývojových stadií perlorodky říční, které určují podmínky přežívání populace ve Vltavském luhu. – In: Hladík M. a kol. (eds), *Závěrečná zpráva projektu Soužití člověka a perlorodky říční ve Vltavském luhu, OPŽP – MŽP ČR*, Praha

-
- Douda K., Vrtílek M., Slavík O., Reichard M. 2012: The role of host specificity in explaining the invasion success of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* in Europe. *Biological Invasions* 14:127–137.
 - Douda K., Velíšek J., Kolářová J., Rylková K., Slavík O., Horký P., Langrová I. Direct impact of invasive bivalve (*Sinanodonta woodiana*) parasitism on freshwater fish physiology: evidence and implications. *Biological Invasions* [online]. 2017, 19(3), 989-999 [cit. 2018-11-14]. DOI: 10.1007/s10530-016-1319-7. ISSN 1387-3547.
 - Douda K., Kalous L., Horký P., Slavík O., Velíšek J., Kolářová J. Metodika eliminace a prevence šíření invazního druhu škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana*) ve vodních ekosystémech a akvakulturních zařízeních ČR. Katedra zoologie a rybářství, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchbát, 2016. Česká zemědělská univerzita v Praze.
 - Ellis, M. M., Ellis, M. D. 1926. Growth and transformation of parasitic glochidia in physiological nutrient solutions. *Science*. 54. 579-580.
 - Escobar-Calderon F., Douda K. Variable performance of metamorphosis success indicators in an in vitro culture of freshwater mussel glochidia. Department of Zoology and Fisheries, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-165 21, Prague, Czech Republic, 2018. Czech University of Life Sciences. (nepub)
 - Fox, T.R., 2014. Studies on the in vitro Propagation of freshwater mussels with implications for improving juvenile health. North Carolina State University. <https://repository.lib.ncsu.edu/handle/1840.16/9625>.
 - Gašienica-Staszczek, M., Zajac, K., Zajac, T., Olejniczak, P., 2018. In vitro culture of glochidia of the threatened freshwater mussel *Unio crassus* Philipsson 1788—the dilution problem. *Invertebr. Reprod. Dev.* 62, 1–9. <https://doi.org/10.1080/07924259.2017.1362482>.
 - Geist J., Auerswald K. 2007. Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshwater Biology*
 - Geist, J., 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia* 644: 69–88.

-
- Grabarkiewicz, J. D., Davis W. S., 2008. An introduction to freshwater mussels as biological indicators. EPA-260-R- 08-015. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Environmental Information, Washington, DC.
 - Graf D.L. (2007) Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) diversity and the comparative method as a species concept. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 156: 71–88, [https://doi.org/10.1635/0097-3157\(2007\)156\[71:PFMMBU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1635/0097-3157(2007)156[71:PFMMBU]2.0.CO;2)
 - Haag W.R., Berg D.J., Garton D.W., Farris J.L. (1993) Reduced survival and fitness in native bivalves in response to fouling by the introduced zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in western Lake Erie. *Can J Fish Aquat Sci* 50:13–19
 - Kern, M.A., 2017. Simplifying Methods for in Vitro Metamorphosis of Glochidia. Missouri State University. 3132. <https://bearworks.missouristate.edu/theses/3132>.
 - Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., 2012. In Vitro Culture of Freshwater Pearl Mussel from Glochidia to Adult, in: Muchlisin, Z. (Ed.), *Aquaculture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/29262>.
 - Kovitvadhi, U., Napavarn N., Machado J., 2001a. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. *Aquaculture*. 195. 61-69.
 - Kovitvadhi U., Chatchavalvanich K., Napavarn N., Machado J., (2001b). Scanning electron microscopy of glochidia and juveniles of the freshwater mussel, *Hyriopsis myersiana*. *Invertebrate Reproduction & Development – invertebr reprod dev.* 40. 143-151. [10.1080/07924259.2001.9652714](https://doi.org/10.1080/07924259.2001.9652714).
 - Lima, R. C., Avelar, W. E. P., 2010. A new additive to the artificial culture medium for freshwater bivalve culture in vitro. *Invertebr. Reprod. Dev.* 54, 89–94. <https://doi.org/10.1080/07924259.2010.9652320>
 - Lima, P., Kovitvadhi U., Kovitvadhi S., Machado J., 2006. *In vitro* culture of glochidia from the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Invertebr. Biol.* 125, 34–44. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2006.00037.x>.
 - Lima, P., Lima M.L., Kovitvadhi U., Kovitvadhi S., Owen C., Machado J., 2012. A review on the “in vitro” culture of freshwater mussels (Unionoida). *Hydrobiologia* 691, 21–33. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1078-0>.

-
- Lucas M.C., Baras E. (2001) Migration of freshwater fishes. Blackwell Science, Malden
 - Lydeard C., Cowie R.H., Ponder W.F., Bogan A.E., Bouchet P., Clark S.A., Cummings K.S., Frest T.J., Gargominy O., Herbert D.G., Hershler R., Perez K.E., Roth B., Seddon M.B., Strong E.E., Thompson F.G. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience* 54:321–30.
 - Paunovic M., Csa'nyi B., Simic V., Stojanovic B.C.P. (2006) Distribution of *Anodonta* (*Sinanodonta*) *woodiana* (Rea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquat Invasions* 1:154–160
 - Popa O.P., Kelemen B.S., Murariu D., Popa L.O. (2007) New records of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) from Eastern Romania. *Aquat Invasions* 2:265–267
 - Pou-Rovira Q., Araujo R., Boix D., Clavero M., Feo C., Ordeix M., Zamora L. (2009) Presence of the alien chinese pond mussel *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia, Unionidae) in the Iberian Peninsula. *Graellsia* 65:67–70
 - Reis J., Collares-Pereira M.J., Araujo R. Host specificity and metamorphosis of the glochidium of the freshwater mussel *Unio tumidiformis* (Bivalvia: Unionidae). *Folia Parasitologica*[online]. 2014, 61(1), 81-89 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.14411/fp.2014.005. ISSN 00155683. Dostupné z: <http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2014.005.html>
 - Roberts A. D., Barnhart M. Ch. 1999. Effects of temperature, pH, and CO₂ on Transformation of the Glochidia of *Anodonta suborbiculata* on Fish Hosts and in vitro. *Journal of the North American Benthological Society*. 18(4). 477-487.
 - Strayer D. L., Caraco N.F., Cole J.J., Findley S., Pace M.L. Transformation of Freshwater Ecosystems by BivalvessubtitleA case study of zebra mussels in the Hudson River/subtitle. *BioScience* [online]. 1999 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1525/bisi.1999.49.1.19. ISSN 1525-3244. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.1525/bisi.1999.49.1.19>
 - Taskinen, J., Saarinen-Valta, M., Väililä, S., Mänpää, E., Valovirta, I., 2011. In vitro culture of parasitic glochidia of four unionacean mussels. *Ferrantia* 64, 38–47.

-
- Young, M., J. Williams, 1984. The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Scotland. I. Field studies. *Archiv fur Hydrobiologie* 99: 405–422.
 - Wen, H.B., Jin, W., Ma, X.Y., Zheng, B.Q., Xu, P., Xu, L., Hua, D., Yuan, X.H., Gu, R.B., 2018. Vitro culture of axe-head glochidia in pink heelsplitter *Potamilus alatus* and mechanism of its high host specialists. *PLoS One*. 13, e0192292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.019229>

9 Přílohy

Příloha 1 – Mlíži druhu *Sinanodonta woodiana*



Zdroj: (Beran, 2017)

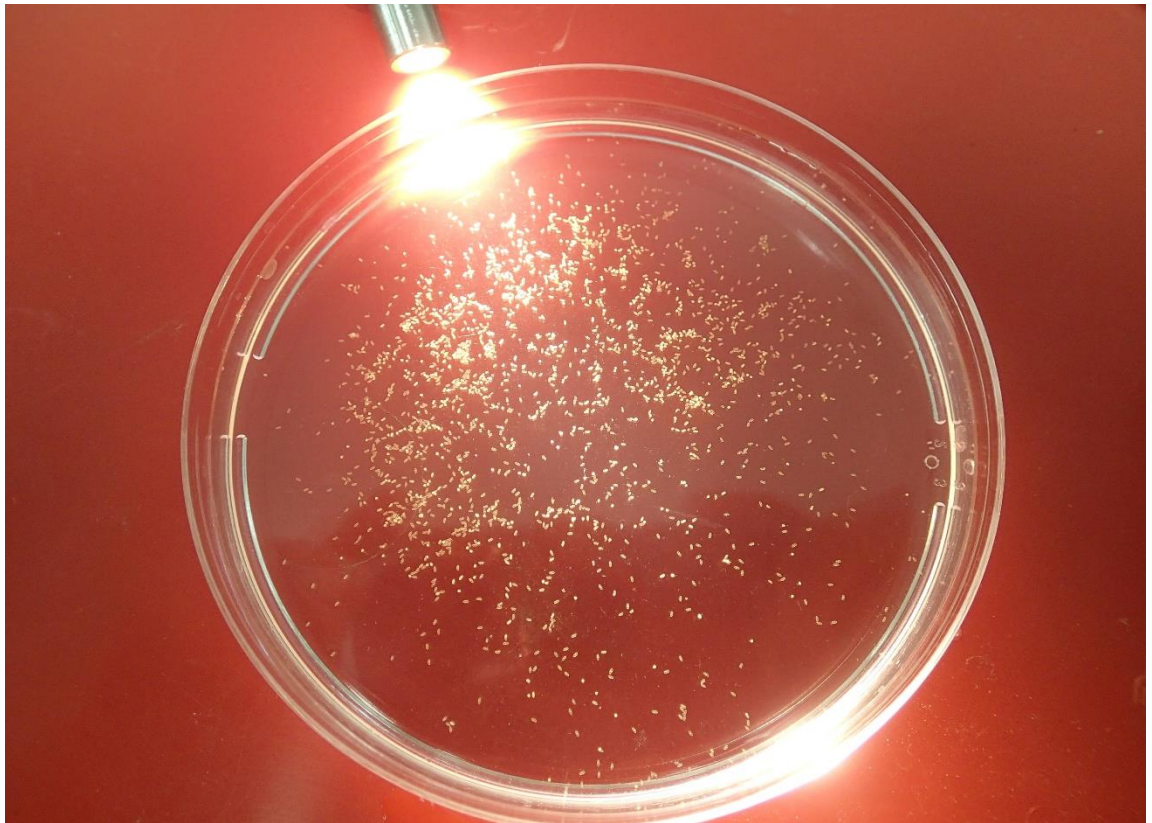
Příloha 2 - CO₂ inkubátor s kultivačními miskami



Příloha 3 – Světelný mikroskop se zkoumaným vzorkem



Příloha 4 – Zkoumaná glochidia z misky A12



Příloha 5 – Misky s kultivačním médiem a glochidii připravené k přesunu do CO₂ inkubátoru



Příloha 6 – Výchozí data

Misky	Podíl zavřených glochidií první den	Podíl aktivních juvenilů poslední den	Podíl mrtvých juvenilů poslední den
	%	%	%
A1	7%	3%	11%
A2	5%	8%	6%
A3	9%	3%	3%
A4	5%	30%	2%
A5	13%	22%	2%
A6	8%	5%	19%
A7	3%	0%	14%
A8	13%	13%	7%
A9	7%	3%	9%
A10	9%	12%	5%
A11	8%	0%	12%
A12	13%	3%	8%
B1	9%	34%	3%
B2	10%	5%	13%
B3	6%	8%	5%
B4	11%	8%	15%
B5	8%	4%	12%
B6	10%	0%	5%
B7	9%	4%	6%
B8	9%	3%	6%
B9	8%	22%	5%
B10	7%	8%	11%
B11	6%	1%	8%
B12	7%	1%	10%
C1	8%	14%	7%
C2	6%	7%	11%
C3	1%	11%	4%
C4	0%	6%	11%
C5	14%	13%	11%
C6	8%	17%	12%
C7	0%	9%	5%
C8	14%	3%	5%
C9	6%	9%	4%
C10	23%	4%	9%
C11	11%	1%	11%
C12	7%	6%	9%