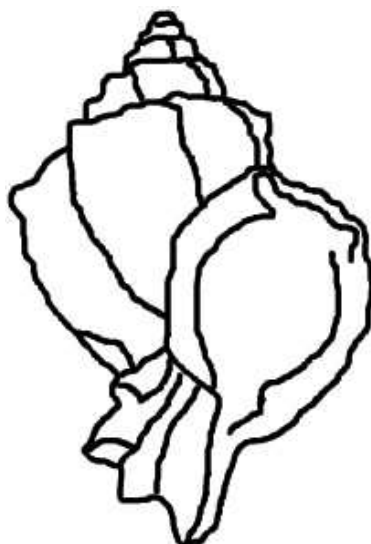




Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Geometricko – morfometrická studie ulit
plže *Hexaplex trunculus* z chorvatského
pobřeží jaderského moře



Vypracoval: **Jiří Macík**

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

Specialisté: **RNDr. Oleg Ditrich, CSc.**

RNDr. Lenka Barčiová, PhD.

Bakalářská diplomová práce

České Budějovice 2008

Jiří Macík (2008): Geometricko–morfometrická studie ulit plže *Hexaplex trunculus* z chorvatského pobřeží jaderského moře. [Geometric–morphometric study of gastropod shells *Hexaplex trunculus* from Croatian coast line of the Adriatic sea] Bc. Thesis, in Czech. 47 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Ve studii byla porovnávána tvarová variabilita tří set ulit mořského plže *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) ze tří lokalit chorvatského pobřeží. Nebyla nalezena kritéria pro rozlišení pohlaví a postižení imposexem metodou tradiční morfometrie. Za pomoci tradiční morfometrie a geometrické morfometrie byly určeny rozdíly ve tvaru ulit mezi třemi zkoumanými populacemi. Na ulitách *H. trunculus* byly nalezené mírné pohlavní odlišnosti pomocí geometricko-morfometrických metod. Výsledky oddělily samice od zbývajících dvou kategorií (samci a maskulinizované samice).

Annotation:

The shape variability of three hundred shells of sea snail *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) of three sites of Croatian coast line was compared. No criteria were found for distinguishing among males, females and imposex disabled females by traditional morphometry. With the help of traditional morphometry and geometric morphometry, differences in the shape of shells among the three investigated populations were identified. On the shells of *H. Trunculus*, there were found moderate sexual differences using the geometric-morphometric methods. The results separated females from the remaining two categories (males and masculinized females).

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, jen s pomocí uvedené literatury.

V souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním méjí bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 1. 1. 2009

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval mému vedoucímu práce Panu Oldřichu Nedvědovi a specialistům v oboru Panu Olegu Ditrichovi a Slečně Lence Barčiové za odbornou pomoc, ochotu a trpělivost. Dále také Janu Richtrovi, Luboši Kočvarovi a Ondřejovi Mácovi za jejich pomoc při terénních sběrech. Děkuji také mojí rodině, přátelům a kamarádům za jejich trpělivost, vstřícnost a podporu při vypracovávání této práce.

Obsah

1. Úvod do problematiky.....	6
1.1. Ekologie a historie <i>Hexaplex trunculus</i>	6
1.2. Imposex u <i>Hexaplex trunculus</i> a jiných plžů.....	7
1.3. Vliv TBT na jiné živočichy.....	13
1.4. Dumptonův syndrom.....	14
1.5. Tradiční morfometrie.....	15
1.6. Geometrická morfometrie.....	15
1.7. Morfometrické analýzy na schránkách měkkýšů.....	16
1.8. Cíle práce.....	18
2. Materiál a metody.....	19
2.1. Popis lokalit sběru.....	19
2.2. Metody použité v terénním výzkumu a laboratoři.....	22
2.3. Statistické, morfometrické a geometricko-morfometrické metody.....	24
3. Výsledky.....	28
3.1. Tradiční morfometrie.....	28
3.1.1. Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie pro určení rozdílu mezi pohlavími a určení vlastností jedinců se změnou pohlaví (imposex).....	28
3.1.2. Určení rozdílu mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi morfometricky.....	29
3.1.3. Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie	30
3.2. Geometrická morfometrie.....	31
3.2.1. Určení rozdílu mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi pomocí geometrické morfometrie.....	31
3.2.2. Určení rozdílu mezi kategoriemi pohlaví pomocí geometrické morfometrie.....	34
4. Diskuse.....	37
4.1. Kategorie pohlaví.....	37
4.1.1. Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie pro určení rozdílu mezi pohlavími a určení vlastností jedinců se změnou pohlaví (imposex).....	37
4.1.2. Určení rozdílu mezi kategoriemi pohlaví pomocí geometrické morfometrie.....	37

4.2.	Mezipopulační (geografické) rozdíly.....	38
4.2.1.	Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi morfometricky.....	38
4.2.2.	Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi pomocí geometrické morfometrie.....	39
5.	Závěr.....	41
6.	Použitá literatura.....	42

1. Úvod do problematiky

1.1. Ekologie a historie *Hexaplex trunculus*

Domovem ostranky *Hexaplex* (*Murex*, *Phyllonotus*, *Trunculariopsis*) *trunculus* (Linné, 1758) je Středozevní moře (salinita = 37-38 ‰, teplota = 20 °C). *H. trunculus* do okolních moří neexpanduje, protože zde nejsou vhodné podmínky pro jeho život. Rudé moře má příliš vysokou salinitu a průměrnou roční teplotu (salinita = 40 ‰, teplota = 28 °C), Černé moře nízkou salinitu a je chladnější (salinita = 31 ‰, teplota = 14 °C), Atlantický oceán je rozmanitý (salinita = 36 ‰, teplota = 19 °C) (Mojetta, 2005). Západní hranicí výskytu *H. trunculus* je jižní Portugalsko a Kanárské ostrovy. Je jeden z nejběžnějších muricidních plžů ve Středozevním moři (Poppe & Gotto, 1991). Čeleď Muricidae je celosvětově rozšířena a má více než 2000 druhů (Poppe & Gotto, 1991).

H. trunculus dosahuje velikosti mezi 80 mm až 90 mm (Poppe & Gotto, 1991). Výjimečně se objevují jedinci dosahující velikosti 110 mm, což je pravděpodobně maximální velikost druhu (Poppe & Gotto, 1991). Dožívá se šesti až osmi let (El Hamdani et al., 1998) *H. trunculus* žije jen pod úrovní odlivu v hloubkách od 1 do 100 m na skalnatém i bahnitém dně (Poppe & Gotto, 1991; Chiavarini S., Massanisso P., Nicolai P., Nobili C., Morabito R., 2003), v klidnějších pobřežních vodách (mělké zátoky a laguny, nebo hlubší místa, bez vlivu vlnobití) (Rilov G., Benayahu Y. & Gasith A., 2004). Často je pozorovaný částečně zahrabaný do písku (Rilov et al., 2004). *H. trunculus* má nižší rezistenci k vysušení, proto nežije v přílivové zóně (Rilov G., Benayahu Y. & Gasith A., 2004). Jedná se převážně o mrchožrouta, ale občas se živí i dravě (El Hamdani et al., 1998).

Druhy měkkýšů řádu Neogastropoda jsou gonochoristé, mají vnitřní oplození a samice jsou větší než samci. Počet samic v populaci je vyšší než počet samců, což je běžné u všech gonochoristických měkkýšů (Fretter & Graham, 1994). Tělesná konstituce je u druhů tohoto řádu obdobná, ale co se týče tvarů a barev ulit je různorodost obrovská. Postrádají vnější rozlišovací znak pro pohlaví (Vasconcelos, 2006). Normálním jevem u muricidních druhů je zvětšování penisu v reprodukčním období (druhy ze středomoří – léto) a zmenšování v období klidu (druhy ze středomoří – srpen až říjen) (Ramon, 2002). Dnes je ostranka *H. trunculus* součástí potravinářského průmyslu, zatímco ve starověku byla také užívána jako zdroj purpurového barviva společně s *Bolinus brandaris* (Linné, 1758), *Thais haemastoma* (Linné, 1758) (Poppe & Gotto, 1991).

1.2. Imposex u *Hexaplex trunculus* a jiných plžů

Hexaplex trunculus stejně jako jiní živočichové trpí znečišťováním životního prostředí činností lidí. U samic tohoto druhu se našla růstová vada maskulinizace. Fenomén byl nazván "imposex" (Smith, 1971) nebo též "pseudohermafroditismus" (Jenner, 1979). Slovo imposex bylo vytvořeno jako zkratka ze "superimposition of males genital organs onto females" a poprvé použito ve studii *Nassarius obsoletus* (Say, 1822) na Long Island v USA (Smith, 1971). Poprvé byl imposex zjištěn u druhu ostranky *Nucella lapillus* (Linné, 1758) u břehů Velké Británie (Blader, 1970). První studie imposexu na *H. trunculus* byla provedena až v devadesátých letech minulého století ve Francii (Martoja & Bouquegneau, 1988) a další následovaly na Maltě (Axiak, 1995), ve Španělsku (El Hamdani et al., 1998), v Itálii (Terlizzi, 1999; Chiavarini, 2003; Garaventa, 2006), v Izraeli (Rilov et al., 2000), na Istrii (Garaventa, 2006), na celkovém pobřeží Chorvatska (Prime, 2006) a v Portugalsku (Vasconcelos, 2006). Imposex byl prokázán i u jiných muricidních plžů ve Středozemním moři a to u *Bolinus brandaris* (Ramón & Amor, 2001, 2002), *Nucella lapillus* a *Ocenebra erinaceus* (Linné, 1758) (Stroben et al., 1996). Mezi nejznámější nemuricidní druhy, které postihuje imposex, patří *Ilyanassa obsoleta* (*Nassarius obsoletus*) (Say, 1822) (Bryan et al., 1989), *Nassarius reticulatus* (Linné, 1758), *Nassarius incrassatus* (Ström, 1768) a *Trivia arctica* (Montague, 1803) (Stroben et al., 1996).

Po zjištění, že imposex nekoreluje s arsenem, kadmíem, mědí, olovem, stříbrem a zinkem, ale má pozitivní korelaci s cínem (Bryan & Gibbs, 1986), byla objevena látka, která jej způsobuje. Je jím tributylcín (TBT) a jeho deriváty (Gibbs & Bryan, 1987). Dealkylací TBT vznikají DBT (dibutylcín) a MBT (monobutylcín), které se také v tělech živočichů ukládají, ale ne v takové míře (Axiak, 1995). Další zjištěnou látkou způsobující imposex je TPT (trifenylcín) a z ní odvozené DPT (difenylcín) a MPT (monofenylcín) (Horiguchi, 1994). TBT má 13 derivátů a TPT 7 (Horiguchi, 1994). Na indopacifické muricidní druhy *Thais clavigera* (Küster), *T. brouni* (Dunker) má TPT horší dopad než TBT, protože jej hůře metabolizují (Horiguchi, 1994). U druhu *N. lapillus* je nejhorším polutantem, který způsobuje imposex, tributylchlorid (Gibbs, 1988). Koncentrace TBT způsobující tento fenomén je různá podle druhu, ale je velice nízká. Pro *H. trunculus* je menší než 0,1 ng Sn/l mořské vody (Gibbs, 1999) a pro *N. lapillus* je menší než 1 ng Sn/l mořské vody (Gibbs & Bryan, 1987). Koncentrace nutná pro vznik imposexu u *N. lapillus* byla zjištěna tak, že nepostižení jedinci byli v laboratorních podmínkách koncentraci 1 ng Sn/l vystaveni (Gibbs & Bryan, 1987). Čím je vyšší koncentrace TBT ve vodě, tím je u postižených druhů vyšší stupeň imposexu (Bryan & Gibbs, 1986). TBT způsobuje ve vyšších koncentracích sterilitu, avšak efekty TBT se mění

v závislosti na druzích. U citlivějších druhů (bioindikátorů) snižuje reprodukční schopnost, ale u méně citlivých druhů nedochází k tak drastickým somatickým změnám (Bryan et al., 1986). Pro *N. lapillus* je hranicí sterility koncentrace 2 ng Sn/l mořské vody (Gibbs, 1988). Potlačení oogeneze nastává při koncentraci 3–5 ng Sn/l mořské vody. Následně startuje spermatogeneze (Gibbs, 1988). U druhu *Ilyanassa obsoleta* z ústí řeky York (Virginie, USA) byla zjištěna hraniční koncentrace pro sterilitu též 2 ng Sn/l mořské vody (Bryan, 1989). Samice *H. trunculus* mají tendenci akumulovat v sobě více TBT než samci a to hlavně v dosti zamořených územích (Axiak, 1995).

TBT se do vod uvolňuje z antikoročních nátěrových hmot. Ve vodách se vyskytuje nejvíce v přístavech, docích (Gibbs & Bryan, 1986), na lodních trasách (Ten Hallers, 1994) ale i na klecích rybích farem (Gibbs & Bryan, 1987). V přístavech je často koncentrace 2 ng Sn/l mořské vody a více, přičemž mluvíme o masivním zamoření (Gibbs, 1993). Při studii imposexu na *Buccinum undatum* (Linné, 1758) bylo zjištěno, že TBT se vyskytuje i na otevřeném moři. Tento druh žije na plochem a bahnitým dně na otevřeném moři, tudíž mimo přístavy (Ten Hallers, 1994). Před dvaceti lety druh *B. undatum* nevykazoval žádné známky imposexu, ale se vzrůstající lodní dopravou se u něj imposex objevil (Ten Hallers, 1994). Výskyt imposexu mimo přístavy na otevřeném moři byl potvrzen testem na *N. lapillus* v Severním moři (Evans, 1996). TBT se hlavně ukládá do sedimentů. Tributylcín je zde ve vyšší koncentraci než ve volné vodě (El Hamdani et al., 1998). Vysoká koncentrace TBT v sedimentech byla zaznamenána v Hong Kongu, a to s průměrem mezi 1000 – 1700 ng Sn/g sedimentu (Ko, 1995). Maximální naměřená hodnota byla 53000 ng Sn/g sedimentu (Ko, 1995). Zvláště vysoký výskyt imposexu díky enormnímu množství TBT v sedimentu byl dokázaný v Japonsku a v Indii (Ten Hallers, 1994). Nejvíce se v sedimentech ukládá TBT, potom DBT, a dále MPT (Ko, 1995). Koncentrace TBT ve tkáni *H. trunculus* je stejná jako v sedimentech (Axiak, 1995). Možnost vzniku imposexu jinými polutanty není vyloučena (Matthiessen a Gibbs, 1998).

Při prvním biomonitoringu TBT znečištění, který se odehrál na Maltě v devadesátých letech minulého století byla poprvé použita ostranka *H. trunculus* jako bioindikátor znečištění vody (Axiak, 1995). *H. trunculus* zde demonstroval vysokou citlivost k TBT ve vodě a stal se tak bioindikátorem TBT znečištění ve Středozemním moři (Axiak et al., 1995; Chiavarini et al., 2003). *H. trunculus* a *Thais haemastoma* (Linné, 1758) jsou bioindikátory znečištění vod tributylcínem ve Španělsku (El Hamdani et al., 1998). Bylo testováno, který z těchto dvou druhů je lepší bioindikátor. Ukázalo se, že jím je *H. trunculus*, protože je citlivější k nižším koncentracím TBT ve vodě (El Hamdani et al., 1998). Ve studiích provedených v roce 1999 a 2001 Terlizzi, Ramón a Amor používali již jen *H. trunculus* jako bioindikátor znečištění.

Bioindikátorem znečištění vod tributylcínem okolo Britských ostrovů a přilehlém Atlantiku je *N. lapillus* (Gibbs, 1993). Na pobřeží thajského ostrova Phuket byli testováni na citlivost *Thais distinguenda* (Röding, 1798), *Thais bitubercularis* (Lamarck, 1822), *Morula musiva* (Kiener, 1835) (Bech, 1999). První druh prokázal nejvyšší citlivost a stal se tak bioindikátorem znečištění v této oblasti (Bech, 1999). Pozorováním muricidních druhů *Thais bitubercularis*, *T. clavigera* (Küster, 1860) a *T. jubilaea* (Tan & Sigurdsson, 1990) ze Singapuru bylo zjištěno, že všechny tři druhy jsou ovlivňované tributylcínem. Bioindikátorem se však stal jen *Thais jubilaea*, který byl nejcitlivější na TBT ve vodě (Tan, 1997).

Od roku 1960 se používají antikoroziční nátěrové hmoty s obsahem TBT (Axiak, 1995). Po zjištění dopadu na životní prostředí byla Francie první zemí na světě, která zavedla zákaz na používání těchto barev pro lodě menší 25 metrů a to v roce 1982 (Terlizzi, 2001). Poté byla následována dalšími státy (USA 1986, UK 1987, Kanada, Nový Zéland a Japonsko 1989, Španělsko 1990, Hong Kong 1992) (Horiguchi, 1994; Ko, 1995, Ramón & Amor, 2001). Mezinárodní námořní organizace (IMO) a Výbor námořní ochrany životního prostředí (MEPC) převzali tuto smlouvu pro celosvětový zákaz používání TBT, který vyšel v lednu roku 2003. Zákaz byl dále převzat do směrnice Evropské unie 1 července roku 2003 s regulačním (CE) číslem 782/2003 (Garaventa et al., 2006). Po zákazu v roce 2003 se začalo s odstraňováním již existujících nátěrů a to do roku 2008, kdy by měly být zcela nahrazeny netoxickými nátěrovými hmotami (Bech, 1999; Bech et al., 2002). Jedním z kontrolních míst dodržování legislativy je Arcachonský záliv v západní Francii. Koncentrace TBT se po zákazu v Arcachonském zálivu po třiceti letech snížila zpět na původní hranici 1 ng Sn/l mořské vody (Ruiz, 1996). Nejvyšší úroveň dosáhla v roce 1982, kdy zde byla naměřena koncentrace vyšší než 100 ng Sn/l mořské vody (Ruiz, 1996). Bioindikátorem byla ostranka *Ocenebra erinacea* (Linné, 1758) (Ruiz, 1996). Navzdory zákazu používání barev s obsahem TBT bylo zjištěno, že se na mnoha britských a přilehlých ostrovech snížily počty jedinců *N. lapillus* v populaci a některé populace dokonce vyhynuly (Evans, 1996). Problémem je, že právo zakazuje používání antikorozičních nátěrových hmot s obsahem TBT, ale porušení se nepostihuje (Vasconcelos, 2006). V některých státech (Chorvatsko, Thajsko) nebyl dokonce tento zákaz dlouhou dobu zaveden (Bech, 2002; Garaventa et al., 2006).

Častější úmrtí jedinců před dosažením dospělosti u druhu *N. lapillus* je způsobeno zablokováním vejcovodu a následnou akumulací vajec, která vyústí v protržení stěny vejcovodu (Gibbs & Bryan, 1986). Sterilita ve vyšších stupních imposexu není způsobena růstem penisu, ale růstem chámovodu (Gibbs & Bryan, 1987). Chámovod se u samic zakládá z paliálního epitelu (Gibbs & Bryan, 1986). Extrémní fáze maskulinizace je tvorba varlat a start spermatogeneze (Gibbs, 1986, 1988). Samec druhu *H. trunculus* má pohlavní ústrojí

složené z penisu, distální části chámovodu, prostatické žlázy, proximální části chámovodu, vesiculi seminalis, varlat (Axiak, 1995). Imposex postižená samice má penis, chámovod, prostatickou žlázu a kapslovou žlázu (Axiak, 1995). Samice mají genitální papilu, kapslovou žlázu, žlázu, která přijímá spermie (sperm-ingesting gland), žlutkovou žlázu, vejcovod a vaječníky (Axiak, 1995). Penis je vždy za pravým tykadlem (Gibbs & Bryan, 1986), je esovitě prohnutý s distální rovnou částí a má mramorovou barvu jako je noha živočicha (Gibbs, 1999). Imposex postižené samice mají menší a světlejší penis než samci (Gibbs, 1999). Tvar, velikost a zbarvení penisu u neogastropod se mění s druhem (Gibbs, 1999). Velikost penisu u samců roste s věkem (Ramon, 2002), tudíž zde existuje pozitivní korelace mezi délkou ulity a délkou penisu, což u postižených samic není (Gibbs, 1987). Při narkóze (viz podkapitola 2.2.) dochází k prodloužení penisu samců i imposex postižených samic (Vasconcelos, 2006), ale zvětšení penisu při anestézii nemá vliv na určení pohlaví (Vasconcelos, 2006). Sezónní změny ve velikosti penisu u *H. trunculus* způsobují v měření pouze malou chybu (Vasconcelos, 2006). U postižených samic nedochází k ročnímu kolísání velikosti penisu (Stroben, 1996) a velikost penisu nezávisí na stáří, ale na koncentraci TBT ve vodě (Gibbs, 1999). Kapslová žláza při stupni 6 (podle VDSI – viz dále) má hnědou až černou barvu, vajíčka jsou při tom degradovaná. Varlata jsou ze začátku vývoje hořčicově žlutá a s věkem tmavnou. Vaječníky jsou zprvu šedé a též věkem tmavnou. Vaječníky a varlata jsou v dospělosti krémově žlutá až oranžová (záleží též na sexuální kondici) (Gibbs, 1999).

Imposex u plžů nastává po endokrinním zhroucení (Matthiessen & Gibbs, 1997). Dochází k akumulaci testosteronu, který je inhibitor cytochromu P-450 dependentní aromatázy (Gibbs, 1993). Testosteron u samic způsobuje již zmíněnou maskulinizaci (Matthiessen & Gibbs, 1997). Totéž bylo prokázáno i u druhů *Ocenebra erinacea* a *Buccinum undatum* (Matthiessen & Gibbs, 1997). K tomu, jak dochází k akumulaci testosteronu ve tkáni, jsou však dvě hypotézy (Nishikawa, 2006). První je, že TBT snižuje hladinu enzymů ve tkáni, které metabolizují testosteron (Nishikawa, 2006). Druhá hypotéza je, že TBT vystupuje jako toxin poškozující nervovou tkáň. Začne docházet k abnormálnímu uvolňování peptidického hormonu s názvem “penis morphogenic faktor“ (PMF) (Féral & Le Gall, 1983). PMF sice způsobuje vývoj samčích pohlavních znaků následně po externím podnětu jako je vystavení TBT, ale PMF nemůže být primárním faktorem v dosažení imposex symptomů TBT. Musí existovat něco dalšího, co je faktorem, který se přímo ovlivňuje s TBT v počátečním kroku vzniku imposex postižení (Oberdörster & McClellan-Green, 2000, 2002). Komplexním prověřováním endokrinního zhroucení se zjistilo, že TBT a TPT mají blízký vztah k lidskému ligandu “retinoid X receptor“ RXR (Kanayama et al., 2005). Navázání RXR k 9-cis kyselině retinové bylo experimentálně potvrzeno (Nishikawa et al. 2004). To znamená,

že imposex je způsoben RXR. Ve studii bylo toto tvrzení podloženo pozorováním 9-cis kyseliny retinové, která navodila imposex stejně jako TPT (Nishikawa et al. 2004). Plži mají funkční homolog RXR. 9-cis kyselina retinová a přirozený ligand RXR způsobili vývoj samčího pohlavního ústrojí u samic (Nishikawa, 2006). Odhalení důležitosti RXR při rozvoji imposex postižení bylo zjištěno na muricidních plžích rodu *Thais* (Nishikawa, 2006).

Větší samice jsou častěji postižené imposexem, protože mají více času na vývin deformací (Axiak, 1995). Samci, samice i imposex postižené samice byli větší v zamořených oblastech než v čistých vodách. To může znamenat pokles počtu jedinců v populaci a zvětšení somatického růstu (vkládají více energie do růstu než do rozmnožování) (Axiak, 1995).

Úroveň postižení populace imposexem se dá stanovit několika způsoby. RPSI (relative penis size index) je vyjádřen v procentech (Gibbs, 1987). Výpočet vypadá takto $((\text{průměrná délka penisu imposex postižených})^3 / (\text{průměrná délka penisu samců})^3) \times 100$. Další je RPLI (relative penis length index) a je vyjádřen také v procentech (Gibbs, 1987). Výpočet je $(\text{průměrná délka penisu imposex postižených} / \text{průměrná délka penisu samců}) \times 100$. Rozdělení do stupňů postižení je ve škále 1–5 a jednotlivé fyziologické stavy pro RPSI i pro RPLI jsou stejné a jsou v tabulce (Tab.1). Fyziologické stavy z úrovně postižení jedna a dvě, které jsou v tabulce 1, jsou použitelné pouze pro druh *N. lapillus*. Jedinci stupně 3, 4 a 5 jsou sterilní (Gibbs, 1987). Zvětšování a zmenšování penisu během roku je pro RPSI a RPLI zanedbatelný (Ramon, 2002). RPSI nebo RPLI metoda je nepoužitelná pro druhy s vyšším počtem stádií imposexu bez penisu (Stroben, 1996). U *H. trunculus* to nehrozí (Stroben, 1996). RPLI má menší chybu, protože variabilita nekonstantní velikosti penisu je menší než u RPSI (není umocněna na třetí) (Stroben, 1996). Další je VDSI (vas deferens sequence index) jehož úroveň se stanovuje vizuálně (Gibbs, 1991; Axiak, 1995). Jednotlivé fyziologické stavy jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2). Už při stupních nula a jedna podle VDSI se musí provést pitva, protože se může jednat o nepostiženou samici (u imposex postižených samic při stupni jedna penis ještě není vyvinut nebo je malý, ale vyvíjí se chámovod) (Gibbs, 1999). Při stupni 5 a 6 podle VDSI nastává sterilita (Gibbs, 1999). Úroveň 4 byla rozčleněna na další podsekce, kvůli přesnějšímu stanovení postižení, na 4,3 a 4,7 (Stroben et al., 1992). AFPL (Average female penis length; historic index) je jako parametr TBT biomonitoringu vhodnější než RPSI nebo RPLI (Stroben, 1996).

Tab. 1: Úroveň imposexu podle RPSI a RPLI.

Úroveň imposexu	Fyziologický stav
1.	délka penisu je menší než jedna čtvrtina délky ulity
2.	délka penisu je větší než jedna čtvrtina délky ulity
3.	stupeň dvě + konec vejcovodu je blokován
4.	stupeň tři + kapslová žláza je tmavší než normálně (hnědá až černá)
5.	stupeň čtyři + tvorba spermatické žlázy ve vaječnicích

Imposex je považován za ireverzibilní stav (Gibbs & Bryan, 1987), ale v roce 2005 Gibbs zjistil, že částečně reverzibilní je (viz podkapitola 1.4.). TBT má vliv na reprodukci *H. trunculus* a na jeho populační dynamiku (Axiak, 1995). Dnes je v katalogu druhů, které postihuje imposex, více než 120 druhů plžů ze skupiny Neogastropoda a každým rokem se prodlužuje (Stroben, 1996).

Tab. 2: Úroveň imposexu podle VDSI.

Úroveň imposexu	Fyziologický stav
0.	normální samice
1.	malý penis nad pravým tykadlem
2.	penis s vytvořenou trubicí
3.	větší penis s trubicí ústící do chámovodu (není úplné propojení), ale dosahuje vaginálního otvoru
4.	viz stupeň 3 + dosahuje až k vulvě
4,3.	chámovod obvíjí vagínu (stále možná kopulace)
4,7.	chámovod se dostává až k třiceti % délky kapslové žlázy
5.	vulva není viditelná, chámovod vede okolo kapslové žlázy a často vyvrhuje žlutou tkáň do plášťové dutiny
6.	start spermatogeneze

1.3. Vliv TBT na jiné živočichy

Tributylcín působí různým způsobem a různou měrou nejen na plže, ale i ostatní zástupce živočišné říše.

Působení TBT bylo zjištěno na ústřicích *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) ve francouzském zálivu Arcachon (Alzieu, 1986). Docházelo zde k narušování tvaru a kvality lastur (malformace) (Alzieu, 1986; 1991) a k zvýšené mortalitě larev (veligerů) těchto mlžů (Alzieu, 1986; 1991; Claisse & Alzieu, 1993). Larvy měly růstové anomálie, které se vytvářely během jejich pelagického období života a tím snížily schopnost přežití (Alzieu, 1986). Koncentrace způsobující růstové anomálie na larvách je 5 ng Sn/l mořské vody (Alzieu, 1986) a koncentrace způsobující zvýšení jejich mortality v prvních dnech vývoje je 20 ng Sn/l mořské vody (Alzieu, 1991). U dospělců se vliv TBT ve vodě začal projevovat malformacemi lastur (Alzieu, 1986; 1991). Na příčném průřezu lasturou ústřice, která žila ve vodě s vyšší koncentrací TBT, byly zřetelné komůrky vyplněné slizovou hmotou (Claisse & Alzieu, 1993). Sliz v dutinách lastur ústřic byl poprvé popsán v zálivu Arcachon v roce 1974 (Alzieu, 1986). Kalcifikační protein konchyolin má v komůrkách zhoršenou schopnost vaznosti k aminokyselinám (kyselina asparagová, glycin a serin), které poskytují spojení s Ca^{2+} (Alzieu, 1991). Komponenty slizu tedy nedokáží Ca^{2+} navázat (Alzieu, 1986). Snížená schopnost kalcifikace u ústřic nastává při koncentraci pod 2 ng Sn/l (Alzieu, 1991). Zvyšující se koncentrace TBT ve vodě má horší dopad na populaci (Alzieu, 1986), na růst a reprodukci jedinců (Alzieu, 1991). V roce 1991 zůstává mechanismus vlivu TBT na kalcifikaci neznámý (Alzieu, 1991).

Zákaz pro používání antikoročních nátěrů pro lodě menší 25 metrů byl v roce 1982 ve Francii vydán proto, aby se zabránilo znečišťování moře a též aby nedocházelo k úbytku výtěžnosti ústřic. Jde vlastně o ochranu ústřičných farem (Alzieu, 1991). Snížení koncentrace TBT ve vodách zálivu Arcachon bylo okamžité po zákazu z roku 1982 (Alzieu, 1986) Postupně docházelo ke zvyšování počtu jedinců na normální hodnotu. Normální výtěžnost ústřic v zálivu Arcachon se pohybuje mezi 10000–15000 tunami za rok (před zákazem byl průměr o 3000–5000 t méně) (Claisse & Alzieu, 1993) Při kontrole znečištění vody v zálivu mezi léty 1979–1991 se zjistilo, že došlo ke zvýšení koncentrace Cu ve vodě následně po zákazu antikoročních nátěrových hmot s TBT komponenty (Claisse & Alzieu, 1993). Místní vlastníci lodí se vrátili do dob před rokem 1960, kdy se používaly antikoroční barvy s měďnatými oxidy (Claisse & Alzieu, 1993). Mezi látky biotoxické patří mimo cín i olovo, arsen, rtuť a měď (Terlizzi, 2001).

TBT působí i na vyšší obratlovce. Například způsobuje zvýšenou mortalitu delfínů (*Tursiops truncatus*). Dochází u nich vlivem TBT k potlačení imunitního systému (Kannan et al., 1996). Ukládání TBT, DBT a MBT ve tkáních (játra, ledviny a svaly) bylo prokázáno i u tuňáků modroploutvých (*Thunnus thynnus*) a žraloků modrých (*Prionace glauca*) (Kannan et al., 1996).

1.4. Dumptonův syndrom

Dumptonův syndrom dostal jméno podle Dumptonova zálivu, místa, kde byl poprvé pozorován (Gibbs et al., 1991). Je vedle imposexu dalším problémem v určování pohlaví u ostranky *Nucella lapillus*. (Gibbs, 1993). Byl také zjištěn při výzkumu na severním břehu ústí řeky Temže (Gibbs, 1993). Dumptonův syndrom (dále jen DS) byl vždy zjištěn jen v místech, kde byla vysoká koncentrace TBT ve vodě, a to pouze v ostrůvkovitých populacích (Gibbs, 1993). U druhu *H. trunculus* nebyl dosud pozorován (Terlizzi, 1999).

Jedná se o vzácnou genetickou mutaci (Gibbs, 2005), která způsobuje demaskulinizaci samců a samic postižených imposexem u tohoto druhu (Gibbs, 1993). Jde o opak imposexu (Gibbs, 2005). Pro samce je DS katastrofální, ale pro samice je výhodou, protože jim poskytuje imunitu proti imposexu (Gibbs, 1993). DS způsobuje inhibici testosteronu (Gibbs, 1993). Mechanismus je zatím neznámý (Gibbs, 2005). U samic postižených imposexem, který je maximálně rozvinutý (úroveň podle VDSI = 5-6) demaskulinizace nefunguje, ale u imposexu úrovně podle VDSI 1-4 demaskulinizace funguje (inhibice testosteronu) (Gibbs, 2005). Ani imposex ani DS není způsoben predací či parazitací (Gibbs, 1993). Imposex je způsoben vlivem prostředí, zatímco DS je genetická mutace (Gibbs, 1993), která umožňuje lepší přežití druhu v oblastech s vysokou koncentrací TBT ve vodě (Gibbs, 1999).

Při pokusech v laboratoři bylo zjištěno, že prvotní znaky DS jako nevyvinutý nebo malý penis u samců, též chámovod a prostata (Gibbs, 1999), se začaly projevovat již v F1 generaci křížením jedinců ve vodě zamořené TBT polutanty (Gibbs, 2005). Křížením jedinců z F1 generace s projevy DS vznikli jedinci už zcela s DS (Gibbs, 2005). Křížením samice s DS ve vodě s vysokou koncentrací TBT se samcem bez DS vznikli zcela normální jedinci (Gibbs, 2005). DS je způsoben recesivní alelou a projeví se až u recesivních homozygotů (Gibbs, 2005). DS vede ke sterilitě samců, protože postihuje celý samčí rozmnožovací aparát (Gibbs, 1993; 2005). Penis nedosahuje dostatečné velikosti potřebné pro kopulaci (minimální velikost u dospělých samců je 3,4mm) – samci s DS mají v F1 generaci maximální velikost penisu právě 3,4mm, ale v F2 generaci penis nemají (Gibbs, 2005). Testes jsou též špatně vyvinuty a spermatogeneze je potlačena (chybí poslední fáze) (Gibbs, 2005). Pohlavní ústrojí

samců s DS je podrobně popsáno v článku Gibbse (1993). Imposexem postižené samice s DS jsou potentní kromě VDSI = 5 a 6, které jsou sterilní (Gibbs, 2005). Samci jsou potentní pouze, když nevykazují DS (Gibbs, 2005). Když je při koncentraci 2ng Sn/l mořské vody ve vodě samec i samice s penisem, jedná se o normální populaci s imposexem postiženými samicemi, ale když při této koncentraci penis samcům a samicím chybí, jedná se o populaci dumptonovu (Gibbs, 2005).

1.5. Tradiční morfometrie

Morfometrická měření, dnes “tradiční morfometrie“, jsou potřebná ve chvíli, kdy se snažíme porovnávat mezidruhové nebo vnitrodruhové rozdíly ve tvaru (Rohlf, 1993). Hledají se tak morfometrická kritéria hlavně pro druhovou determinaci. Pouhým měřením získaná data určitých proporcí (jsou užívány vzdálenosti, úhly a procenta) (Rohlf, 1993) se pak vyhodnocují pomocí statistických výpočtů. Jedná se o kvantitativní data. Výsledky jsou většinou vyjádřené numericky a neposkytují nám zřetelnou představu o tvarových změnách (Rohlf, 1993). Z mnoha studií vyplývá, že geometrická morfometrie je výsledkově silnější, respektive lepší pro určení změn ve tvaru, tudíž je vhodnější ke druhovému rozlišování (Rohlf, 1993).

1.6. Geometrická morfometrie

Poměrně novou metodou, jak analyzovat informaci o tvaru, je geometrická morfometrie (Rohlf, 1993). Změny lze během celé analýzy zálohovat, tudíž nedochází ke ztrátám informací mezi proměnnými, a konečně výsledky se snadno vizualizují. Změny v tvaru můžeme potvrdit nejen matematicky, ale i přesnou vizualizací (Rohlf, 1993). Vstupní data jsou ve formě kartézských souřadnic, které popisují body (landmarks, dále již česky landmark). Souřadnice jsou užitečnější pro modelování tvaru než tradiční měření a navíc vzdálenosti lze ze souřadnic vypočítat (Rohlf, 1993). Analýzy lze provádět jak ve dvourozměrném tak trojrozměrném prostoru. “Landmarky“ jsou body s biologickým významem, které můžeme přesně lokalizovat na jednom studovaném objektu a také nalézt homologické body pro ostatní studované objekty (Bookstein, 1991). Když není možné nalézt landmarky (např. u zubů, které mají opotřebenou sklovinu), musí se použít “pseudolandmarky“. Jsou to body lokalizované v koncích struktur, nebo se používají, když dochází k zakřivení obrysu struktury (Rohlf, 1993) Geometrická morfometrie je podrobně popsána v práci Booksteina (1996). Za pomoci prokrustovské superpozice odstraníme ze

souboru dat rozdílů v poloze, velikosti a orientaci studovaných objektů (Rohlf, 1993). Tato technika funguje tak, že pomocí izometrické změny velikosti a posunem na sebe skládá objekty tak, aby součet druhých mocnin vzdáleností všech landmarků jednotlivých objektů od příslušných bodů konsenzuální konfigurace byl minimální (Bookstein, 1996).

Geometrická morfometrie je výhodná z důvodu oddělení uniformní a neuniformní složky tvarových změn. Uniformní tvarové změny jsou všechny změny objektu zachovávající rovnoběžnost přímek (Bookstein, 1996). Vizualizace tvarových změn je na základě metody TPS (Thin plate spline), která porovnává dva objekty. Jde o převrstvení jednoho objektu pravoúhlo souřadnicovou sítí, kterou tvarujeme tak dlouho, dokud umístění jeho bodů není shodné se studovaným objektem (Bookstein, 1996). Deformační energie vyjadřuje změny poloh landmarků. Je to energie potřebná k deformaci referenční konfigurace bodů umístěných na nekonečně velké a nekonečně tenké kovové desce tak, aby se dosáhlo žádoucího posunutí (Bookstein, 1996). Jedná-li se o naklánění a přetáčení desky, mluvíme o uniformní transformaci. Uniformní transformace nepotřebují žádnou deformační energii (Bookstein, 1996). Neuniformní změny v tvaru jsou vyjadřovány jako vektory matice deformační energie "partial warps". Vlastní hodnoty "partial warp scores" vyjadřují polohu objektu v tangenciálním prostoru (Bookstein, 1996). Tato data se dále používají ve statistických mnohorozměrných metodách (Bookstein, 1996). Pro určení tvarových změn se také používá "centroidová velikost". Jde o druhou odmocninu ze sumy čtverců vzdáleností landmarků k jejich "centroidu" (Bookstein, 1991).

Geometrická morfometrie se uplatňuje i v jiných oborech jako ontogeneze (Stone, 1998), genetika, vliv životního prostředí (Rohlf, 1993), antropologie (Gómez et al., 2007), systematika a paleontologie (Cardini A. & Elton S., 2007). Problém je ale s paleontologickými vzorky. Je jich často malý počet, kvůli nedostupnosti, a statistické výpočty nejsou tolik přesné (Cardini A. & Elton S., 2007).

1.7. Morfometrické analýzy na schránkách měkkýšů

Na schránkách měkkýšů se geometrická morfometrika nejčastěji používá k nalezení morfometrických kritérií, které usnadní určení dvou velice podobných druhů. Během minulých málo desetiletí byly morfometrické metody schváleny pro konchyliologii jako použitelné mnohorozměrné statistické techniky k popisování organismů (Stone, 1998).

Studie tohoto typu byla provedena na dvou družích z čeledi Volutidae *Adelomelon ancilla* (Lightfoot, 1786) a *Odontocymbiola magellanica* (Gmelin, 1791) v jižním Chile (Urrea et al., 2007). *A. ancilla* a *O. magellanica* mají ekonomický význam pro chilské rybářství. Tyto

druhy mohou být rozlišitelné jejich radulární morfologií, ale jejich externí charakteristické rysy jsou tak podobné, že jsou shrnuty pod národním jménem “piquilhue“ a jsou v národních rybářských statistikách registrovány pouze pod druhem *A. ancilla* (Urrea et al., 2007). Radulární morfologie a charakteristické rysy ulit těchto dvou druhů byly analyzovány pomocí geometricko - morfometrických metod. Výsledky odhalily, že druhy lze rozlišit na základě celkového tvaru ulit a tělesné hmotnosti. *Adelomelon ancilla* má vyšší spirálu a menší otvor ulity než *O. magellanica*, která má celkově kulovitější tvar a je těžší (Urrea et al., 2007). Tradiční morfometrika ukázala, že rozdíly tvarů ulit jsou hlavně mezi vzdáleností otvoru ulit a spirálovou vzdáleností, která je delší u *A. ancilla* než u *O. magellanica*. Externí nalezené rozdíly jsou dostačující k tomu, aby byly druhy snadno rozlišitelné (Urrea et al., 2007).

Další studií na determinaci druhů byla práce, která pomocí geometrické morfometrie hledala determinační kritéria u druhů *Littorina saxatilis* (Olivi, 1792), *L. compressa* (Jeffreys, 1865) a *L. arcana* (Hannaford & Ellis, 1978). Tito morfologicky velice podobní plži, běžní pro přílivové oblasti Evropy, představovali velký problém pro druhové určení. V tomto případě byla na druhovou determinaci použita DFA. Metoda DFA dokázala velmi bezpečně (na 96 %) druhy od sebe rozlišit (Conde-Padin P. et al., 2007).

1.8. Cíle práce

Prostřednictvím statistických výpočtů, tradiční a geometrické morfometrie jsem studoval 300 jedinců plže *Hexaplex trunculus* (Linné, 1758) ze tří lokalit chorvatského pobřeží. Jednalo se o tři na sobě nezávislé populace. Cílem výzkumu bylo:

- ▶ Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie pro určení rozdílů mezi pohlavími a určení vlastností jedinců se změnou pohlaví (imposex).
- ▶ Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi morfometricky.
- ▶ Porovnání tvaru ulit jedinců s rozdílným počtem sifonálních kanálků.

- ▶ Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi pomocí geometrické morfometrie.

- ▶ Určení rozdílů mezi pohlavími pomocí geometrické morfometrie.

2. Materiál a metody

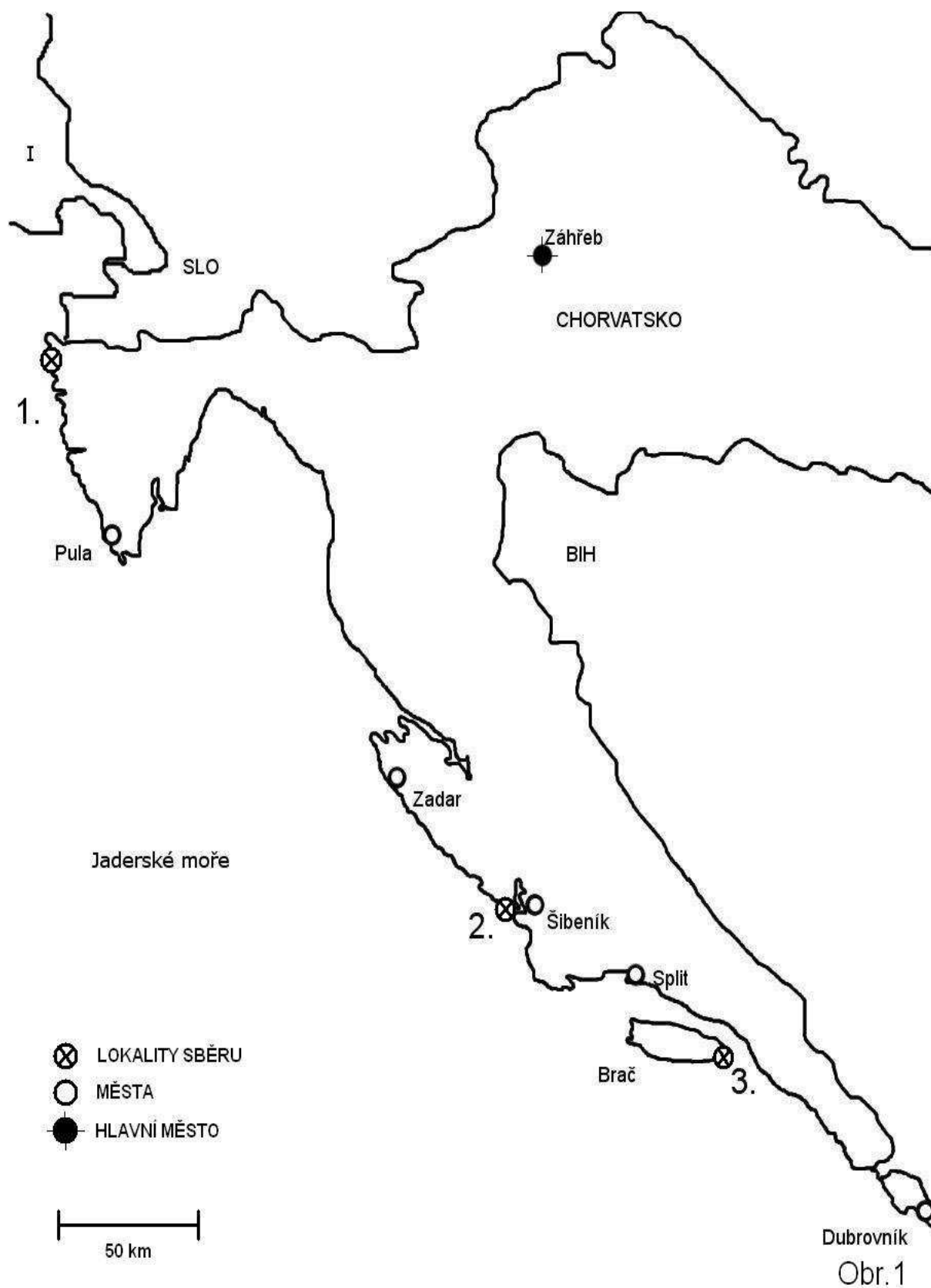
2.1. Popis lokalit sběru

Sběry byly prováděny na třech lokalitách Jaderského moře na Chorvatském pobřeží. Jaderské moře je dosti uzavřené. Je vnitřním mořem Středozemního moře, se kterým je spojeno Otrantským průlivem. Rozdělení Jadranu souvisí s jeho narůstající hloubkou od severu k jihu. Severní část, respektive Jadranský kontinentální šelf je pouhých 75 m hluboký a táhne se od Benátského zálivu až ke Středojadranskému příkopu, který je 266 m hluboký a přetíná Jadran Od Gargána na Italském pobřeží po Šibeník na Chorvatském pobřeží. Střední část Jadranu je rozlohou nejmenší. Rozprostírá se od Středojadranského příkopu po “ostruhu“ vyčnívající z Apeninského poloostrova. Zdejší hloubka nepřesahuje 160 m. Jižní část jaderského moře se nazývá Jadranská planina, která sahá od “ostruhy“ Itálie až po Otrantský průliv. Jižní část je nejhlubší s maximální hloubkou 1230 m. Délka jadranu je zhruba 800 km a šířka 170 km. Z důvodu jeho uzavřenosti a malého množství přítoků řek patří mezi nejslanější moře světa. Pouze salinita severní části je ovlivněna přítokem řeky Pád. Průměrná salinita Jaderského moře činí 38 ‰ (Mojetta, 2005).

První místo sběru byla Zambratija, ležící 5 km jižně od nejsevernějšího mysu Istrie (Obr. 1). Reliéf souše i dna se shodují. Plynule přechází jeden v druhý. Přílivová zóna nepřesahuje 0,75 m ostatně jako v celém Jaderském moři. Geologické podloží je vápencové. Sběr byl prováděn od 13.4. do 16.4.2007, kdy bylo jasno s teplotou vzduchu 23-26 °C. Viditelnost pod vodou byla zhruba 10 m, teplota moře 15 °C, termoklina ve 3 m. Sběr byl prováděn v zálivu místní pláže od přílivové zóny do hloubky 8 m. Ve větších hloubkách už nebyly ostranky nacházeny. Od přílivové zóny do hloubky 3 m je dno tvořeno menšími kameny, které jsou porostlé řasami *Acetabularia acetabulum*, *Padina pavonica*, *Corallina mediterranea*, *Ulva rigida*, houbou mycí (*Spongia officinalis*), žahavci *Actinia equina* a korýši *Chtalamus stellatus*. Mezi bentickými pohyblivými živočichy jsou zde hojní krabi *Maia squinado*, *Eriphia verrucosa* a *Pachygrapsus marmoratus*, sumýš *Holothuria tubulosa*, měkkýši *H. trunculus*, *Monodonta turbinata*, *Bolma rugosa*, *Gibbula umbilicalis*, *Gibbula divaricata*, *Haliotis tuberculata*, *Cerithium vulgatum*, *Protopecten glaber*, *Pecten jacobaeus*. Pelagickou faunu zastupují především ryby *Oblada melanura*, *Diplodus vulgaris*, *Sarpa salpa*. Od 3 m do 8 m se svažuje písčina, která je chudší na život. Ve vodním sloupci jsou hejna pražmanů zlatých (*Sarpa salpa*), dno je poseto ostrůvky posidonie (*Posidonia oceanica*) a je tady několik polí s kyjovkou šupinatou (*Pinna nobilis*). Ostranka (*H. trunculus*) je zde méně častá než na mělčině.

Zátoka v Sovlje, která je 5 km severně od Vodice, byla druhou lokalitou sběru (Obr. 1). Jedná se o Šibenickou riviéru. Sběr zde byl prováděn od 14.7. do 21.7.2007. Přesným místem sběru v zátocě byla severní část vstupu do zátoky. Reliéf dna je kaskádovitě prudce svažité do hloubky 20 m. Je zde vápencové podloží a kaskádu dna tvoří tři plošiny. První je ve třech metrech, druhá v deseti metrech a poslední tvoří dno, které je porostlé posidoníí (*Posidonia oceanica*). V době sběru bylo jasno a maximální teplota vzduchu se pohybovala od 30 do 35°C. Proudění je zde dosti silné, z důvodu vtoku a odtoku vody do zátoky vlivem přílivu a odlivu. Teplota moře byla 25 °C a viditelnost 15 m. Složení fauny a flory je zde takřka identické jako v Zambratiji. *H. trunculus* se vyskytoval od 1,5 m do 18 m hloubky a to téměř výhradně na plošinkách, kde se zahrabával do půlky ulity do písku.

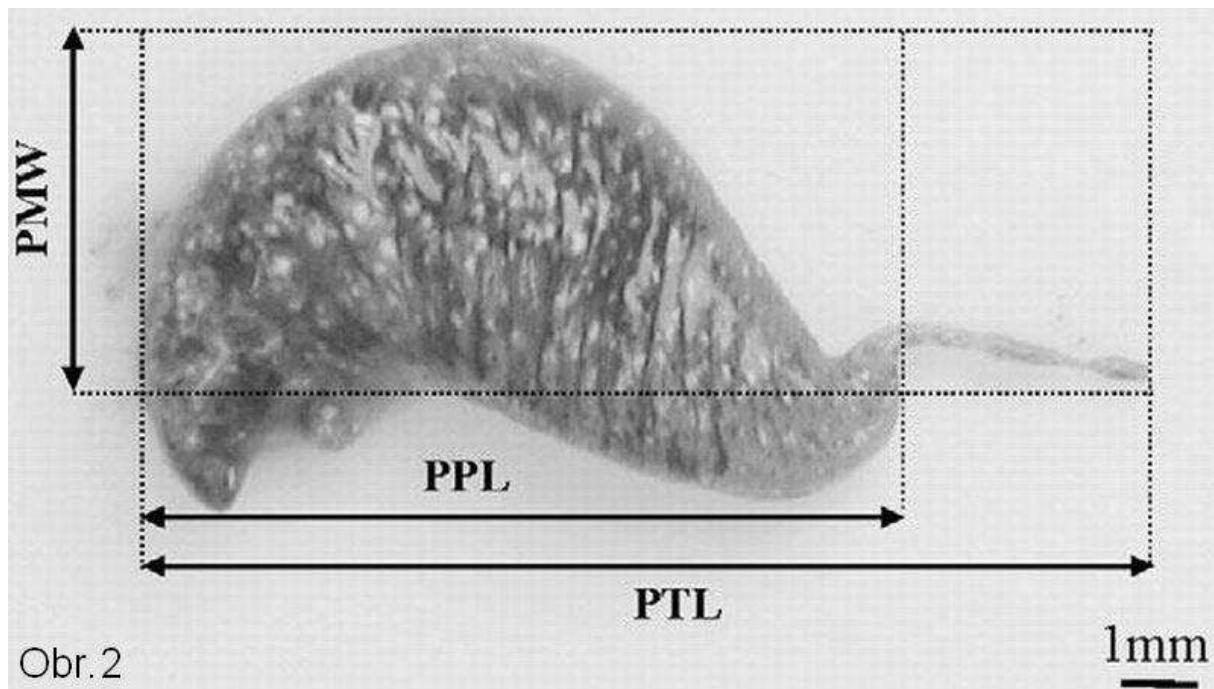
Třetím místem sběru byla zátoka pod kempem Manjana v Sumartinu na ostrově Brač (Obr. 1). Sběr byl započat 22.9.2007 a dokončen 1.10.2007. V tomto období nebylo možné tři dny sběry provádět, protože oblast byla vystavena bouřkám a silnému větru. Za přijatelného počasí pro sběr teploty dosahovaly ke 25 °C a při bouřce bylo 18 °C. Teplota moře se pohybovala od 17 do 20 °C. Viditelnost byla 20 m a proud žádný. Kamenité dno se rychle svažuje a volně přechází v písčité dno. Boky zátoky tvoří vápencové stěny, nebo prudké svahy poseté velkými kameny. Flora i fauna je zde velice rozmanitá. Z řas tu najdeme *Padina pavonica*, *Corallina mediterranea*, *Ulva rigida*, *Lithophyllum racemus*, *Pseudolithophyllum expansum*, *Sargassum vulgare*, *Fucus virsoides*, *Codium bursa*, *Valonia utricularis* a další. Živočišstvo je zde bohatší o četné chobotnice pobřežní (*Octopus vulgaris*), sumýše *Holothuria forskali*, houbu *Verongia aerophoba*, nahožábré plže *Discodoris atromaculata* žijící na houbě *Petrosia filiformis*. Velice četný je zde rypohlavec (*Bonellia viridis*), krab *Dromia personata* a ropušnice *Scorpaena porcus* a *S. notata*. *H. trunculus* se zde hojně vyskytoval od 2 m do 15 m.



Obr. 1: Mapa chorvatského pobřeží s vyznačenými lokalitami sběru vzorků. (1.) Zambratija; (2.) Sovlje; (3.) Sumartin.

2.2. Metody použité v terénním výzkumu a laboratoři

Výzkum je založen na souboru tří set jedinců náhodně odchycených na třech lokalitách Chorvatského pobřeží (viz výše). Sběry byly prováděny přístrojovým (Scuba diving) a volným potápěním (Freediving). Následně po odchytu byli jedinci uspáni v roztoku hexahydrátu chloridu hořečnatého. Roztok byl připravován smícháním 75g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ s jedním litrem sladké vody (lépe destilované) (Gibbs, 1999). Po dvou hodinách v roztoku byli jedinci uspáni. Měkké tělo živočicha šlo snadno povytáhnout z ulity. Pokud se tak nestalo, narkóza se prodlužovala do té doby, než byl plž uspán (Gibbs, 1999). U uspaného jedince pak bylo zjištěno pohlaví povytažením nohy z ulity. Pokud bylo pohlaví samčí nebo imposexem postižené samice, byly dále měřeny jejich penisy (PPL = “penis partial length“ = délka penisu bez distální části; PMW = “penis maximum width“ = maximální šířka penisu) (Obr. 2) (Vasconcelos et al., 2006). Dále byla odříznuta část nohy z oblasti hlavy a zafixována v etanolu, pro pozdější populačně genetický výzkum. Posléze byl jedinec usmrcen. Pitván byl pouze tehdy, když se jednalo o samici nebo imposexem postiženou samici. Důvodem byl stupeň postižení podle VDSI a dokonalé rozčlenění pohlaví na samice a imposex postižené samice. Narkóza byla prováděna za účelem zjištění pohlaví bez narušení či zničení ulity (Gibbs, 1999; Vasconcelos et al., 2006), která byla využívána pro morfometrická měření. První zjišťování pohlaví u *H. trunculus* bez jeho usmrcení (narkóza $MgCl_2$) bylo v roce 1999 Gibbsem. Narkóza byla použita i při určení pohlaví u *N. lapillus* (Gibbs, 1999; 2005). Experimentální narkóza na *H. trunculus* byla velmi úspěšná. Tento druh se ukázal být vysoce snášenlivý k narkotizování, ale efekt prodloužení penisu u něj byl též pozorován a to jak u samců, tak u imposexem postižených samic (Vasconcelos et al., 2006). Po anestézii dochází ke zvětšení PTL (Penis total length = celková délka penisu) o 19%. Tato délka nebyla v mojí práci měřena z důvodu nereálnosti změření distální části při terénním výzkumu. Pozdější výsledky měření v laboratorních podmínkách by nebyly z důvodu degradace tkáně správné. PPL (Parcial penis length = délka penisu bez distální části) se zvětšuje o 13% a PMW (penis maximum width = maximální šířka penisu) o 10% (Gibbs, 1999). Penis se špatně měří, protože to je svalovina (Gibbs, 1999). Narkóza způsobuje zvětšení tkáně penisu u všech Neogastropoda (Vasconcelos et al., 2006). Při srovnání určení pohlaví zabitím a uspáním bylo zjištěno, že usmrcením živočicha bylo určeno správně 95% jedinců, ale při uspání živočicha též 95% jedinců (Vasconcelos et al., 2006). Dříve se používala pouze pitva na zjištění pohlaví a s tím související usmrcení živočicha, ale dnes stačí jen živočicha uspat (Vasconcelos et al., 2006).



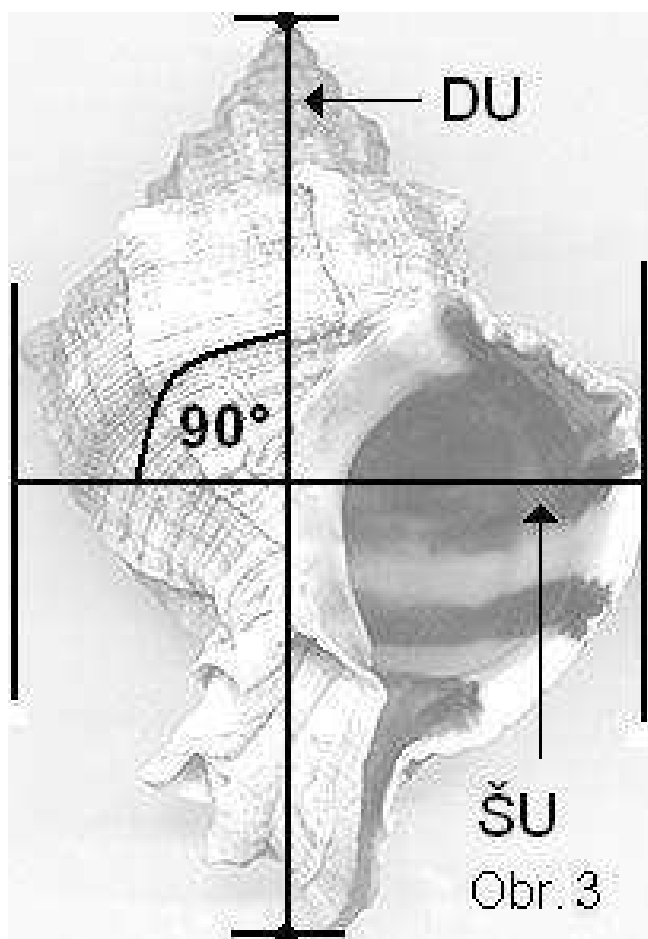
Obr. 2: Zvětšený samčí penis plže druhu *H. trunculus* s vyznačenými délkami pro měření. PPL = “penis partial length“ = délka penisu bez distální části; PMW = “penis maximum width“ = maximální šířka penisu; PTL = “penis total length“ = celková velikost penisu. (Obdázek byl převzat a upraven od Vasconcelos et al., 2006)

Po převozu z terénní části výzkumu byly vzorky dále zpracovávány v laboratoři Přírodovědecké fakulty (dříve Biologické fakulty) v Českých Budějovicích v pavilonu B. Ulity plžů byly očištěny potravinářským osmiprocentním octem a sladkou vodou od řas, hub, nánosů vápenatých usazenin a živočichů, kteří využívali ulity plžů jako své životní útočiště. Nejvíce byly ulity *H. trunculus* osidlovány mnohoštětinatci. K nejpočetněji zastoupeným čeledím mnohoštětinatců přisedlých na ulitách plžů byly Spirorbidae, Serpulidae, Sabellidae. Vasconcelos et. al., v roce 2007 uveřejnil práci zabývající se problematikou osidlování ulit *H. trunculus* mnohoštětinatci. Čištění ulit je důležité proto, aby při geometricko-morfometrickém měření nedocházelo k chybám. U ulit značně znečištěných schránkami mnohoštětinatců někdy docházelo ke zborcení vrchní části spirály, ale nikdy ne tak, aby nemohla být použita v geometrické- morfometrii.

Úroveň postižení imposexem byla stanovena pomocí VDSI (vas deferens sequence index), který se stanovuje vizuálně (Gibbs, 1991; Axiak, 1995). Jednotlivé fyziologické stavy jsou v tabulce (Tab. 2) (viz podkapitola 1.2.). Při stupni nula a jedna podle VDSI se musela provést pitva (penis u imposexem postižených samic ještě není vyvinut nebo je malý, ale vyvíjí se chámovod) (Gibbs, 1999). Stupeň postižení byl zjišťován pouze do třetího stádia, kvůli geometricko-morfometrickému měření. Úroveň postižení nebyla hlavním tématem tohoto výzkumu.

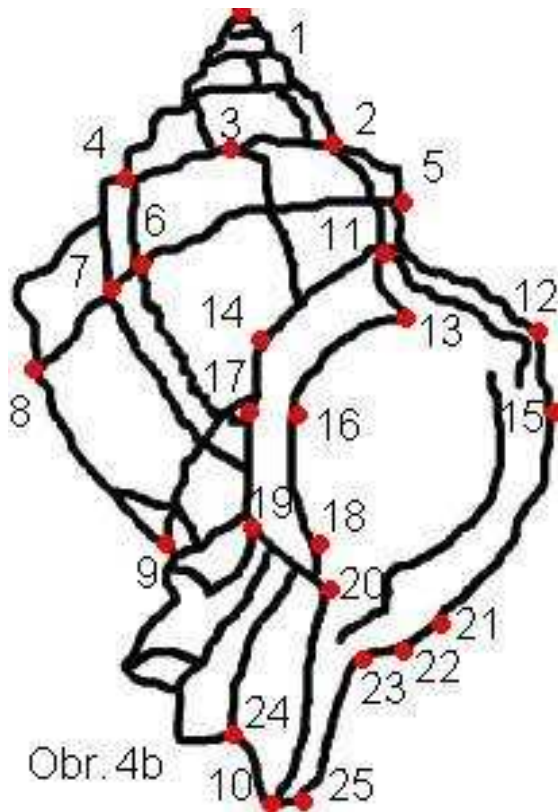
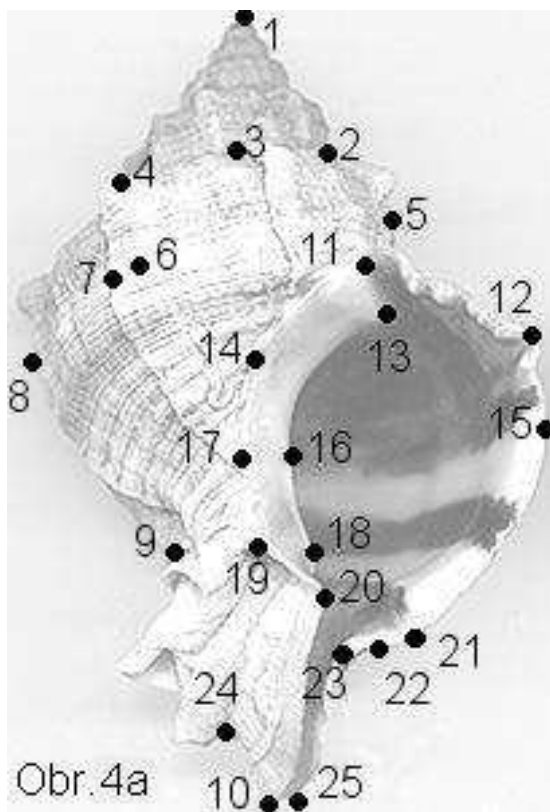
2.3. Statistické, morfometrické a geometricko-morfometrické metody

Po vyčištění ulity byly měřeny dvě délky: **DU** = délka ulity (délka mezi nejvzdálenějšími částmi ulity; mezi vrcholem ulity a sifonálním kanálkem); **ŠU** = šířka ulity (nejširší část ulity; délka kolmá na **DU**) (Obr. 3). Vzdálenosti byly měřeny posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.



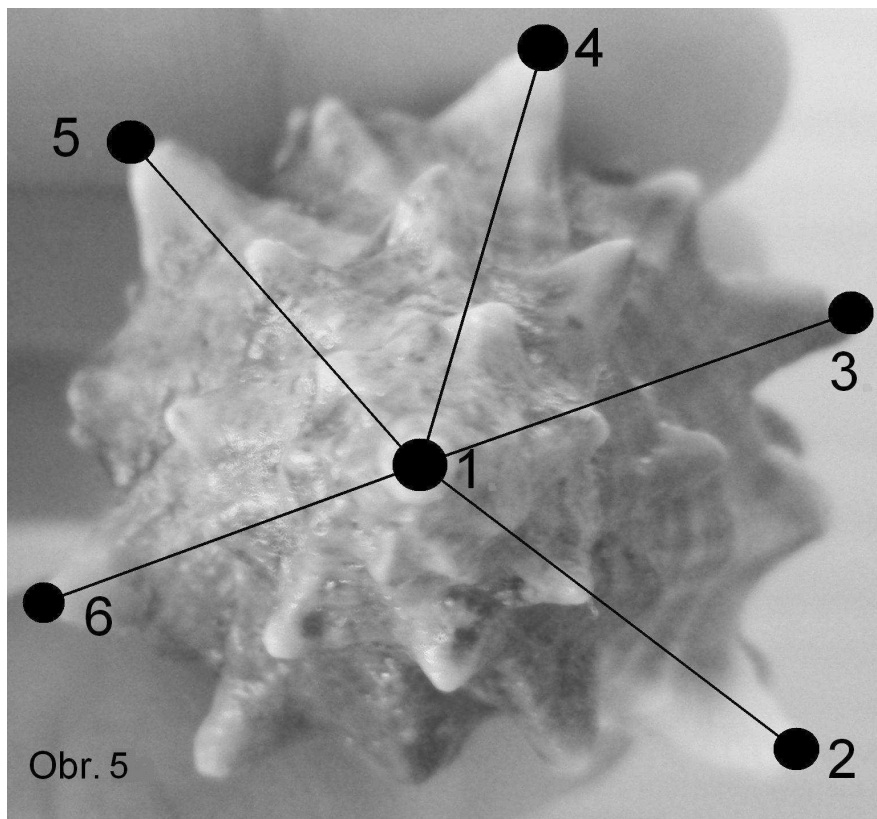
Obr. 3: Ulita *H. trunculus* s vyznačenými délkami **DU** = délka ulity a **ŠU** = šířka ulity.

Ulity byly dále vyfotografovány z ventrálního pohledu a z pohledu kolmého na vrchol ulity. Použit byl fotoaparát Olympus μ 780. Fotografie byly uloženy ve formátu JPEG. Za pomoci program tpsUtil (Rohlf, 2008) byly fotografie převedeny do digitální verze ve formátu TPS, což je potřebné pro další operace v geometricko morfometrických programech. Pomocí programu tpsDig (Rohlf, 2006) byla získána souřadnicová data (x,y) použitých landmarků (Obr. 4a;b). Mezi landmarky použitými na náhledu na spirálu byl zjištěn úhel pomocí téhož programu. Úhly byly měřeny mezi posledními čtyřmi nárůstovými liniemi (Obr. 5).



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

Obr. 4b: Použité landmarky na schématickém nákresu tvaru ventrální strany ulity u plže *H. trunculus*. (Popis landmarků viz obr. 4a)



Obr. 5: Náhled kolmo na spirálu plže *H. trunculus* s vyznačenými landmarky pro měření úhlů. **1** = vrchol ulity; **2** = vrchol poslední nárůstové linie patrového návalku; **3** = vrchol předposlední nárůstové linie patrového návalku; **4** = vrchol třetí nárůstové linie patrového návalku; **5** = vrchol čtvrté nárůstové linie patrového návalku; **6** = vrchol páté nárůstové linie patrového návalku.

Pomocí programu Relative warps (Rohlf 2007a) byla upravena souřadnicová data stanovením průměrné tangenciální konfigurace prokrustovskou superpozicí. Tentýž program vypočetl matice deformačních energií a uniformní změny tvaru: **Uni X**; **Uni Y**. Pomocí programu tpsRegr (Rohlf, 2007b) byly zjištěny geometrické velikosti ulit. Statistické výpočty a grafy byly provedené a zhotovené v programu STATISTICA 8 (StatSoft, 2007). Obrázky použité v této práci byly zhotovené a upravované v programu GIMP 2 (GNU Image Manipulation Program, 2008).

Pro porovnání tvaru ulit plžů *Hexaplex trunculus* byly použity analýzy pro mnohorozměrná data DFA a jednocestná analýza variance (one way ANOVA, Wilks test). Při Diskriminační analýze (DFA) musela být provedena Bonferroniho korekce hladiny významnosti, protože bylo použito více srovnání. Počáteční hodnota přijatelné chyby 1. druhu byla vydělena počtem párových srovnání (pro 3 populace $\alpha = 0,05/3 = 0,0166$) Mnohorozměrná data byla získána z analýzy relativních deformací (RWA), která je založena na matici deformačních energií (1X až UniY). Výpočet relativních deformací byl proveden

v programu Relative warps (Rohlf 2007a). Změny tvarů ulit v analýzách lokalit a pohlaví byly vizualizovány v programu tpsRegr (Rohlf, 2007b).

Nejprve byla na ulitách studována variabilita mezi populacemi a poté variabilita mezi jednotlivými kategoriemi pohlaví (samci, samice, imposexem postižené samice). Dále byly za pomoci jednocestné analýzy variance (one-way ANOVA) určeny rozdíly v tvaru ulit mezi pohlavími a určeny vlastnosti jedinců se změnou pohlaví (imposex). Druhá jednocestná analýza variance byla provedena za účelem zjistit změny tvaru ulit mezi zkoumanými lokalitami. Třetí jednocestná analýza variance byla vypočítána pro zjištění tvaru ulit z jednotlivých nárůstových linií, které byly zjištěny podle počtu zřetelně viditelných sifonálních kanálků okolo píštěle. Data poskytující informace o počtech jedinců s pohlavím samčím, samičím a imposexem postižených samic na jednotlivých lokalitách jsou v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3: Počty jedinců jednotlivých pohlaví v příslušných lokalitách. Lokalita Zambratija je nejsevernější a lokalita Sumartin nejjižnější.

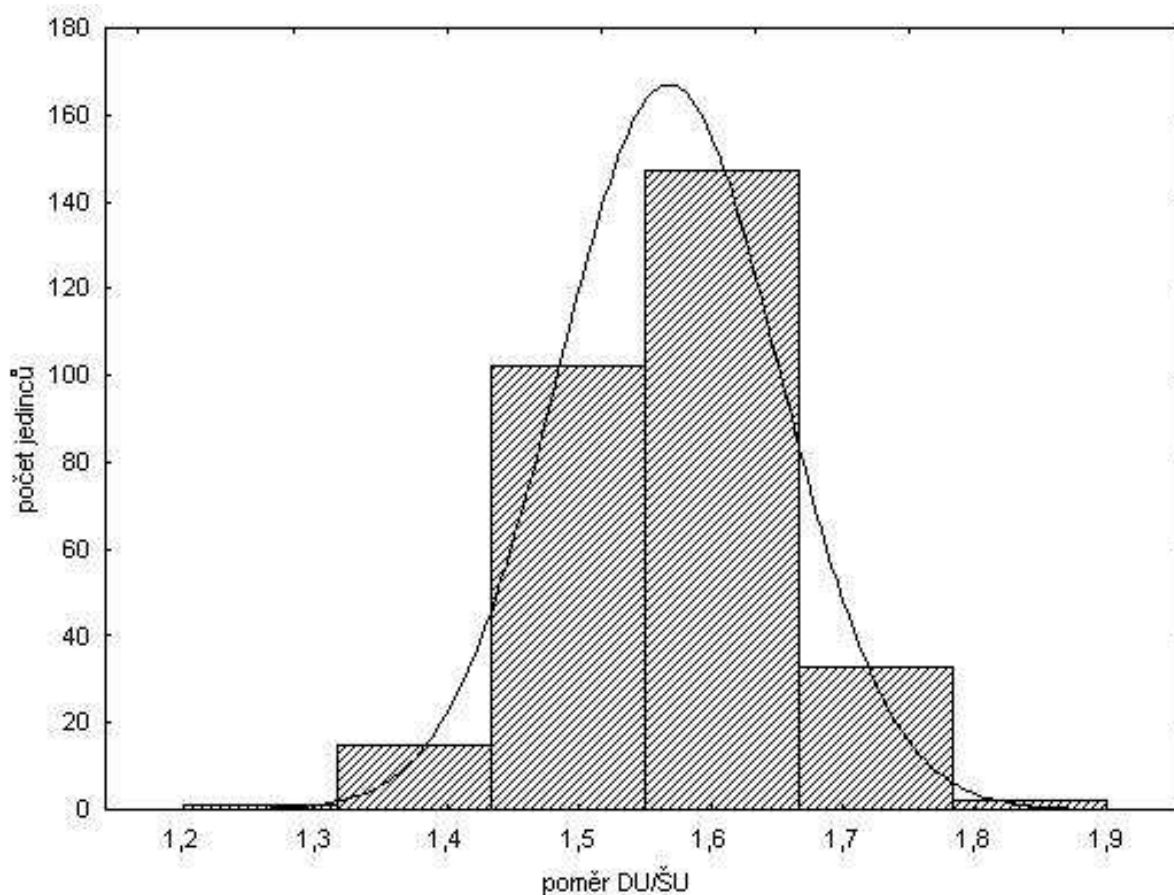
Lokalita	Samci	Samice	Imposex
Zambratija	11	45	44
Sovlje	37	0	63
Sumartin	43	32	25

3. Výsledky

3.1. Tradiční morfometrie

3.1.1. Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie pro určení rozdílů mezi pohlavími a určení vlastností jedinců se změnou pohlaví (imposex)

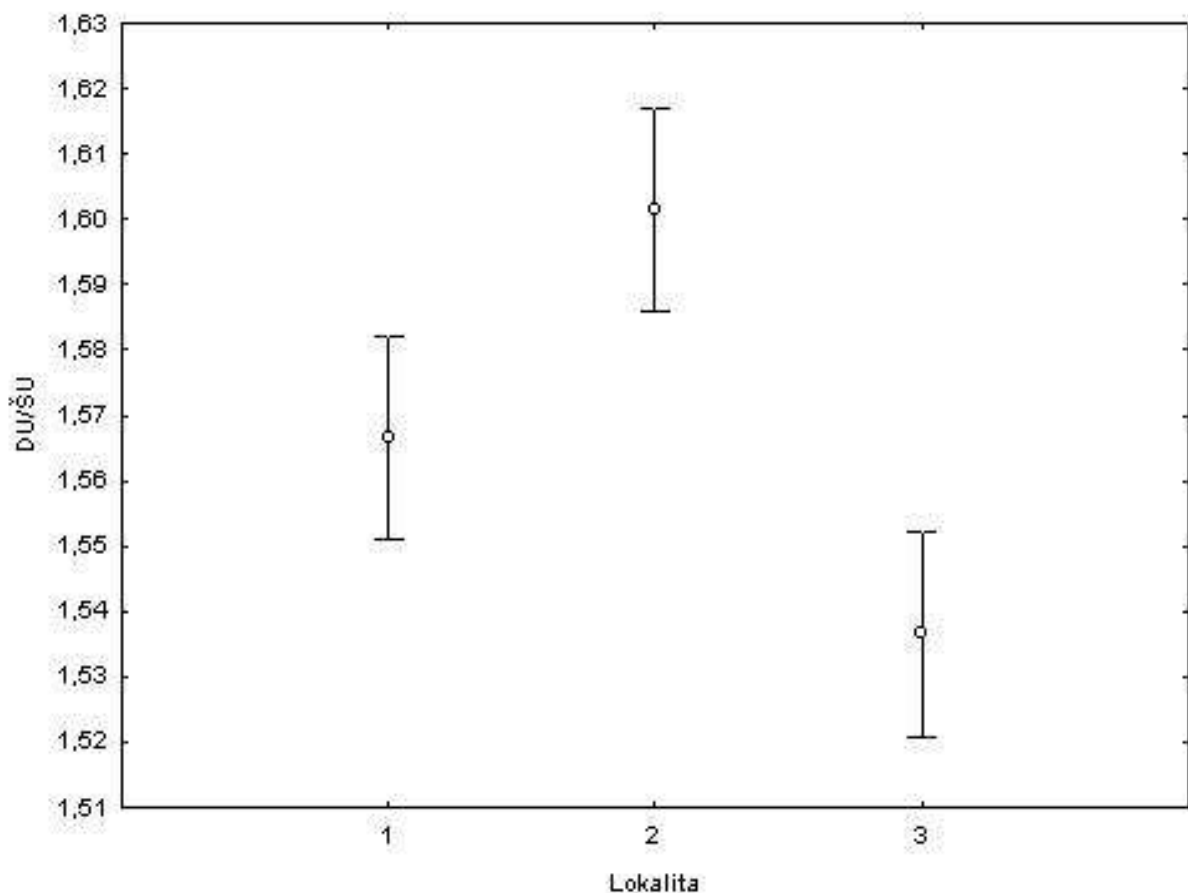
Poměr délky a šířky ulit (DU/ŠU), který má normální rozdělení (Obr. 6), byl zkoumán jednocestnou analýzou variance (one-way ANOVA). Touto metodou byl hledán rozdíl v tvaru ulit plže *Hexaplex trunculus* mezi jednotlivými kategoriemi pohlaví - zda existují rozdíly mezi pohlavími a imposexem postizenými samicemi. Výsledek byl neprůkazný na hladině pěti-procentní významnosti se dvěma stupni volnosti, hodnota F-statistiky se rovnala 0,44. Podle tohoto jednoduchého parametru nelze pohlaví a postižení rozeznat.



Obr. 6: Rozdělení poměru délky a šířky ulit (DU/ŠU) s proloženým normálním rozdělením.

3.1.2. Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi morfometricky

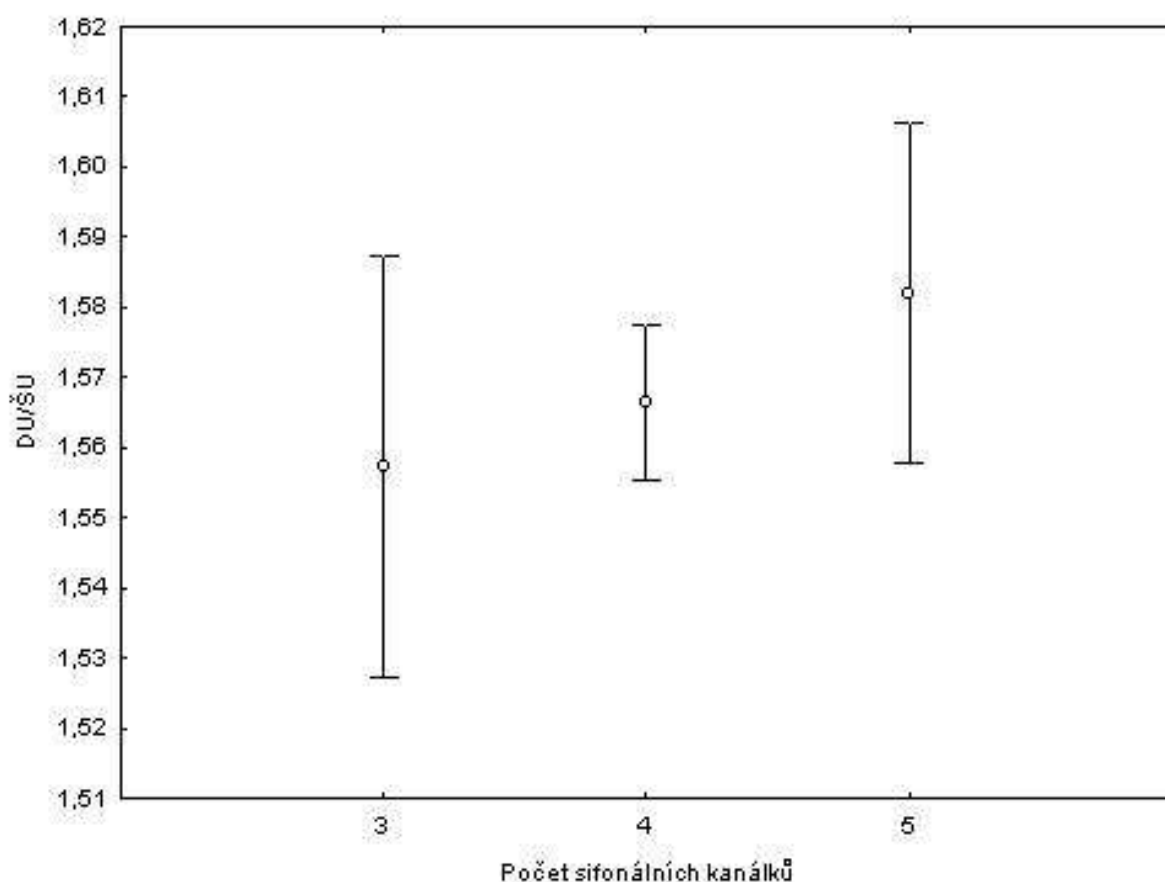
Vliv lokality a tím případně zeměpisné šířky na tvar ulity (poměr DU/ŠU; jednocestná analýza variance, kategoričká proměnná lokalita) byl statisticky průkazný při vysoké hodnotě F-statistiky ($F_2 = 16,7$) a hladině signifikance $P < 10^{-5}$. Lokality mají vliv na tvar ulit plžů *Hexaplex trunculus* (Obr. 7). Podle Tukeyho testu byl tvar ulit mezi kterýmikoliv dvěma lokalitami odlišný. Na druhé lokalitě sběru, kde nebyla sebrána ani jedna nepostižená samice, byl poměr DU/ŠU nejvyšší.



Obr. 7: Geografické rozdíly v poměru délky a šířky ulity (DU/ŠU). Zakresleny jsou průměry poměrů s vyznačeným 95% konfidenčním intervalem pro jednotlivé lokality - viz Obr. 1. (1 Zambratija; 2 Sovlje; 3 Sumartin).

3.1.3. Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie

Tvarové změny byly vypočítávané pomocí jednocestné analýzy variance (parametry $DU/\bar{S}U \cdot \text{Počet sifonálních kanálků}$). Na každé uliti jsem zjistil počet zřetelně viditelných sifonálních kanálků ležících v úhlu od 0° (okraj vnějšího pysku) do 245° proti směru růstu ulity. Tyto sifonální kanálky se stáčíjí okolo pístěle. Jedná se o nejmladší plžem právě používaný sifonální kanálek a 2 až 5 starých. Analýza souvislosti tvaru ulit s počtem kanálků (3, 4 nebo 5) jako kategoričnou proměnnou vyšla neprůkazně (Obr. 8.). Počet sifonálních kanálků 6 nebyl zařazen do analýzy z důvodu malého počtu vzorků (3 jedinci).



Obr. 8: Tvarové změny ulit v souvislosti s počtem sifonálních kanálků byly nevýznamné (průměry poměrů $DU/\bar{S}U$ s vyznačeným 95% konfidenčním intervalem).

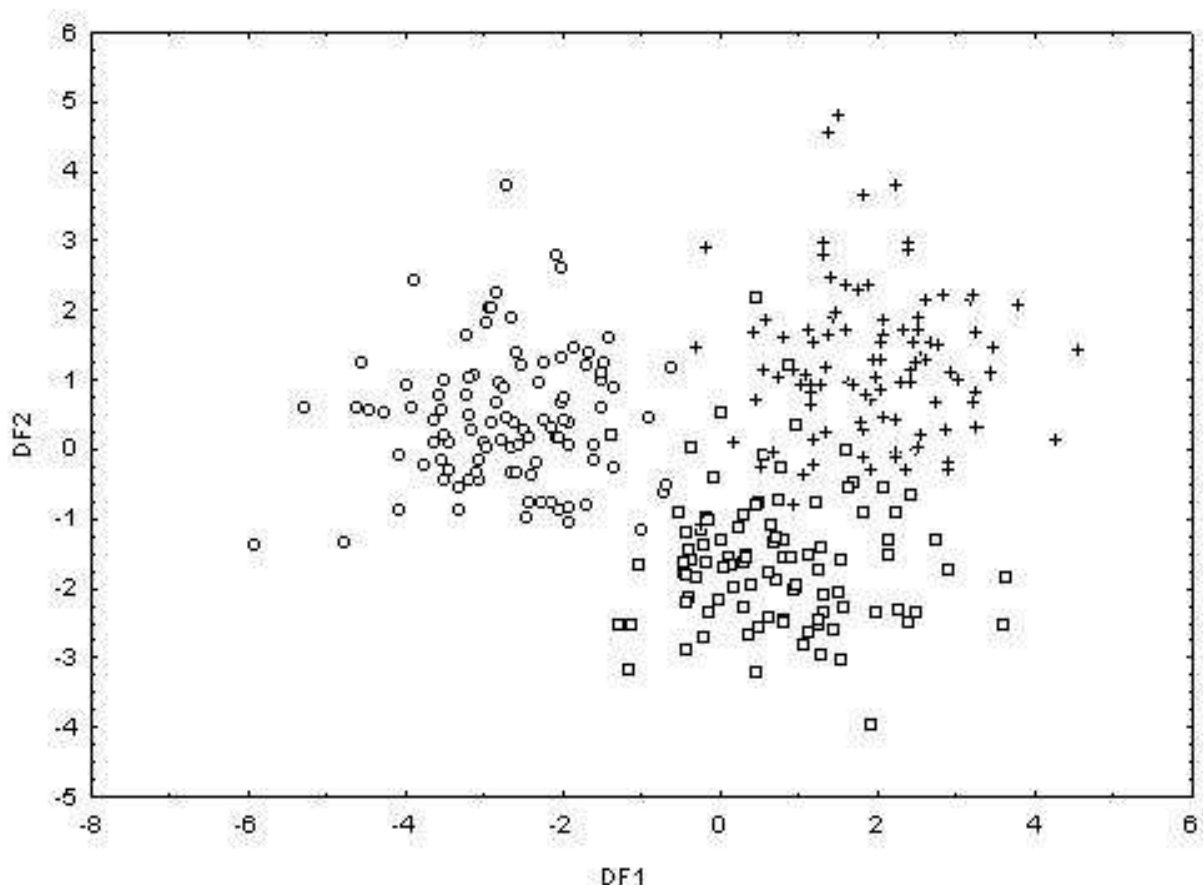
3.2. Geometrická morfometrie

3.2.1. Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi pomocí geometrické morfometrie

Za pomoci programu Relative warps (Rohlf 2007a) byla vypočtena matice deformačních energií 1X až Uni Y, která byla použita jako mnohorozměrný geometrický parametr tvaru ulit plžů *H. trunculus*. Deformační energie (viz. Podkapitola 1.6.).

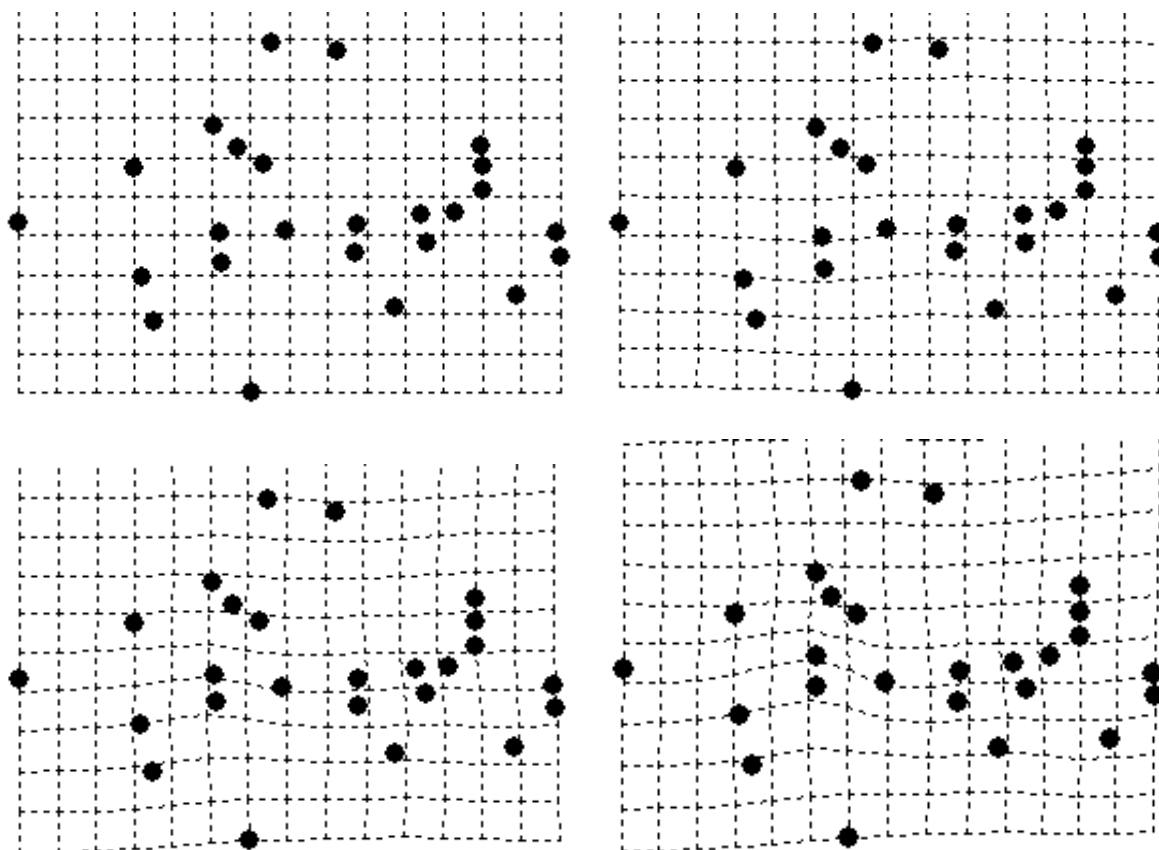
Tvarové rozdíly mezi populacemi hledané na základě parametrů 1X až UniY byly výrazné a signifikantní $F = 13,4$ a $P < 10^{-5}$.

Pro vizualizaci oddělení populací byla použita diskriminační metoda DFA, která úspěšně od sebe populace oddělila na 94% (Obr. 9). Musela zde být použita Bonferroniho korekce hladiny významnosti, která se pro 3 párová pozorování (3 lokality) rovnala $\alpha = 0,016$. Hladina P byla u všech párových pozorování menší 10^{-5} .



Obr. 9: Úspěšné oddělení jedinců *H. trunculus* ze tří lokalit (○ Zambratija; □ Sovlje; + Sumartin) podle geometricko-morfologických proměnných a pomocí diskriminační analýzy (DFA; 94%).

Vizualizace tvarových změn provedená v programu tpsRegr (Rohlf, 2007b) ukazuje rozdíly v tvaru ulit na jednotlivých lokalitách. Vyobrazený je zde konsensuální tvar pro 300 jedinců (Obr. 10, 11; vlevo nahoře), průměrný tvar jedinců z nejsevernější lokality Zambratija (Obr. 10, 11; vpravo nahoře), průměrný tvar jedinců z lokality Sovlje (Obr. 10, 11; vlevo dole) a průměrný tvar jedinců z nejjižnější lokality Sumartin (Obr. 10, 11; vpravo dole).



Obr. 10: Konsensuální tvar (vlevo nahoře), Zambratija (vpravo nahoře), Sovlje (vlevo dole), Sumartin (vpravo dole).

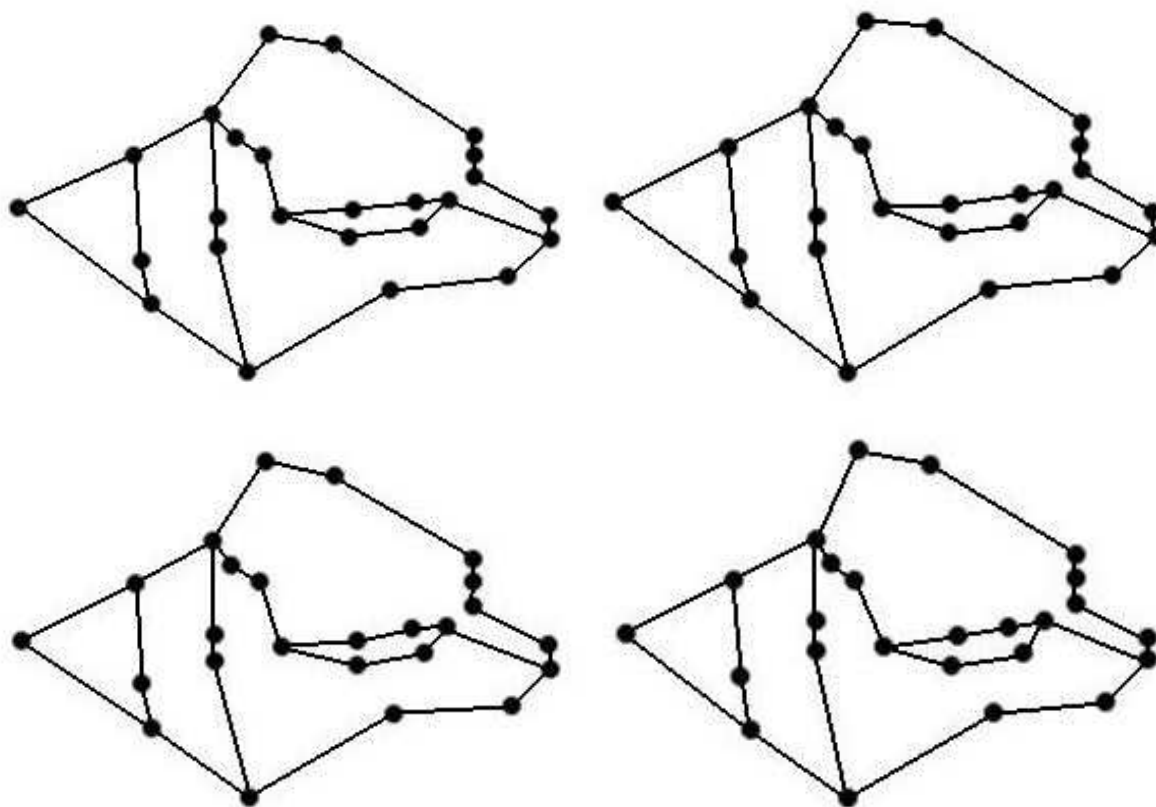
Jedinci z lokality Zambratija nemají žádné vnější extrémity (trny), které jsou většinou na ulitách situované na okrajových partiích, kterým přísluší landmarky L5, L8, L12, L15, L21, L22, L23 (Obr. 4a, b; podkapitola 2.3.). Jedinci z této lokality sběru vykazují nárůst šířky bazální části ulity a celkově jsou jejich ulity mírně širší než konsensuální tvar. V ostatních parametrech nevykazují žádné odlišnosti od konsensu.

Oproti konsensu a jedincům ze zbylých dvou lokalit sběru mají celkově užší tvar ulity z prostřední lokality Sovlje. Bazální část ulity a obústí je také užší než konsensuální tvar. U některých jedinců z této populace dochází již k vytváření zřetelně viditelných vnějších

extrémních výrůstků, ale nedochází zde k takovým nárůstům, které jsou typické pro populaci z nejnižnější lokality Sumartin.

Populace z nejnižnější lokality sběru Sumartin má ulity nejširší, právě díky výrazným extrémním tvarům. Totéž platí pro obústí a bazální část ulity. Sifonální kanálek má tendenci se stáčet doprava, když bychom se podívali na náhled kolmo na obústí, kde jsou vrchol ulity a sifonální kanálek ve vertikálním směru. Sifonální kanálek je zřetelně prohnutý. Tato změna v tvaru není typická pro dvě předešlé populace (Zambratija, Sovlje).

Velké změny ve tvaru u těchto populací se nacházejí v horní části obústí. Jedná se o oblast ulity mezi landmarky L5; L11; L13 (Obr. 4a, b; podkapitola 2.3.). Všechny zkoumané populace se od sebe v tomto ohledu výrazně liší.

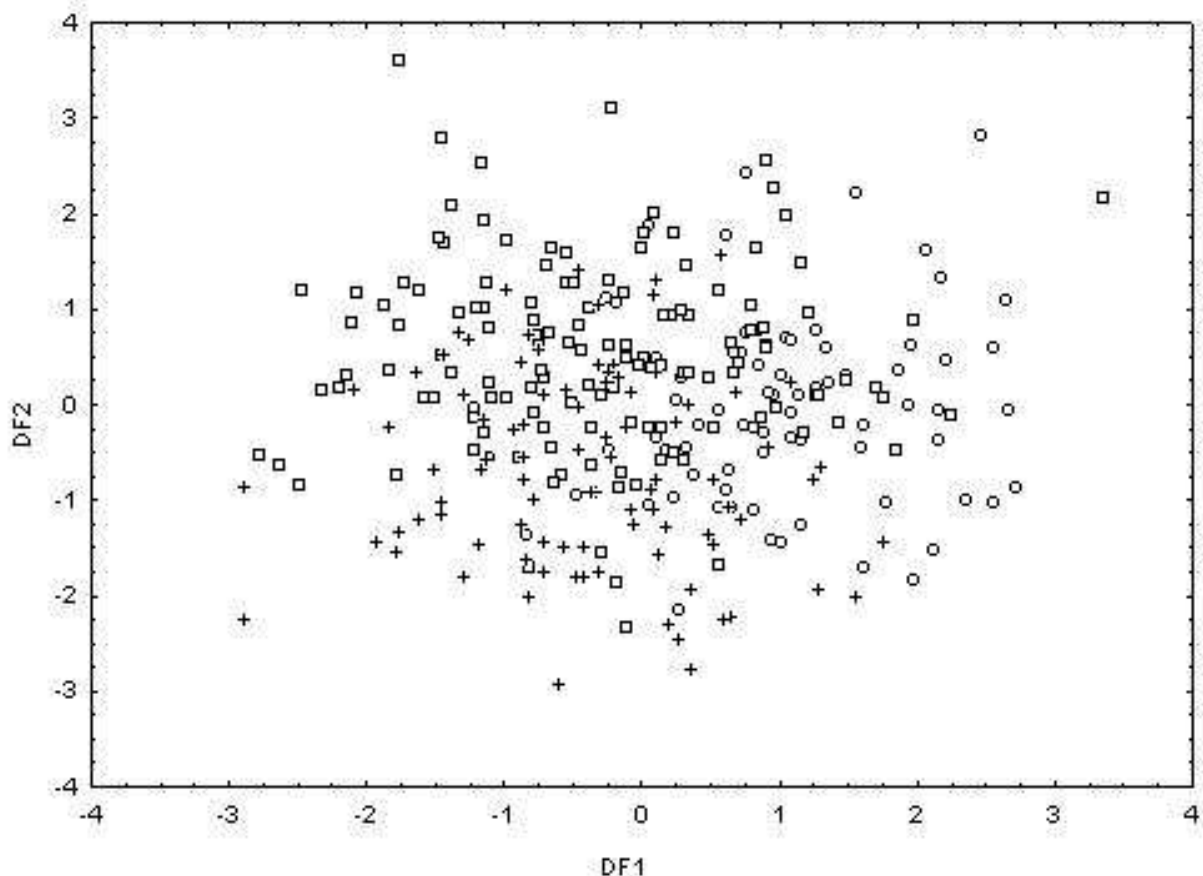


Obr. 11: Konsensuální tvar (vlevo nahoře), Zambratija (vpravo nahoře), Sovlje (vlevo dole), Sumartin (vpravo dole).

3.2.2. Určení rozdílů mezi kategoriemi pohlaví pomocí geometrické morfometrie

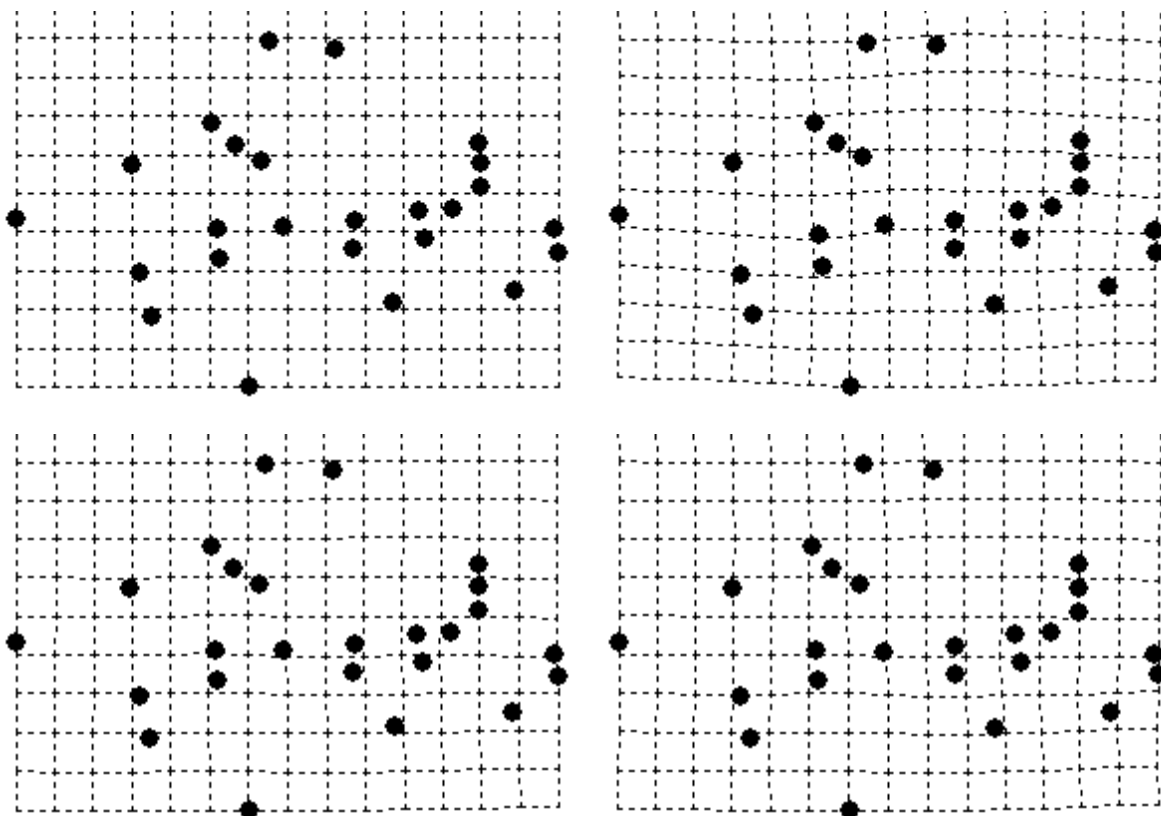
Tvarové rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi pohlaví hledané pomocí geometricko-morfometrických parametrů 1X až UniY byly statisticky významné $F = 1,75$ a $P < 10^{-5}$, ale prakticky vizuálně nezřetelné.

Vizualizace pro oddělení jednotlivých kategorií pohlaví pomocí DFA byla neprůkazná. Úspěšnost analýzy byla pouhých 64% (Obr. 12). Bonferroniho korekce hladiny významnosti byla $\alpha = 0,016$. Hladina významnosti byla pouze pro P imposex/samci vyšší než námi snížená hladina významnosti. Je zde tedy jasný celkový trend ve tvaru, ale překryv hodnot jedinců je příliš velký na praktické odlišování pohlaví podle těchto parametrů. Významným poznatkem je, že imposexem (maskulinizací) postižené samice byly tvarově více „samčí“ než „samičí“.



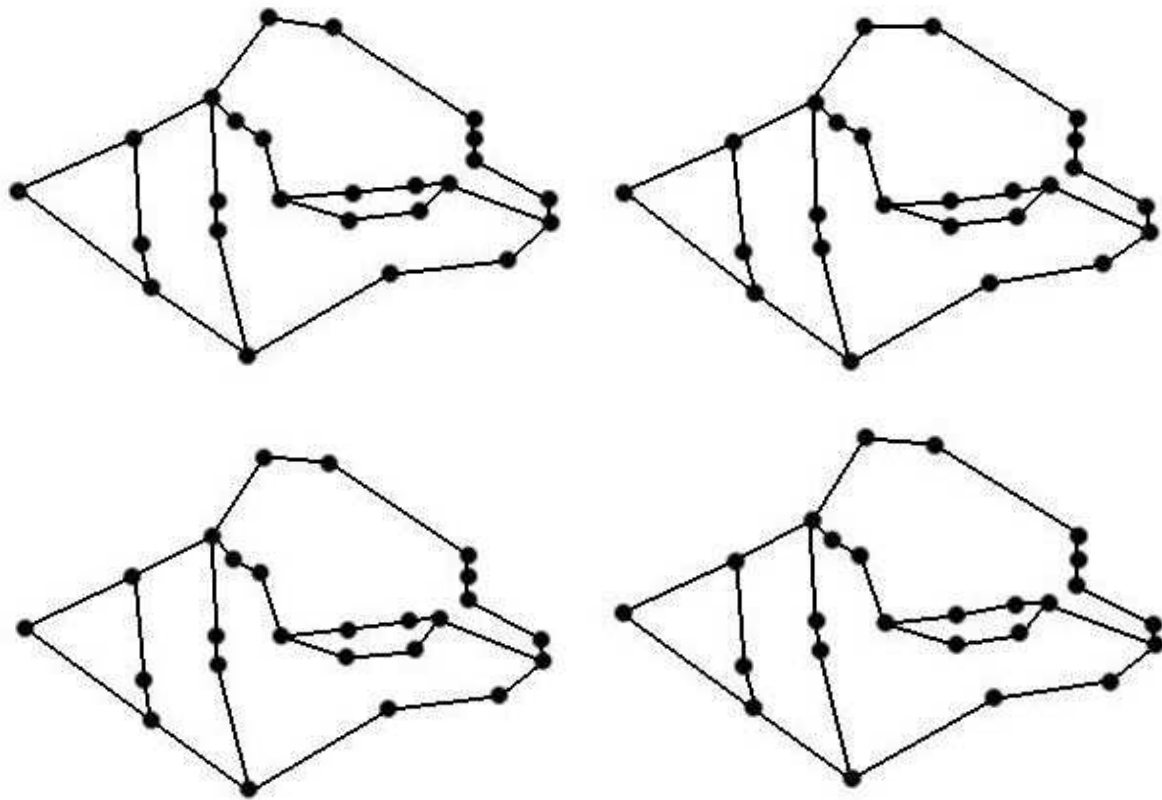
Obr. 12: Oddělení jednotlivých pohlaví *H. trunculus* (○ samice; □ imposex; + samci) podle geometricko-morfologických proměnných a pomocí diskriminační analýzy (DFA; 64%).

Vizualizace tvarových změn provedená v programu tpsRegr (Rohlf, 2007b) ukazuje rozdíly v tvaru ulit mezi jednotlivými pohlavími. Vyobrazený je zde konsensuální tvar pro všechna pohlaví (Obr. 13, 14; vlevo nahoře), průměrný tvar samic (Obr. 13, 14; vpravo nahoře), průměrný tvar samic postižených imposexem (Obr. 13, 14; vlevo dole) a průměrný tvar samců (Obr. 13, 14; vpravo dole).



Obr. 13: Konsensuální tvar (vlevo nahoře), Samice (vpravo nahoře), Imposex (vlevo dole), Samci (vpravo dole).

Na obrázku výše je slabě viditelný rozdíl mezi samicemi, samci a samicemi postiženými imposexem. Tvar samicích ulit je celkově širší a tvar obústí je také širší než u jedinců zbylých dvou kategorií. Kategorie pohlaví samci a imposexem postižené samice se velmi podobají konsensuálnímu tvaru pro všechna pohlaví. Tvar jejich ulit se téměř shoduje. Jediná odlišnost na ulitách těchto dvou kategorií pohlaví je viditelná v bazální část ulity, kterou mají samci širší. Jedná se o tvarové změny na ulitách, které jsou v bazální části reprezentované landmarky L9, L14, L16, L17, L18, L19, L20 (Obr. 4a, b; podkapitola 2.3.). Obústí u samčích ulit a u ulit samic postižených imposexem jsou téměř identická.



Obr. 14: Konsensuální tvar (vlevo nahore), Samice (vpravo nahore), Imposex (vlevo dole), Samci (vpravo dole).

4. Diskuse

4.1. Kategorie pohlaví

4.1.1. Porovnání tvaru ulit pomocí tradiční morfometrie pro určení rozdílů mezi pohlavími a určení vlastností jedinců se změnou pohlaví (*imposex*)

Tvarové změny na ulitách plže *Hexaplex trunculus* nesouvisejí s pohlavním dimorfismem podle výpočtů tradiční morfometrie pro obvykle užívaný parametr poměru délky a šířky ulity. Moje domněnka o tom, že na ulitách jsou jistá kritéria, která od sebe oddělí samce a samice, nebyla potvrzena touto metodou. Z tohoto důvodu mohu potvrdit, že pohlaví se musí určit buď usmrcením jedince a následnou pitvou (Vasconcelos et al., 2006) nebo uspáním jedince a jeho povytažením z ulity, aby byl vidět samcův rozmnožovací aparát, či zmenšený a barevně odlišný penis u *imposex*em postižených samic, nebo zda se jedná o samici (Gibbs, 1999). Stejně nepoužitelná byla následná geometricko–morfometrická analýza (viz. podkapitola 4.1.2.). Ani vztah mezi počtem viditelných sifonálních kanálků a poměru délky a šířky ulity DU/ŠU nebyl průkazný.

Nasbírané vzorky nevykazovaly poměr pohlaví 1:1. Samičí pohlaví, ke kterému v tomto případě počítám i postižené samice *imposex*em, bylo početnější než samčí. Potvrdilo se tak tvrzení Fretter & Graham (1994), že všechny druhy řádu Neogastropoda mají poměr pohlaví nerovný a počet samic v populaci je vždy vyšší než samců.

4.1.2. Určení rozdílů mezi kategoriemi pohlaví pomocí geometrické morfometrie

Mírné pohlavní rozdíly byly na ulitách *H. trunculus* zjištěny pomocí metod geometrické morfometrie. Jednocestná analýza variance prokázala existenci tvarových změn na ulitách, ale následná Diskriminační analýza, která měla od sebe pohlaví co nejlépe oddělit, byla úspěšná pouze na 64% (Obr. 12, podkapitola 3.2.2.). Tento výsledek nám nedává jasná kritéria, podle kterých bychom při odběru vzorků v terénu mohli jasně od sebe pohlaví oddělit. Pro přesné oddělení pohlaví doporučuji používat metodu popsanou Gibbem (1999), při které živočicha pro určení pohlaví nemusíme usmrcovat, ale stačí ho jen uspat, nebo použít druhou metodu, při které musíme živočicha usmrtit a poté pitvat (Vasconcelos et al., 2006).

Z vizualizace výsledků, pomocí geometricko – morfometrických programů, je slabě vidět rozdíl mezi samicemi a zbývajícími dvěma kategoriemi pohlavími (samci a samice

postižené imposexem). Tvar samičích ulit je celkově širší a tvar obústí je také širší než u samců a samic postižených imposexem. Tyto dvě kategorie se velmi podobají konsenzuálnímu tvaru pro všechna pohlaví. Samčí tvar ulit a tvar ulit samic postižených imposexem se téměř shodují až na bazální část ulity, kterou mají samci širší. Obústí u samčích ulit a u ulit samic postižených imposexem jsou téměř identická.

Z tohoto pohledu je zjevné, že pohlavní rozdíly na ulitách existují, ale nejsou tak velké, abychom tyto tvarové změny mohli brát jako kritérium pro určení jednotlivých pohlaví či kategorií. Navíc analýza neprokázala jasné oddělení samců od samic postižených imposexem. Mohu tak tvrdit, že při maskulinizaci samic vlivem škodlivých polutantů uvolňujících se z antikoročních nátěrových hmot, dochází k maskulinizaci nejen měkkých částí těl živočichů, ale též ke změnám tvarů ulit, které se pak více podobají samčím ulitám než samičím.

4.2. Mezipopulační (geografické) rozdíly

4.2.1. Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi morfometricky

Na prostřední lokalitě Sovlje byly ulity celkově nejprotaženější, na jižní lokalitě Sumartin nejširší (viz. Obr. 7; podkapitola 3.1.2.). Poměr DU/ŠU byl snížen výraznými trny na ulitě, které se často nacházejí na okrajových partiích schránek. Proč jižní populaci narůstají na ulitách trny a dvěma severnějšími populacím ne, zjištěno nebylo. Můžeme se domnívat, že slouží k ochraně před predátory, kterých by bylo v jižní části Jadranu více než v severní části, což však není potvrzené. Allenovo pravidlo pro homoiothermní živočichy, které praví, že s rostoucí teplotou se prodlužují extremity (výrůstky) těla, nemůže mít význam u neživé schránky heterotermního živočicha.

Lokalita Sovlje vykazuje výrazný nárůst poměru délek DU/ŠU oproti nejsevernější (o 3,5%) a nejjižnější (o 6,5%) lokalitě. Na této druhé lokalitě nebyla nalezena žádná nepostižená samice. Z toho usuzuji, že při maskulinizaci samic dochází nejen ke změně měkké části těla plže, ale i k jisté změně proporcí ulity, která však nebyla prokázána pro celek. Důvody mohou být i jiné (např.: environmentální). Lokalitu dvě, kde nebyly nalezené žádné nepostižené samice, můžeme považovat za masivně zamořenou antikoročními nátěrovými barvami s obsahem tributylcínu (TBT). Toto zamoření oblasti může též vést ke značným změnám ve tvaru.

4.2.2. Určení rozdílů mezi třemi geograficky vzdálenými populacemi pomocí geometrické morfometrie

Již metody tradiční morfometrie prokázaly rozdíly ve tvaru ulit mezi jednotlivými lokalitami, ale nešlo podle nich stanovit, v jakých detailech se od sebe liší. K tomu nám byla velice nápomocná geometrická morfometrie, přesněji programy, které umožňují tyto tvarové změny vizualizovat.

Diskriminační analýza dokázala od sebe jedince z jednotlivých lokalit oddělit se spolehlivostí 94%. Tento výsledek dokazuje, že jednotlivé populace na třech mnou zkoumaných lokalitách se od sebe navzájem výrazně liší (Obr. 9, podkapitola 3.2.1.).

Velké rozdíly mezi lokalitami - pouze středně vzdálenými vzhledem k celkovému areálu *H. trunculus* - ukazují obrovskou variabilitu tohoto druhu plže. Existuje možnost, že by se jednalo o kryptické druhy. Tuto možnost bych rád studoval v návazné magisterské práci, která bude založena na molekulární genetice těchto tří populací.

Populace z první lokality sběru (Zambratija) vykazuje nárůst šířky bazální části ulity a celkově je mírně širší než konsensuální tvar. Jinak nevykazuje žádné odlišnosti od konsensu. Navíc ulity z celé populace z lokality Zambratija nemají žádné vnější extrémity (trny), které jsou většinou na ulitách situované na okrajových partiích.

Celkově užší tvar oproti konsensu i ostatním lokalitám mají ulity z prostřední lokality Sovlje. Bazální část ulity a obústí je také užší než konsensuální tvar. Někteří jedinci z této populace mají tendenci si vytvářet na svých ulitách již dosti patrné extrémity, ale nedochází zde k takovým nárůstům, které jsou typické pro populaci z lokality Sumartin.

Třetí populace má ulity nejširší, právě díky výrazným extrémitám. Obústí a bazální část ulit je též nejširší. Sifonální kanálek má tendenci se stáčet doprava, při pohledu na náhled kolmo na obústí, kde jsou vrchol ulity a sifonální kanálek ve vertikálním směru. Sifonální kanálek je tedy zřetelně prohnutý, což není typické pro dvě předešlé populace.

Velmi velké změny tvaru u těchto populací nalezneme v horní části obústí. Úsek mezi landmarky L5; L11; L13 se u všech zkoumaných populací výrazně liší (Obr. 4a, b; podkapitola 2.3.). U jedinců z populace Zambratija si můžeme všimnout, že takřka neexistuje žádný úhel mezi těmito landmarky, kde L11 je vrchol úhlu. Tyto tři landmarky vytvářejí přímku. U druhé populace (Sovlje) je tento úhel téměř identický s konsensuálním tvarem a úhel mezi těmito landmarky u jedinců z třetí lokality (Sumartin) je nejvíce patrný. Výstupek parietálního pysku (L13), který sousedí s análním kanálkem, je u této populace nejvýraznější. Tento znak může mít co dočinění s vnějšími extrémity u této populace.

Pro další geometricko-morfometrické studie tvaru ulit plže *H. trunculus* navrhuji používat landmarky, které nejlépe vystihují tvarové změny a změny na biologických strukturách. Jedná se o landmarky L1, L5, L8 až L25 (Obr. 4a, b; podkapitola 2.3.). Landmarky L2, L3, L4, L6, L7 nedoporučuji, protože tyto biologické struktury nevytvírají nic o tvarových změnách. Byly by použitelné více ve studiích zaměřených na růst a vývoj ulit.

5. Závěr

Pomocí statistických výpočtů, tradiční morfometrie a geometrické morfometrie jsem studoval 300 jedinců plže *Hexaplex trunculus* ze třech na sobě nezávislých lokalit chorvatského pobřeží.

- ▶ Nenalezl jsem kritéria pro rozlišení pohlaví a postižení imposexem na ulitách plže *H. trunculus* metodou tradiční morfometrie.
- ▶ Pomocí tradiční morfometrie i pomocí geometricko-morfometrických metod jsem určil rozdíly v tvaru ulit mezi třemi zkoumanými populacemi ze tří lokalit.
- ▶ Nalezl jsem mírné pohlavní odlišnosti na ulitách plže *H. trunculus* pomocí geometricko-morfometrických metod. Výsledky oddělily samice od zbývajících dvou kategorií (samci a maskulinizované samice).

6. Použitá literatura

- ALZIEU C.** (1991): Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research* 32: 7-17.
- ALZIEU C.** (1986): The detrimental effects on oyster culture in France-Evolution since antifouling paint regulation. In: *Proceedings of the Organotin Symposium of the Oceans 86 Conference* 1130-1134.
- ARAGON-NORIEGA et.al.** (2007): Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduct clam *Panopea globosa* (Bivalvia:Hiatellidae) in the central Gulf of California. *Journal of shellfish research* 26: 423-431.
- AXIAK V., VELLA A.J., MICALEFF D., CHIRCOP P. & MINTOFF B.** (1995): Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Marine Biology* 121: 685-691.
- BECH M.** (2002): A survey of imposex in muricids from 1996 to 2000 and identification of optimal indicators of tributyltin contamination along the east coast of Phuket Island,Thailand. *Marine Pollution Bulletin* 44: 887-896.
- BECH M.** (1999): Increasing levels of Tributyltin-induced Imposex in Muricid Gastropods at Phuket Island, Thailand. *Applied Organometallic Chemistry* 13: 799-804.
- BECH M.** (1999): Sensitivity of different muricid gastropods to tributyltin contamination. Phuket. *Phuket Marine Biological Center Special Publication* 19: 151-156.
- BOOKSTEIN F. L.** (1996): Combining the tools of geometric morphometrics. In: Marcus L. F., Corti M., Loy A., Naylor G. J. P. et Slice D. E. (eds.): *Advances in Morphometrics*. Plenum Press, New York: 131-151.
- BOOKSTEIN F. L.** (1991): *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge Univ. Press: Cambridge.
- BRYAN G.W., GIBBS P.E., HUGGETT R.J., CURTIS L.A, BAILEY D.S. & DAUER D.M.** (1989): Effects of tributyltin pollution on the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*, from the York River and Sarah Creek, Chesapeake Bay. *Marine Pollution Bulletin* 20: 458-462.
- BRYAN G., GIBBS P.E., HUMMERSTONE L.G., BURT G.R.** (1986): The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around southwest England: evidence for the effect of TBT from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 66: 611-640.
- CALEY K., GRAHAME J. & MILL P.J.** (1995): A geographicallybased study of shell shape in small rough periwinkles: *Hydrobiologia* 309: 181-193.

- CARDINI ANDREA, ELTON SARAH** (2007): Sample size and sampling error in geometric morphometric studies of size and shape. *Zoomorphology* 126: 121-134.
- CARVAJAL A.-RODRÍGUEZ, CONDE P.-PADÍN AND ROLÁN E.-ALVAREZ** (2005): Decomposing shell from into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies* 71: 313-318.
- CARVAJAL-RODRÍGUEZ A. & RODRÍGUEZ M.G.** (2005): MODICOS: Morphometric and distance computational software oriented for evolutionary studies. *Online Journal of Bioinformatics* 6: 34-41.
- CHIAVARINI S., MASSANISSO P., NICOLAI P., NOBILI C., MORABITO R.** (2003): Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere* 50: 311-319.
- CLAISSE D., ALZIEU C.** (1993): Copper contamination as a result of antifouling paint regulation? *Marine Pollution Bulletin* 26: 395-397.
- CONDE-PADIN P. et. al.** (2007): Detecting shape differences in species of the *Littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies* 73: 147-154.
- DAVIES I.M.** (2000): Kinetics of the development of imposex in transplanted adult dogwhelks, *Nucella lapillus*. *Environmental Pollution* 107: 445-449.
- EL HAMDANI A., FERRER J.M. & GARCÍA CARRASCOSA A.M.** (1998): Imposex in prosobranch molluscs: an indicator of TBT pollution in the Valencian coast (Spain, Western Mediterranean). *Cuadernos de Investigación Biológica* 20: 275-278.
- EVANS S.M., EVANS P.M., LEKSONO T.** (1996): Widespread recovery of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in M. Bech / *Marine Pollution Bulletin* 44 (2002) 887-896 895 the North Sea and Clyde Sea. *Marine Pollution Bulletin* 32: 263-269.
- FÉRAL C., LeGall S.** (1983): The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. *Molluscan neuro-endocrinology*. North Holland Publ Co, Amsterdam: 173-175.
- FRETTER V., GRAHAM A.** (1994): *British Prosobranch Gastropods. Their functional anatomy and ecology*. London: The Ray Society.
- FRIESS M.** (2003): An application of the relative warps analysis to problems in human paleontology e with notes on raw data quality. *Image Anal. Stereol.* 22: 63-72.

- GARAVENTA F., PELLIZZATO F., FAIMALI M., TERLIZZI A., MEDAKOVIC D., GERACI S. & PAVONI B.** (2006): Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean Coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. *Hydrobiologia* 555: 281-287.
- GHARAIBEH W.** (2005): Correcting for the effect of orientation in geometric morphometric studies of side-view images of human heads. In: Slice, D.E. (Ed.), *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 117-143.
- GIBBS P.E.** (2005): Male genital defect (Dumpton Syndrome) in the dogwhelk *Nucella lapillus* (Neogastropoda): Mendelian inheritance inferred, based on laboratory breeding experiments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 143-150.
- GIBBS P.E.** (1999): Biological effects of contaminants: use of imposex in the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a bioindicator of tributyltin pollution. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* 24: 1-29.
- GIBBS P.E.** (1993): A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda) favouring the survival of a population in a TBT-affected area: *Journal of the Marine Biological Association UK* 73: 667-678.
- GIBBS P.E. et al.** (1991): TBT-induced imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*: Geographical uniformity of the response and effects. *Marine environmental research* 32: 79-87.
- GIBBS P.E. et al.** (1988): Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints: *Journal of the Marine Biological Association UK* 68: 715-731.
- GIBBS P.E., BRYAN G.W., PASCOE P.L. and BURT G.R.** (1987): The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination: *Journal of the Marine Biological Association UK* 67: 507-523.
- GIBBS P.E. and BRYAN G.W.** (1986): Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints: *Journal of the Marine Biological Association UK* 66: 767-777.
- GNU IMAGE MANIPULATION PROGRAM** (2008): GIMP (software for photo retouching, image composition and image authoring), version 2.4.7.: www.gimp.org.

- GÓMEZ A.-ROBLES, MARTINÓN M.-TORRES, BERMÚDEZ DE CASTRO J.M., MARGVELASHVILI A., BASTIR M., ARSUAGA J.L., PÉREZ A.-PÉREZ, ESTEBARANZ F., MARTÍNEZ L.M.** (2007): A geometric morphometric analysis of hominin upper first molar shape. *Journal of Human Evolution* 53: 272-285.
- HORIGUCHI T., SHIRAISHI H., SHIMIZU M., MORITA M.** (1994): Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan: *Journal of Marine Biological Association United Kingdom* 74: 651-669.
- JANSON K., SUNDBERG P.** (1983): Multivariate morphometric analysis of 2 varieties of *Littorina saxatilis* from the Swedish west-coast. *Marine Biology* 74: 49-53.
- JENNER M.G.** (1979): Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Neogastropoda). *Science* 205: 1407-1409.
- KANAYAMA T. et al.** (2005): Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome activated receptor (PPAR) α /retinoid X receptor (RXR) pathway. *Mol Pharmacol* 67: 766-774.
- KANNAN K. et al.** (1996): Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian coastal Waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 19-23.
- KO M.M.C., BRADLEY G.C., NELLER A.H., BROOM M.J.** (1995): Tributyltin contamination of marine sediments of Hong Kong: *Marine Pollution Bulletin* 31: 249-253.
- LICONA-CHAVES A. et al.** (2007): Genetic and morphometric analysis of *Chione californensis* and *C. subimbricata* (Bivalves: Veneridae) from the Mexican east Pacific and Gulf of California. *Ciencias Marinas* 33: 149-171.
- MARTOJA M. & BOUQUEGNEAU J.M.** (1988): *Murex trunculus*: un nouveau cas de pseudo-hermaphrodisme chez un gastéropode prosobranche. *Bulletin de la Société Royale de Liège* 57: 45-58.
- MATTHIESSEN P., GIBBS P.E.** (1998): Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 37-43.
- MOJETTA A.** (2005): *Průvodce podmořským světem, Středozevní moře*. Svojtka & Co., s.r.o.: Praha 3.
- NISHIKAWA JUN-ICHI** (2006): Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Marine Biology* 149: 117-124.
- NISHIKAWA J. et al.** (2004): Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ Sci Technol* 38: 6271-6276.

- OBERDÖRSTER E., MCCLELLAN-GREEN P.** (2002) Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Environ Res* 54: 715–718.
- OBERDÖRSTER E., MCCLELLAN-GREEN P.** (2000) The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21: 1323–1330.
- POPPE G.T. & GOTTO Y.** (1991): *European Seashells, Vol. 1 (Polyplacophora, Claudofoveata, Solenogastrea, Gastropoda)*. Verlag Christa Hemmen: Wiesbaden.
- PRIME M., PEHARDA M., JELIC K. et. al.** (2006): The occurrence of imposex in *Hexaplex trunculus* from the Croatian Adriatic. *Marine pollution bulletin* 52: 810-812.
- RAMÓN M. & AMOR M.J.** (2002): Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* and penis and genital duct size variations in populations affected by imposex. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82: 435-442.
- RAMÓN M. & AMOR M.J.** (2001): Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. *Marine Environmental Research* 52: 463-475.
- RILOV G., BENAYAHU Y. & GASITH A.** (2004): Life on the edge: do biomechanical and behavioral adaptations to wave-exposure correlate with habitat partitioning in predatory whelks? *Marine Ecology Progress* 282: 193-204.
- RILOV G., GASITH A., EVANS S.M. & BENAYAHU Y.** (2000): Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (Eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. *Marine Ecology Progress Series* 192: 229-238.
- ROHLF F.J.** (2008): tps Utility program, version 1.40. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (2007a): Relative warps, version 1.45. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (2007b): tpsRegr, version 1.34. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (2006): tpsDIG, version 2.10. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook.
- ROHLF F.J.** (1993): Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: *Contributions to morphometrics*. Vol. 8 (L.F. Marcus, E. Bello & A. García Valdecasas, eds), 8: 131-159. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- RUIZ J.M., BACHELET G., CAUMETTE P., DONARD O.F.X.** (1996): Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay France. *Environmental. Pollution*. 93: 195-203.

- SMITH B.S.** (1971): Sexuality in the American mud snail *Nassarius obsoletus* Say. Proceedings of the Malacological Society of London 39: 377-378.
- STATSOFT, Inc** (2007): STATISTICA (data analysis software systém), version 8.: www.statsoft.com.
- STONE J.R.** (1998): Landmark-based thin-plate spline relative warp analysis of gastropod shells. Systematic Biology 47: 254-263.
- STROBEN E., OEHLMANN U., SCHULTE-OEHLMANN U. & FIORONI P.** (1996): Seasonal variations in the genital ducts of normal and imposex-affected prosobranchs and its influence on biomonitoring indexes. Malacological Review, Suppl. 6: 173-184.
- STROBEN et al.**, (1992): The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. Mar Biol 113: 625-636.
- TAN K. S.** (1997): Imposex in three species of *Thais* from Singapore, with additional observations on *T. clavigera* (Küster) from Japan. Marine Pollution Bulletin 34: 577-581.
- TEN HALLERS-TJABBES C.C., KEMP J.F., BOON J.P.** (1994): Imposex in whelks *Buccinum undatum* from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. Marine Pollution Bulletin 28: 311-313.
- TERLIZZI A., FRASCHETTI S., GIANGUZZA P., FAIMALI M. & BOERO F.** (2001): Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 11: 311-317.
- TERLIZZI A., GERACI S., GIBBS P.E.** (1999): TBT-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. Ital. J. Zool. 66: 141-146.
- URRA A., OLIVA D., SEPÚLVEDA M.** (2007): Use of a morphometric analysis to differentiate *Adelomelon ancilla* and *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) of southern Chile. Zoological studies 46: 253-261.
- VASCONCELOS PAULO et. al.** (2007): The shell of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) as a mobile hard substratum for epibiotic polychaetes (Annelida: Polychaeta) in the Ria Formosa (Algarve coast—southern Portugal). Hydrobiologia 575: 161-172.
- VASCONCELOS P., GASPAR M. B. & CASTRO M.** (2006): Development of indices for nonsacrificial sexing of imposex-affected *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae). Journal of Molluscan studies 72: 285-294.