

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Životní cyklus motolice *Anomalotrema koiae*
Gibson & Bray, 1984 (Digenea: Opecoelidae)
na souostroví Svalbard**
Diplomová práce

Bc. David Novotný

Školitel: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

Školitel specialista, konzultant: RNDr. Eva Myšková

České Budějovice 2021

Novotný, D., 2021: Životní cyklus motolice *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Digenea: Opecoelidae) na souostroví Svalbard [Description of a life cycle of trematode *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Digenea: Opecoelidae) on Svalbard archipelago, Msc. thesis, in Czech], 70 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of the study is to describe the life cycle of a trematode species *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Digenea: Opecoelidae) which occurs in a whelks (*Buccinum undatum*, *B. glaciale* and *Plicifusus kroyeri*) and Arctic staghorn sculpin (*Gymnocanthus tricuspis*) in littoral waters, mainly fjords, of the Svalbard archipelago to better understand the ecology of arctic marine habitats. In the study there is the first morphological description of larval stages of *A. koiae*, mainly the sporocysts and cercariae. For the purpose of the study, there were used both the molecular and morphological methods to analyse the data from the samples which were collected on Svalbard.

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

V Českých Budějovicích 7. 12. 2021

David Novotný

Poděkování

V první řadě bych chtěl velmi poděkovat všem členům Centra polární ekologie pod vedením doc. Ing. Jiřího Bárty Ph.D. a zejména mému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi CSc. za shromažďování a pravidelný odběr parazitologických vzorků z odlehlých končin, jako je souostroví Svalbard, a také za poskytnutí prostor, přístrojů a materiálu na zpracování vzorků. Také bych rád vedení CPE poděkoval za to, že jsem se v roce 2018 (v rámci tvorby svojí bakalářské práce) mohl účastnit jedné z letních expedic na toto souostroví.

Také bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Tomášovi Scholzovi CSc. za zapůjčení mikroskopických trvalých preparátů tří druhů motolic (*Anomalotrema koiae*, *Podocotyle atomon*, *Steringophorus furciger*) z helmintologické sbírky Parazitologického ústavu AV ČR, také za možnost pracovat u mikroskopu s kreslícím zařízením, a v neposlední řadě za zprostředkování kontaktů s Přírodovědným muzeem v Londýně.

Chtěl bych také RNDr. Anně Faltýnkové Ph.D. za odbornou konzultaci k morfologii motolic.

V poslední řadě bych chtěl poděkovat Přírodovědnému muzeu sídlícímu v Londýně a zejména Dr. Andree Waeschenbach za poskytnutí muzejních vzorků čtyř druhů motolic (*Anomalotrema koiae*, *Macvicaria maccasarensis*, *Podocotyloides stenometra*, *Pseudopecoeloides tenuis*) na molekulární analýzu DNA, zejména markeru ITS2.

Tato práce byla finančně podpořena grantem ECOPOLARIS No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708 a také grantem Studentské grantové agentury (SGA) PřF JU.

Obsah:

1. ÚVOD	1
1.1 Výzkum mořské parazitofauny na Svalbardu	1
1.2 Helminti	3
1.3 Studium helmintofauny na Svalbardu	4
1.4 Motolice	5
1.4.1 Morfologie motolic	5
1.4.2 Fylogeneze motolic	6
1.4.3 Životní cykly motolic	6
1.5 Opecoelidae Ozaki, 1925	9
1.6 Adaptace životního cyklu a diverzita arktických mořských druhů motolic	11
1.6.1 Motolice čeledi Opecoelidae arktických oblastí severního Atlantiku a Severního ledového oceánu	13
1.6.2 Životní cyklus motolic čeledi Opecoelidae v zátocce Petuniabukta, Svalbard...	14
2. CÍLE PRÁCE	16
3. MATERIÁLY A METODY	17
3.1 Sběr materiálu:	17
3.2 Molekulární analýza	19
3.3 Fylogenetická analýza	21
3.4 Morfologická analýza	21
3.4.1 Příprava mikroskopických trvalých preparátů	22
3.4.2 Morfometrické měření	22
3.4.3 Elektronová mikroskopie	22
4. VÝSLEDKY	23
4.1 Výsledky parazitologických pitev:	23
4.2 Molekulární analýzy	24
4.3 Morfologická analýza:	34
4.3.1 Larvální stádia:	34
4.3.2 Dospělá stádia:	39
5. DISKUSE	53
5.1 Systematika	53
5.2 Životní cyklus motolice <i>Anomalotrema koiae</i> (Obr. 18)	55
6. ZÁVĚRY	60
POUŽITÁ LITERATURA:	61

1. Úvod

1.1 Výzkum mořské parazitofauny na Svalbardu

Pro porozumění ekologickému fungování a dynamiky polárních či jiných habitatů, nesmí být opomíjeno také studium lokální parazitofauny a její vztahy s hostitelskými organismy (Wisz et al. 2013). Díky informacím o distribuci, abundanci, životních cyklech a diverzitě lokálních parazitů lze odvodit mnoho ekologických parametrů prostředí, ve kterém se oni sami či jejich hostitelé nacházejí. Příkladem mohou být trofické vztahy mezi různými druhy organismů, které slouží parazitům jako jejich hostitelé a v rámci kterých se během svého životního cyklu přemisťují. Také studiem specifických parazitů můžeme hlouběji porozumět populační dynamice jejich hostitelů a celkovému fitness jejich populace. V neposlední řadě lze studiem abundance a prevalence lokálních parazitů pozorovat změny abiotických podmínek prostředí, na jejichž změny mohou být některé druhy parazitů s volně žijícími stádii vysoce náchylní (Hudson et al. 2006; Studer & Poulin 2012).

Svalbard je souostroví, nacházející se za daleko za severním polárním kruhem v polárním pásu mezi 76° - 81° severní šířky a 10° - 35° východní délky (Hisdal 1998). Kvůli vysokým zeměpisným šířkám zde panují rozdílné světelné a teplotní podmínky, než na které jsme zvyklí z nižších zeměpisných šířek. Během roku se zde střídají dva astronomické fenomény ovlivňující klima a ekosystém celé severní polokoule za polárním kruhem včetně Svalbardu, a to polární den a polární noc. V jižních částech souostroví na 74° s. š. trvá polární den 99 dní a polární noc 84 dní, zatímco na 81° trvá polární den 141 dní a polární noc 128 dní. Mezi těmito dvěma obdobími panuje na Svalbardu období šera (twilight), kdy již slunce vychází mírně nad obzor a začíná se střídat čas dne, šera a noci. Období šera jsou obvykle datována na období jarní a podzimní rovnodennosti (spitsbergen-svalbard.com; timeanddate.com). Střídání polárního dne se projevuje i výrazně na průměrné teplotě, která se během polárního dne pohybuje mezi 4 °C až 7 °C a během polární noci mezi -19,4 °C až -4,6 °C, přičemž nejtepleji je v jihozápadní části souostroví a nejchladněji ve vnitrozemí severní a severo-východní části souostroví (Przybylak et al. 2014; van Pelt et al. 2016).

Souostroví se skládá z 6 větších ostrovů (Spitsbergen, Nordaustlandet, Edgeøya, Barentsøya, Prins Karls Forland, Kvitøya, souostroví Kong Karls Land), přilehlých ostrůvků a také dvou vzdálenějších ostrovů Hopen (Ostrov Naděje) a Bjørnøya (Medvědí ostrov). Celková plocha, kterou souostroví zabírá, je 61 022 km², z čehož 60% území je pokryto ledovci (van Pelt et al. 2016). Pobřeží ostrovů je velice členité díky působení ledovců, které během svého utváření vyhloubily do vnitrozemí rozsáhlá údolí, která po roztátí ledovce byla zaplavena mořskou vodou, a vytvořily se charakteristické zálivy a zátoky zvané fjordy. Svalbard je omýván Barentsovým, Norským a Grónským mořem a ze severu Severním ledovým oceánem. Zatímco ze západu a severu je Svalbard omýván teplým Západošpicberským proudem odštěpujícím se z Golfského proudu, z východní a jižní strany je ochlazován studenými proudy ze Severního ledového oceánu a Barentsova moře. Díky zmíněným

proudům má Svalbard mírnější teplotní výkyvy a extrémy než místa ve stejné zeměpisné šířce v Grónsku či Kanadě, kdy některé západně položené fjordy během zimy vůbec nezamrzají. Západošpicberským proudem vniká do Severního ledového oceánu až 60% celkové vody (The Norwegian polar institute 2020), který může ze severního Atlantiku přinášet také mnoho organismů včetně jejich parazitů, čímž je Svalbard méně izolovaný od vlivu vod mírného pásma než lokality nacházející se např. v severním Rusku.

Svalbard skýtá útočiště pro značné množství marinních a terestrických živočichů. Díky výše zmíněným oceánským proudům je tu v pobřežních vodách celého souostroví možné nalézt jak druhy arktické, tak druhy subarktických a boreálních vod. Zásadní abiotický vliv na biologickou diverzitu svalbardských fjordů má zejména přísun na živiny bohatých vod z Atlantiku a také přísun sladké vody a sedimentu z roztávajících ledovců. Tím vzniká environmentální gradient, díky kterému je ve vnějších a vnitřních částech fjordů rozdílná diverzita živočichů, přičemž atlantské proudění podporuje boreální skladbu živočichů a přísun chladné vody z ledovců vyhovuje arktické složce místní fauny (Hop et al. 2002). Celková biologická diverzita ve fjordech bývá obvykle nižší, než je tomu v otevřených vodách, kde je vyšší přísun živin a unášených organismů oceánskými proudy. Mezi odhadované příčiny nižší biologické diverzity ve fjordech jsou zejména jejich izolovanost od oceánských proudů, bariéra dána přísunem a vyšším vlivem sladké vody z roztávajících ledovců, která snižuje jak salinitu, tak teplotu vody a zvyšuje turbiditu vody či přísun minerálních sedimentů, který přispívá k vyšší disturbanci mořského dna a snižování koncentrace organického materiálu na dně. Další roli může hrát celková vzdálenost fjordů od ohnisek výskytu různých druhů mořských živočichů (Hop et al. 2002; Włodarska-Kowalczyk et al. 2005, 2012).

Základní trofickou složku mořského ekosystému na Svalbardu tvoří planktonní společenství fytoplanktonu a jimi se živícího zooplanktonu, jehož množství v arktických vodách fluktuuje na základě každoročních rytmů střídajících se ročních období a také měnícího se zalednění moří, které v posledních desítkách let v Arktickém oceánu klesá, což má za následek prodloužení sezóny růstu fytoplanktonu a zvýšení produkce biomasy fytoplanktonu (Ardyna & Arrigo 2020). Zooplankton je z velké části do místních vod přinášen hlavně Západošpicberským proudem z Atlantského oceánu. Početní jsou zde zejména klanonožci, např. *Calanus finmarchicus*, který se podle odhadů vyskytuje zejména na západním pobřeží Svalbardu v anuálních rytmech v množství 480 000 - 500 000 t/rok (Wassmann et al. 2019). Z dalších skupin zooplanktonu jsou zde hojně zastoupeni další druhy klanonožců (*Calanus glacialis*, *Metridia lucens*,...), vidlonožci (*Boreomysis arctica*), krunýřovci (*Thysanoessa raschii*, *T. longicaudata*), různonožci (*Gammarus* spp., *Themisto* spp.) a další korýši, žebernatky (*Mertensia ovum*, *Beroe cucumis*), planktonní měkkýši (*Limacina helicina*, larvy mlžů) a rybí potěr. Jimi se následně živí velké množství měkkýšů a větších druhů korýšů, žahavců, ploutvenek a ryb z čeledi Clupeidae, Cottidae, Gadidae, Pleuronectidae, Stichaeidae, atd. Na vrcholu marinního potravního řetězce se poté nachází zejména paryby např. žralok grónský (*Somniosus microcephalus*), mořští savci včetně medvěda ledního (*Ursus maritimus*), mořští ptáci a v neposlední řadě také lidé, kteří sídlí na tomto souostroví od 17.

století (Arlov 1994; Hop et al. 2002). Následnou odumřelou hmotou či detritem se živí mnohé druhy korýšů (různonožci, krab *Hyas araneus*), kroužkoců, ostnokožců, měkkýšů atd. (Hop et al. 2002).

Trofických vztahů v potravním řetězci využívají různé skupiny parazitů. Paraziti využívají tyto organismy jako tzv. hostitele, ve kterých probíhá jejich vývoj a množení a to hlavně pohlavní (v definitivních hostitelích) ale i nepohlavní (v mezihostitelích). Mezihostitelé se nemusejí vyskytovat v životním cyklu parazita vůbec, ale u některých skupin parazitů mohou být přítomni až tři (Poulin & Cribb 2002; Zelmer & Esch 1998). Poté je dospívání parazitů spjaté s konečným vývojem jejich rozmnožovacích orgánů a následným pohlavním rozmnožováním probíhajícím v definitivním hostiteli. Složité životní cykly, které probíhají ve více hostitelích, během nichž střídají pohlavně a nepohlavně rozmnožující se stádia, jsou charakteristickým znakem mnoha skupin parazitů zvláště pak helmintů (Parker et al. 2012).

1.2 Helminti

Helminti je obecný termín označující skupinu mnohobuněčných, zejména makroskopických bezobratlých živočichů s nápadně protáhlým na průřezu kulatým či dorzo – ventrálně zploštělým (červovitým) tvarem těla, z nichž část žije parazitickým způsobem života. Slovo helmint pochází z řeckého původu a v překladu znamená slovo červ (Lindquist & Cross 2017). Do této skupiny náleží mnoho taxonomicky odlišných skupin napříč celým fylogenetickým stromem živočichů, a to zejména ploštěnce, vrtejše, hlístice a strunovce (Castro 1996). Mezi parazitické helminty s nejvyšším počtem hostitelů, které vystřídají během svého životního cyklu, patří tasemnice a motolice (Cribb et al. 2003; Auld & Tinsley 2014).

Tasemnice i motolice patří mezi ploštěnce (Platyhelminthes) a dohromady s třídou žábrolísti (Monogenea) tvoří taxonomickou skupinu Neodermata (Cribb et al. 2003). Jde o zcela parazitickou skupinu ploštěnců s charakteristickou epidermis tzv. neodermis zvanou též tegument. Ten je tvořen mnohojaderným útvarem zvaným syncitium. Tegument vzniká fúzí epiteliárních buněk, čímž vzniká mnohojaderná membrána na povrchu organismu sloužící zejména k obranným absorpčním i sekrečním mechanismům. Další vlastnost charakterizující Neodermata je přítomnost obrvené volně žijící larvy v jejich životním cyklu nazývané u motolic miracidium, u tasemnic lykofora či koracidium (může chybět, nebo je u skupiny Eucestoda je toto stádium nahrazeno neobrvenou parazitickou larvou nazývanou onkosféra) a u žábrolístů oncomiracidium (Volf & Horák 2007). Mezi další společné znaky patří anatomie protonefridií. V rámci Neodermát jsou třídou s nejvyšší diverzitou považovány motolice (Trematoda) (Olson et al. 2003).

1.3 Studium helmintofauny na Svalbardu

Vyjmenované parazitické skupiny helmintů se vyskytují i v arktických oblastech včetně Svalbardu. Známým případem je výskyt medicínsky a veterinárně významné tasemnice *Echinococcus multilocularis* (měchožil bublinatý) u lišek polárních (*Vulpes lagopus*) (Henttonen et al. 2001). Dalšími studii zabývajícími se helmintofaunou Svalbardu je práce norských vědců (Johansen et al. 2010) mapující abundanci a diverzitu různých skupin helmintů v trávicím traktu tuleně kroužkovaného (*Pusa hispida*), či vědecká práce (Carlsson et al. 2012) dokumentující přenos gastrointestinálních hlístic (zejména *Marshallagia marshalli*) během zimních měsíců v populaci svalbardského poddruhu soba polárního *Rangifer tarandus platyrhynchus*. Dokumentace diverzity a populační dynamiky gastrointestinálních hlístic sobů je na počet publikovaných článků (nalezeno 11) nejčastějším předmětem studií helmintofauny na Svalbardu. Na základě novější studie Myšková et al. 2019 zabývající se parazitofaunou *V. lagopus* a hraboše východoevropského (*Microtus levis*) byly také na Svalbardu poprvé prokázány běžné druhy helmintů vyskytujících se i v jiných částech Arktidy jako *Eucoleus aerophilus* (syn. *Capillaria aerophila*), *Uncinaria stenocephala*, *Toxocara canis* a *Trichuris vulpis*.

Od roku 2007 provádí výzkum parazitofauny na Svalbardu také Centru polární ekologie (CPE) spadající pod Přírodovědeckou fakultu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (CPE 2007). Během výzkumu byl na Svalbardu zdokumentován výskyt mnoha druhů parazitů v terestrických i marinních biotopech. Co se týká helmintofauny, stojí za zmínku zejména dokumentace diverzity helmintů zátoky Petuniabukta, umístěné v centrální části souostroví (souřadnice 78° 40' 010''N, 16° 24' 240''E). Jde o izolovanou mělkou zátoku vybíhající ze zálivu Billefjord s bohatým přísunem sladké vody z okolních tajících ledovců. Skýtá útočiště zejména litorálnímu společenstvu živočichů, které se v zátocce vyskytuje po celý rok. V rámci výzkumu zde byl např. popsán vliv metacerkárií rodu *Gymnophallus* na chování mlžů *Mya truncata* a *Hiatella arctica* v případě ohrožení, kdy exponovaní (nezahrabaní) jedinci měli signifikantně vyšší prevalenci než jedinci zahrabaní (CPE 2010). Dále také byly prováděny experimenty s cílem poznání životního cyklu opecoelidních motolic, jejichž larvální stádia byla nalezena v plži surmovka vlnitá (*Buccinum undatum*), načež se zdařila experimentální infekce různonožců *Gammarus* sp. a *Onisimus* sp., kterým byla nabídnuta potrava složená z hepatopankreatu infikovaných *B. undatum*. Poté byly prokázány ve svalovině různonožců patrné metacerkárie (CPE 2013). Také byla na Svalbardu vypracována bakalářská práce studentky Venduly Branišové zabývající se diverzitou a životními cykly motolic nadčeledi Hemiuroidea, parazitující zejména u mořských ryb a bezobratlých zálivu Adventfjorden, které byly popsány jako druhy *Derogenes varicus* (zaznamenaný z plže *Euspira pallida*, ploutvenek, ryb *Boreogadus saida*, *Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus* a *Myoxocephalus scorpius* a rejnoka *Amblyraja radiata*) a *Hemiurus levinseni* z treskovitých ryb (Branišová 2020). Během expedic CPE bylo neshromážděno velké množství vzorků běžných živočichů tohoto zálivu a z nichž pochází většina dat v této studii.

1.4 Motolice

Motolice (Trematoda) je třída parazitických ploštěnců. Jsou významnými parazity všech skupin obratlovců. Mezi motolicemi se nacházejí výjimečně ektoparaziti (motolice čeledí Syncoeliidae a Transversotrematidae), ale zejména jde o endoparazitickou skupinu parazitující v trávicím traktu, játrech a žlučovodech, plicích či v krevním řečišti (Cribb 1998; Olson et al. 2003; Volf & Horák 2007). Některé druhy motolic také parazitují v plovacím měchýři ryb, vylučovacím traktu, kloace hadů, vaječnicích, očích, svalové a pojivové tkáni či v samotné tělní dutině (Cribb et al. 2003; Galaktionov & Dobrovolskij 2003). U lidí mohou způsobovat závažná onemocnění jako např. jaterní, močovou či střevní schistosomózu, paragonimózu, fasciolózu atd. (Lindquist & Cross 2017). Tři druhy motolic *Opisthorchis viverrini* (Digenea: Opisthorchiidae), *Clonorchis sinensis* (Digenea: Opisthorchiidae) a *Schistosoma haematobium* (Digenea: Schistosomatidae) jsou klasifikovány jako biologické karcinogeny první třídy, z čehož první dva druhy mohou při dlouhodobé infekci s vyšší intenzitou způsobit rakovinu jater či žlučovodů a *S. haematobium* způsobuje urogenitální schistosomózu, která může vést až k rakovině močového měchýře (Brindley et al. 2015). Motolice jsou také významnými parazity měkkýšů, členovců a dalších fylogenetických skupin napříč celou živočišnou říší, u kterých mohou ovlivnit jejich zdatnost či schopnost odolávat rozdílným faktorům vnitřního a vnějšího prostředí, schopnost se reprodukovat či dokonce ovlivnit jejich fenotypové vlastnosti (Galaktionov & Dobrovolskij 2003). U larválních stádií a metacerkárií některých druhů motolic byla pozorována záměrná kastrace či dokonce jimi způsobená změna chování jejich napadeného hostitele (Anokhin 1966; Lafferty & Kuris 2009). Celkový odhad diverzity motolic je kolem 18 000 – 24 000 druhů (Poulin 2005).

1.4.1 Morfologie motolic

Mezi charakteristické morfologické znaky motolic patří jejich dorsoventrálně zploštělé tělo, nabývající oválného, hruškovitého či až červovitého tvaru. Tegument motolic je zpravidla zvlněný či rýhovaný a často jsou na něm patrné sklerity či ostny tvořené krystalizovanými proteiny a aktinovými mikrofilamenty zakotvenými v basální lamině (Stitt et al. 1992). Rozmístění a počet ostnů jsou důležitým znakem pro určování druhů motolic. Dalším charakteristickým znakem, patrným již z vnějšího pohledu na motolici, je přítomnost jedné či dvou přísavek sloužících k uchycení těla na povrchu orgánu, ve kterém motolice parazituje. Na základě počtu a umístění přísavek na těle bylo stanoveno základní morfologické dělení motolic. Většina druhů motolic jsou hermafroditi, což je patrné přítomností rozvinutých samčích i samičích pohlavních soustav uzpůsobených k vysoké produkci spermií i vajíček. Ze samčích pohlavních orgánů jsou nejvíce patrná varlata (testes), nabývající různého počtu, tvaru a velikosti napříč druhovou rozmanitostí motolic. Z nich poté vedou chámovody (vasa efferens sbíhající se v jedno vas deferens) ústící do seminálního vezikula, ze kterého poté vybíhá tzv. cirrus, což je analogický orgán k penisu. Seminální vezikulum, ejakulační žlázy a cirrus bývají uloženy v cirrovém váčku. Samičí pohlavní soustava se skládá většinou z jednoho vaječníku, z něho vedoucího

oviduktu vedoucího do ootypu, seminálního receptákula, kde se ukládá zásoba spermií po kopulaci, vitelárií produkujících žloutkové buňky, vitelinních kanálků, Laurerova kanálku odvádějící přebytečný materiál z těla motolice a následné protáhlé dělohy vedoucí až ke genitálnímu póru. Dalším důležitým znakem motolic je morfologie jejich trávicí soustavy skládající se z ústního otvoru, farynxu, u některých skupin i prefarynxu, jícnu a jednoduchého či větvičitého se slepého střeva. V neposlední řadě jsou také charakteristicky patrnými znaky tvar a velikost vylučovacího měchýře (Volf & Horák 2007; Cribb 2004; Toledo & Fried 2014).

1.4.2 Fylogeneze motolic

V klasifikaci se motolice (Trematoda) dělí na dvě podtřídy. První z nich je menší podtřída Aspidogastrea charakteristická zejména přímým vývojovým cyklem postrádajícím množení larválních stádií. Během vývojového cyklu vystřídá jednoho či dva hostitele, kterými jsou zejména měkkýši, ryby, plazi či korýši (Alves et al. 2015; Atopkin et al. 2018).

Druhou skupinou zabírající převážnou část motolic je podtřída Digenea, česky dvojrodí. Se svým počtem zahrnujícím ~18 000 druhů ve 150 známých čeledích, jde o jednu ze skupin s nejvyšší diverzitou v rámci endoparazitů z říše Metazoa (Olson et al. 2003; Bray 2020). Sem náleží většina motolic způsobujících závažná lidská a veterinární onemocnění. Jde o globálně rozšířenou skupinu motolic s vyšší druhovou diverzitou v tropických oblastech světa. Digenea se dále dělí na dvě fylogenetické linie Diplostomida, kam patří např. medicínsky významné krevní motolice čeledi Schistosomatidae, Aporocotylidae a Spirorchidae, a Plagiorchiida, která zahrnuje většinu diverzity podtřídy Digenea, a kam také patří čeleď Oecoelidae, do které druh *A. koiiae* náleží (Olson et al. 2003).

Charakteristickým znakem digenetických motolic je složitý vývojový cyklus, během něhož motolice vystřídá mnoho morfologicky odlišných typů s rozdílnou fyziologií a strategií přežití. Pro motolice je charakteristické střídání hostitelů, kdy každé vývojové stádium může obývat rozdílného hostitele, nebo pobývat ve vnějším prostředí ve snaze dalšího hostitele infikovat. Životní cyklus motolic bývá zpravidla dvou až čtyřhostitelský (Cribb et al. 2003).

1.4.3 Životní cykly motolic

V životním cyklu motolic se střídá mnoho morfologicky, fyziologicky i funkčně rozlišných stádií. Zpravidla je započat pohlavním množением dospělých stádií uvnitř definitivního hostitele, kterými jsou u motolic zpravidla obratlovci, tvorbou velkého množství oplozených vajíček. U některých druhů motolic (*Fasciola* sp., *Paragonimus westermani*, *Schistosomatium douthilli*) byla u dospělých stádií také prokázána partenogeneze (Whitfield & Evans 1983). Vajíčka zpravidla odcházejí z těla definitivního hostitele společně s trusem či močí a ve vnějším prostředí se z vajíčka vylíhne mikroskopické obrvené larvální stádium tzv. miracidium. Vajíčka mnoha druhů motolic mají čepičkovitý útvar nazývaný operculum, kterým po jeho oddělení vzniká otvor, kterým uniká miracidium z vajíčka do volného prostředí. U některých druhů motolic bylo zaznamenáno líhnutí miracidíí ještě uvnitř definitivního

hostitele. Jako příkladem se uvádí druh motolice *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae), která se líhne v nosní dutině vrubozobých ptáků (Horák et al. 1998). U nadčeledí Brachylamoidea, Hemiuroidea, Opisthorchioidea a Pronocephaloidea se miracidia líhnou až v trávicí trubici plže, který vajíčka pozřel a penetrují do jeho tkáně přes jeho střevní epitel (Cribb et al. 2003). Miracidium ve vnějším prostředí využívá ke své orientaci hlavně chemické signály svého prvního mezihostitele. Prvním mezihostitelem jsou zpravidla měkkýši (plži, mlži, kelnatky) či kroužkovci (Cribb et al. 2003). Miracidium nepřijímá žádnou potravu a žije pouze po dobu několika hodin až jednoho dne, pokud nenalezne vhodného hostitele. Po nalezení vhodného mezihostitele využívá při penetraci miracidium specializovaného orgánu v přední části těla tzv. trebratorium. To se skládá z apikálních a longitudálních žláz vyměšujících lytické enzymy, svalových vláken a u čeledí Aporocotylidae, Encyclometridae, Bucephalidae a Brachylaimidae také styletu, který však nemá se styletem u cercárií nic, kromě svojí funkce, společného (Galaktionov & Dobrovskij 2003). Po vniknutí do prvního mezihostitele je obrvený epitel miracidia nahrazen tegumentem a z miracidia se stává tzv. mateřská sporocysta. U čeledí tzv. viviparních motolic (Cyclocoelidae, Philophthalmidae, Echinostomatidae a některé druhy Allocreadiidae) se uvnitř miracidia vyvíjí larva, která je miracidium inokulována dovnitř hostitele a nazývá se mateřská rédie (Galaktionov & Dobrovskij 2003). Ta poté migruje uvnitř hostitele k cílovým orgánům, kde bude probíhat následné množení, či zůstává ve svalové tkáni poblíž místa penetrace a do cílových orgánů migrují až dceřiné sporocysty např. u druhu *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) (Negrão-Corrêa et al. 2012). V případě měkkýšů jsou postiženy zejména hepatopankreas, gonády či srdce a aorta (Ataev et al. 1997; Lajtner et al. 2008). Po vniknutí do těla prvního mezihostitele se musí larvální stádia vypořádat s hostitelským imunitním systémem nebo se mu vyhnout. Další problém mohou tvořit jiné druhy organismů, již přebývající v těle hostitele. U měkkýšů tvoří základní složku jejich imunitního systému obranné buňky zvané hemocyty, které mohou fagocytovat sporocystu či miracidium, které do měkkýše vniklo (Locker et al. 1982). Stejně důležitou roli hraje také humorální odpověď složená zejména z proteinů s afinitou na vnější membránové proteiny sporocyst, cytotoxinů a variantami různých imunoglobulinových a lektin obsahujících molekul (Wu et al. 2017). Mezi další organismy přebývajících v prvním mezihostiteli, které mohou mít významný vliv na vývoj a množení larválních stádií motolic jsou zejména jiné druhy motolic nebo také protist druhu *Capsaspora owczarzaki* (kmen Mesomycetozoa), který parazituje u plže *Biomphalaria glabrata* a přímo se podílí na eliminaci larev schistosom uvnitř svého hostitele (Basch et al. 1969; Stibbs et al. 1979; Hertel et al. 2002). V hepatopankreatu poté probíhá množení, kdy se z germinálních buněk uvnitř mateřské sporocysty / rédie vyvíjejí dceřiné sporocysty či rédie, které jsou následně uvolněny z jejího těla. Jde o způsob nepohlavního rozmnožování nazývaný diploidní apomiktická partenogeneze, kterým se množí jak mateřská, tak dceřiné sporocysty a rédie (Dobrovskij & Ataev 2003). U motolice *Heronimus mollis* (Digenea: Heronimidae) nabývá mateřská sporocysta nepravidelného tvaru, kdy se mnohačetně větví a uvnitř jejího těla se z germinálních shluků vyvíjí rovnou cercárie, načež v jejím životním cyklu neprobíhá žádný vývoj dceřiných sporocyst či rédií (Galaktionov & Dobrovskij 2003).

Dceřiné sporocysty jsou morfologicky totožné s mateřskou sporocystou, kdy také přijímají živiny a vylučují metabolity celým povrchem těla. Rédie, na rozdíl od dceřiných sporocyst, mají již vyvinutou trávicí soustavu složenou z ústního otvoru, farynxu a slepě zakončeného střeva. Díky tomu mohou mimo pasivní příjem živin tegumentem aktivně přijímat potravu, kdy se živí zejména tkání hostitele, či dokonce se mohou živit larválními stádii jiných druhů motolic, které se vyskytují ve stejném hostiteli (Basch et al. 1969). Rédie se také od sporocyst liší výskytem výrůstků s lokomotorickou funkcí tzv. papil na povrchu těla a porodním otvorem umístěným na subterminálním konci těla (Combes 1982; Galaktionov & Dobrovolskij 2003; Pinheiro et al. 2004). U obou stádií následně probíhá množení také formou diploidní apomiktická partenogeneze, ze které může vzniknout další generace sporocyst či rédií, nebo generace tzv. cercárií. U mnoha čeledí motolic (Aporocotylidae, Gymnophallidae, Schistosomatidae, Cyathocotylidae, Strigeidae a Diplostomidae) se vyvíjí stádia nové generace sporocyst / rédií a cercárií v jednom těle sporocysty / rédie zároveň (Galaktionov & Dobrovolskij 2003).

Cercárie jsou ve většině případů pohyblivá larvální stádia motolic, která vyplouvají či jsou vypuzena z těla prvního mezihostitele a jsou ve většině případů schopná pohybu ve vnějším prostředí a nalezení dalšího hostitele. K pohybu ve volném prostředí mají uzpůsobený pohybový aparát, kterým je zpravidla ocásek přizpůsobený k pohybu ve vodním sloupci či uchycení k pevnému podkladu. U některých skupin také plní tuto funkci dvojice přísavek (ústní a břišní), které jsou přizpůsobeny k pohybu po pevném podkladu. Díky tomu cercárie nabývají různých tvarů a velikostí, což jsou další důležité morfologické znaky na určování motolic, kdy nejlépe je tato variabilita cercárií popsána v publikaci Dawes (1946). Vyplouvání cercárií z hostitele většinou probíhá v určitých rytmech (cirkadiální nebo spjaté s rozmnožováním jejich hostitelů, ...), aby cercárie měly co nejvyšší pravděpodobnost nalézt dalšího hostitele. Cercárie během hledání dalšího hostitele nepřijímají žádnou potravu, a pokud nenaleznou vhodného hostitele či se včas nezapouzdří, do pár hodin až dní hynou. Do dalšího hostitele vnikají cercárie pasivně pozřením či prouděním vody přes žábry hostitele či aktivním vyhledáváním dalších potenciálních hostitelů a následné aktivní penetraci do těla hostitele. Po dosednutí cercárie na povrch hostitele (kůže, žábry, střevní epitel, ...), dochází k penetraci pomocí svého penetračního aparátu skládajícího se z různého počtu penetračních žláz produkujících proteolytické enzymy a styletu u podřádu Xiphadiata. Penetrační žlázy postrádají cercárie zapouzdřující se ve vnějším prostředí či využívající pasivní přenos pomocí jejich pozření dalším hostitelem (Galaktionov & Dobrovolskij 2003).

U motolic s dvouhostitelským cyklem např. cercárií rodu *Schistosoma* dochází k penetraci pokožky definitivního hostitele, kde cercárie odhazují ocásek a mění se ve stádium tzv. schistosomulum. V případě motolic čeledí Fasciolidae, Notocotylidae, Philophthalmidae, Paramphistomidae a Haploporidae se cercárie ve vnějším prostředí zapouzdřují do stádia adoleskáríe, k čemuž dochází zpravidla na povrchu vodních rostlin nebo bentických a planktonních živočichů (Pearson 1972; Galaktionov & Dobrovolskij 2003). U motolic s fakultativním čtyřhostitelským cyklem, příkladem může být rod *Alaria* (Digenea: Diplostomidae), se z cercárie po vniknutí do druhého mezihostitele stane

stádium tzv. mesocerkárie, které v tomto stavu přetrvává, i pokud je druhý mezihostitel pozřen paratenickým třetím mezihostitelem (Uhrig et al. 2015). V případě motolic čeledi Hemiuridae, kde jsou také známy druhy se čtyřhostitelským cyklem např. *Halipegus occidualis*, se metacerkárie v druhém mezihostiteli (lasturnatka) a paratenickém třetím mezihostiteli (larva vážky) nijak od sebe neliší a obě mohou být nakažlivé pro definitivního hostitele (skokan křiklavý), (Zelmer & Esch 1998). U motolic s tříhostitelským cyklem se cercárie uvnitř druhého mezihostitele zapouzdří do klidového stádia metacerkárie, které poté vyčkává, až je druhý mezihostitel pozřen definitivním hostitelem. U mnoha čeledí motolic byla zamenána partenogenetická stádia metacerkárií, kdy např. u druhu *Parvatrema margaritense* (Digenea: Gymnophallidae) byla zaznamenána v plži *Tutonia minuta* partenogeneze přes dvě generace partenogenetických metacerkárií a až po třetí generaci metacerkárií, které mohou infikovat definitivního hostitele (Galaktionov 2006). Uvnitř definitivního hostitele dochází v cílových orgánech k metamorfóze do dospělého stádia motolice, které je schopno se pohlavně rozmnožovat a produkovat vajíčka.

1.5 Opecoelidae Ozaki, 1925

Jednou z čeledí motolic s nejvyšší druhovou diverzitou, čítající kolem 800-900 popsáných druhů, je kosmopolitně rozšířená čeleď Opecoelidae Ozaki, 1925. Dospělá stádia této čeledi parazitují zejména v trávicím traktu paprskoploutvých ryb a sporadicky také u paryb a obojživelníků (Bray & Cribb 2003; Cribb 2004). Vyskytuje se u sladkovodních i mořských druhů ryb, a to jak v litorálním pásmu, tak v pelagiálu, či dokonce i v bathyálu a abysálu. Čeleď byla stanovena na základě práce Ozaki, 1925, ve které byl popsán nominální rod *Opecoelus*. Tato čeleď není charakterizována žádným morfologicky specifickým znakem, ale spíše souhrnným množstvím znaků, které jsou ovšem běžné i u jiných čeledí motolic (Cribb 2004; Bray 2020).

Mezi charakteristické morfologické znaky této čeledi patrné na první pohled patří oválný až červovitý tvar těla a hladký tegument bez ostnů. Výjimku tvoří rod *Poracanthium*, který mívá charakteristické pole ostnů v oblasti genitálního póru (Cribb 2004). Na ventrální straně těla se nachází ústní i břišní přísavka a genitální pór, který je obvykle umístěn v pravé části motolice anteriorně od břišní přísavky či u jejího okraje. Břišní přísavka je zpravidla kruhová, nesespecializovaná a větší než ústní přísavka. Některé druhy např. *Anthochoanocotyle kihobo* mají břišní přísavku protáhlou a výrazně vystupující z těla. U podčeledi Opecoelinae se na anteriorním a posteriorním konci přísavky nachází výrazné papily, které jsou významným poznávacím znakem této podčeledi (Cribb 2004). Trávicí soustava je složená z ústního otvoru, prefarynxu, farynxu, jícnu a slepého střeva tvořícího dvě větve táhnoucí se až k zadnímu konci těla. Samčí pohlavní soustava je tvořena 2-10 varlaty a seminálního vezikulu, který bývá zcela obnažený (rod *Genitocotyle*) či krytý blanitým (rod *Anomalotrema*) či svalnatým (rod *Podocotyle*) cirrovým váčkem (Cribb 2004; Sokolov et al. 2019). Samičí pohlavní soustava je tvořena jedním vaječником, seminálním receptákulem, Laurerovým kanálkem a dělohou

umístěnou u většiny druhů mezi vaječником a genitálním pórem, avšak může zasahovat až ke konci zadní části těla (rod *Multivitellina*). Vitelária jsou rozprostřena po stranách těla, a to zejména v zadní části těla až celého těla. Vylučovací měchýř je protáhlý ve tvaru I (Cribb 2004).

Životní cyklus je zpravidla tříhostitelský, ale i zde byl zaznamenána u některých druhů redukce počtu hostitelů ve svém cyklu a vývoj progenetických stádií metacerkárií či náznaky pedomorfózy. Příkladem může být druh *Caudotestis sinitsini* (syn. *Plagioporus sinitsini*), u kterého byly již v prvním mezihostiteli plži *Elimia symmetrica* nalezeny pohlavně dospělí jedinci (Barger & Esch 2000). Prvním hostitelem je vždy plž, ve kterém se larvální stádia nepohlavně množí přes dvě generace sporocyst až k tvorbě cercárií. Celkově byla larvální stádia motolic čeledi Opecoelidae nalezena v 19 čeledích jak mořských, tak sladkovodních plžů (Barnett et al. 2014). Stádium rédie se u většiny druhů této čeledi nevyskytuje, avšak některé studie (Chubrik 1966) popisují vývoj cotylomikrocerkních cercárií v rédiích, a to u druhů *Cercaria inermis*, *C. bistilosa* a *Podocotyle enophrysi*. Ve studii Barnett et al. 2014 je však vysloven názor, že označení larválních stádií jako rédie, zvláště u druhu *P. enophrysi* mohla být mylná, a šlo by v tom případě o sporocysty.

Cerkárie jsou zpravidla cotylomikrocerkního typu. Tato forma je charakteristická zejména uzpůsobeným, na první pohled zakrnělým ocáskem v útvar zvaný protrusibilní papila. Ta slouží zejména k přichycení cercárie na pevném podkladu. Cerkárie se výhradně pohybují pomocí dobře k pohybu vyvinuté ústní a břišní přísavky po podkladu. Po přichycení papily k podkladu vykonávají cercárie krouživé pohyby, čímž se snaží vycítit pomocí svých smyslových orgánů pohyb jejich potenciálního druhého mezihostitele (Galaktionov 2003). Výjimku tvoří druh *Helicometra gibsoni*, u kterého cercárie mají klasický protáhlý ocásek uzpůsobený k pohybu ve vodním sloupci (Cribb 2004; Meenakshi et al. 1993). Tělo je zpravidla protáhlé, delší než ocásek a jsou na něm viditelné dvě výrazné přísavky, ústní a břišní, které pomáhají dohromady s ocáskem k pohybu a přichycení cercárie k podkladu. V přední části těla u obústí ústní přísavky mají cercárie umístěný stylet sloužící k penetraci do druhého mezihostitele, kterým může být široká škála živočichů, zejména korýši, hmyz, kroužkovci, ryby, ploštěnky, žahavci a plži. U některých druhů např. *Sphaerostomum bramae* může být jako druhý mezihostitel jiný jedinec téhož druhu plže, který jim sloužil jako první mezihostitel (Cable 1938; Chubb 1979; Cribb 2004). V nich přetrvává motolice ve stádiu metacerkárie, dokud není mezihostitel pozřen definitivním hostitelem. Definitivním hostitelem jsou zpravidla paprskoploutvé ryby, ale může jimi být také obojživelníci. V definitivních hostitelích bývají obvykle dospělá stádia lokalizována v trávicím traktu, ve většině případů ve střevě (Cribb 2004).

1.6 Adaptace životního cyklu a diverzita arktických mořských druhů motolic

V přímořských oblastech za polárním kruhem jsou motolice běžným parazitem mořských bezobratlých, ryb, ptáků a savců, ale i přesto zde druhová diverzita motolic bývá obvykle nižší než v oblastech temperátu. Příkladem může být druhová diverzita larválních stádií motolic nalezených u běžného plže pobřežních vod plážovky skalní (*Littorina saxatilis*). V temperátních litorálních oblastech Britských ostrovů je *L. saxatilis* primárním hostitelem až pro 26 druhů motolic, kdežto na Špicberkách je pouze pro 4-6 druhů (Galaktionov et al. 2019). Hlavním důvodem nižší druhové diverzity motolic v polárních oblastech je nižší druhová diverzita jejich prvních meziphostitelů, ke kterým mají motolice obvykle vysokou hostitelskou specifitu (Cribb et al. 2003; Galaktionov 2017). Dalšími faktory mohou být extrémní podmínky vnějšího prostředí (teplota, světlo, síla vodních proudů), které mívají zejména vliv na volně žijící stadia motolic (Galaktionov et al. 2019). Vyšší zeměpisná šířka nemá tak zásadní vliv na diverzitu motolic jako lokální abiotické podmínky, geografická izolovanost a biodiverzita studovaných oblastí se zastoupením vhodných hostitelů pro motolice (Galaktionov et al. 2019). V neposlední řadě může mít také vliv na lokální diverzitu a abundanci motolic parazitujících zejména u mořských ptáků přítomnost lidského osídlení, a to zejména přístavů, které lákají mořské ptactvo a jiné tvory přizpůsobující se na zbytecích z rybářských aktivit (Galaktionov & Bustnes 1999).

Na základě studií Klimpet et al., 2006 a Chambers, 2008 byla v arktických oblastech zjištěna podobná diverzita motolic, které se obvykle nacházejí ve svrchním batyálu nižších poloh zemské šířky. Některé druhy motolic nacházející se obvykle v rybách vylovených z hloubky vyšší jak 1000 m se v polárních oblastech nachází v nižších hloubkách odpovídající několika desítkám až stům metrů, což bylo prokázáno např. u druhů *Derogenes varicus* (Digenea: Derogenidae) či *Zoogonoides viviparus* (Digenea: Zoogonidae), (Bray & Kuchta 2006; Bray 2020; Manter 1955). Mezi základní adaptaci spojující jak polární, tak hlubinné druhy motolic je přizpůsobení se k chladným podmínkám, kdy teplota vody v prostřední se pohybuje kolem 4 °C. Výjimku mohou v případě polárních oblastí tvořit přílivová jezírka či v mořských hlubinách sopečné vývěry, kde může být teplota vody výrazně vyšší.

Jedním ze základních přizpůsobení parazitů žijících v temperátních a polárních oblastech je modifikace jejich životního cyklu na základě sezonality prostředí (Wharton, 1999). Základním faktorem, ovlivňujícím životní cyklus parazitů včetně motolic je pravděpodobnost nalezení dalšího hostitele volně žijícími stadii parazita. U motolic je tento fenomén především spjatý s vyplouváním cercárií z prvního meziphostitele. Během nepříznivých období např. chladných zim vyplouvání cercárií neprobíhá a také se zpomaluje vývoj sporocyst či redií (Galaktionov & Dobrovolskij 2003). U larválních stádií druhu *Podocotyle atomon* parazitujících v *L. saxatilis* na březích Barentsova moře byly pozorována dvě období, během kterých probíhalo vyplouvání cercárií, a to na jaře (duben – květen) a na podzim (září – říjen). U *L. saxatilis* infikovaných na jaře se mateřská sporocysta vyvíjí v létě a na podzim u nich probíhá rozmnožování a vývoj dceřiných sporocyst, načež se objevují i sporocysty

obsahující vyvíjející se cercárie. Během zimy se vývoj zpomalí a opět se obnoví až další jaro, kdy z nich začne vyplouvat další generace cercárií. U *L. saxatilis* infikovaných na podzim pobývá mateřská sporocysta v hostiteli celou zimu, načež se začne množit až na jaře a v pozdním létě a na podzim je vývoj zakončen následným vyplouváním cercárií (Galaktionov & Dobrovolskij 2003).

Vyplouvání cercárií je také obvykle ovlivněno cirkadiálním rytmem spjatým i se slapovými jevy. Studie Prokofiev et al. 2016, prováděna v letních měsících na pobřeží Barentsova a Bílého moře, poukazuje na odlišný denní rytmus vyplouvání cercárií u mnoha druhů motolic, které často sdílí stejný druh druhého mezihostitele. Příkladem mohou být druhy *Maritrema subdolum*, *Microphallus claviformis*, *Levinseniella brachysoma* (všechny 3 druhy z čeledi Microphallidae) a *P. atomon* (Opecoelidae), které sdílí stejnou skupinu druhých mezihostitelů, a to různonožců s převládajícím druhem *Gammarus setosus*. Tyto druhy se zejména liší ve strategii nalezení dalšího mezihostitele. Cercárie *M. subdolum* a *M. claviformis* aktivně pátrají po dalším mezihostiteli a jejich vyplouvání koreluje s nejvyšší teplotou a ozářením vody, která je často spjatá s podmínkami v jezírkách přílivové zóny, kdy různonožci obvykle přetrvávají v klidovém stavu, a tudíž je snadnější je aktivně dostihnout. Naproti tomu *L. brachysoma* a *P. atomon* volí strategii číhání, pro kterou je nejvýhodnější vyšší aktivita různonožců, která bývá obvykle během přílivu či za soumraku, kdy je jas i teplota vody nižší, s čímž koreluje i vyplouvání cercárií těchto dvou druhů (Prokofiev et al. 2016).

Další strategií, která je častá u motolic arktických oblastí, je absence volně žijících stádií motolic v jejich životním cyklu. Ze studie Galaktionov et al. 2019 zabývající se diverzitou larválních stádií motolic v populaci plže *L. saxatilis* z přílivových oblastí Pečorského moře vyplývá, že dominantně jsou zde zastoupeny motolice s dvouhostitelským cyklem (5 z 6 druhů), z čehož 4 druhy *Microphallus pygmaeus*, *M. piriformes*, *M. triangulatus* a *M. pseudopygmaeus* z čeledi Microphallidae (ve studii nazývány jako tzv. skupina „pygmeus“, ve zkratce MPG) zcela postrádají volně žijící larvální stádia, zatímco u druhu *Tristriata anatis* (Digenea: Notocotyliidae) dochází k vyplouvání cercárií do vnějšího prostředí a následně zapouzdření do stádia adoleskáríe. U zmíněných druhů rodu *Microphallus* bylo pozorováno líhnutí miracidíí ve střevě *L. saxatilis* po požití vajíčka, a také v tomtéž mezihostiteli byla pozorována metamorfóza cercárií do stádia metacercárie ještě v těle sporocysty (Galaktionov 2017; Galaktionov et al. 2019). Výhoda této adaptace je zamezení styku larválních stádií s nehostinnými podmínkami vnějšího prostředí. Díky této adaptaci tyto druhy dominují např. na exponovaných lokalitách se silnějšími mořskými proudy a proměnlivým prostředím (Galaktionov et al. 2019; Galaktionov & Bustnes 1999). Avšak i u těchto druhů byla zaznamenána nižší prevalence MPG v populaci *L. saxatilis* v severnějších lokalitách výzkumu (jižní pobřeží Nové Země), než je tomu v jižnějších lokalitách Bílého moře, kde bývá zpravidla přenos MPG na definitivního hostitele úspěšnější. Zpravidla ze severnějších lokalit jsou známy druhy motilic s tříhostitelským cyklem parazitujícími u plžů v sublitorálním pásu, které je obvykle charakterizováno stabilnějšími abiotickými podmínkami, než v přílivové zóně, kde dominují motolice s dvouhostitelským cyklem (Galaktionov 2017, Galaktionov et al. 2019).

1.6.1 Motolice čeledi Opecoelidae arktických oblastí severního Atlantiku a Severního ledového oceánu

Motolice čeledi Opecoelidae jsou běžnými parazity paprskoploutvých ryb a vodních měkkýšů v oblastech za polárním kruhem. Jedním z nejvíce prostudovaných druhů této oblasti je *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905. Jde o druh vyskytující se zejména v severním Atlantiku a Severním ledovém oceánu. Tento druh je vázán na populaci plžů rodu *Littorina* (plážovka) a *Lacuna*, vyskytující se obvykle v litorálních až přílivových zónách, obvykle se skalnatým podložím. Plži obou rodů hrají roli v jeho životním cyklu jako první mezihostitel (Køie 1981; Galaktionov et al. 2019). V jejich těle probíhá larvální vývoj spojený s partenogenetickým množením. Cerkárie jsou cotylomikrocerkního typu s charakteristickými chloupky rozestými po celém těle (Hunninen & Cable 1943). Z těla plže vyplouvají obvykle za soumraku, což koreluje s vyšší aktivitou jejich druhých mezihostitelů: různonožců např. rod *Gammarus* (*G. zaddachi*) (Hunninen & Cable, 1943; Prokofiev et al. 2016; Arundell et al. 2019). Dalšími rody, u kterých byl zaznamenán výskyt metacerkárií rodu *Podocotyle* jsou rody *Gammaracanthus* a *Onismus* (Galaktionov et al. 2021). U cercárií tohoto druhu byla pozorována strategie, kdy jsou přichyceni protrusibilní papilou k podkladu a vyčkávají na přítomnost různonožce. Cerkárie jsou schopné přežít ve vnějším prostředí mimořádně dlouhou dobu a vyčkávat až 6 dní (Galaktionov et al. 2019, Prokofiev et al. 2016). Cerkárie krouživým pohybem vnímá změny prostředí a poté aktivně reaguje na změnu proudu vody v její bezprostřední blízkosti odpovídající změně ~ 8 – 10 cm/s (Prokofiev 1994; Galaktionov et al. 2019). Cerkárie po přichycení na různonožce přímo penetrují jeho kutikulu, načez se poté ve většině případů na dorsální straně těla různonožce zapouzdří v jeho tělní dutině do stádia metacerkárie (Hunninen & Cable 1943; Arundell et al. 2019). Definitivní hostitel se poté infikuje pozřením nakaženého různonožce. Metacerkárie poté dospěje do pohlavního stádia a zůstává ve střevě hostitele. Jakožto definitivní hostitel *P. atomon* slouží široká škála druhů paprskoploutvých ryb zejména z čeledí Cottidae, Anarhichadidae, Gadidae, Gasterosteidae, Gobiidae, Pleuronectidae atd. (Kulkin et al. 2012; Zander 2003, 2006; databáze WoRMS 2021).

Mezi další druhy téhož rodu nacházející se v oblastech severního Atlantiku, zaznamenaná zejména z východního pobřeží Kanady a Norského moře patří *Podocotyle reflexa* (Creplin, 1825) Odhner, 1905 (Arthur & Albert 1994; Khan & Chandra 2006; Bakay 2011). Na rozdíl od *P. atomon* je pro *P. reflexa* prvním mezihostitelem sublitorální dravý plž surmovka vlnitá (*Buccinum undatum*) a *B. cyaneum* (Køie 1981; Galaktionov et al. 2021). Druhým mezihostitelem mohou být pro tento druh mimo různonožce také vidlonožci či některé druhy decapodních korýšů např. garnát obecný (*Crangon crangon*), (Køie 1981). Druhovému složení definitivních hostitelů je podobné jako u *P. atomon* (Arthur & Albert 1994; Khan & Chandra 2006; databáze WoRMS 2021).

Dalšími druhy motolic čeledi Opecoelidae, vyskytujícími se za polárním kruhem v severním Atlantiku jsou *Helicometra insolita* (hostitel: *Leptoclinus maculatus*, lokalita: Svalbard), *Anomalotrema*

koiae (hostitel: *Sebastes mentella*, lokalita: Norské moře), *Caudotestis (Anisorchis) opisthorchis* (hostitel: *Leptagonus decagonus*, lokalita: Barentsovo moře), *Stenakron vetustum* (hostitel: *Gymnocanthus tricuspis*, lokalita: Barentsovo moře) *Peracreadium commune* (hostitel: *Myoxocephalus scorpius*, lokalita: Norské moře), *Podocotyle angulata* (hostitel: *Gadus morhua*, lokalita: Labradorské moře) a mnohé další (Polyanski 1955; Bakay 2011; Murzina et al. 2019; Münster et al. 2015). Z uvedených druhů je pouze u druhu *H. insolita* vyvozeno na základě její rodové příslušnosti, že jejím druhým mezihostitelem by mohli být taktéž různonožci (Murzina et al. 2019).

1.6.2 Životní cyklus motolic čeledi Opecoelidae v zátocě Petuniabukta, Svalbard

Během expedic a terénních kurzů pořádaných CPE byla důkladně zdokumentována helmintofauna litorálních vod zátoky Petuniabukta. Na základě morfologických vlastností byla zařazena larvální stádia motolic z plžů *Buccinum glaciale*, *B. undatum*, *Plicifusus kroyeri* (obecně označovány jako surmovky) do čeledi Opecoelidae (CPE 2009; 2012). Surmovky jsou draví plži vyskytující se převážně v litorálním až sublitorálním pásmu na měkkém podloží. Živí se převážně mlži, kroužkovci, korýši či mršinami. Do schránek korýšů či mlžů jsou schopni radulou vyvrtat otvor, do kterého poté vstříknou trávicí enzymy, načež mohou začít přijímat natrávenou potravu (Himmelman & Hamel 1993).

U cercárií nebylo zaznamenáno vyplouvání z těla plže za přirozených i experimentálních podmínek, při kterých byla v nádobách se surmovkami měněna teplota vody, její osvětlení či byly nádoby s nimi umísťovány do různých hloubek (Ditrich a Bednářová, nepublikovaná data).

V roce 2013 byl proveden experiment, který měl za cíl objasnit druhého mezihostitele opecoelidních larválních stádií. V rámci experimentu byli různonožci rodu *Gammarus* a *Onisimus* uměle infikováni cercáriemi tím, že jim byl podáván jako potrava hepatopankreas nakažených plžů. Experiment proběhl úspěšně a v různonožcích byly ve svalovině prokázány metacercárie. Experimentu ještě předcházela pitva více jak 500 různonožců, přičemž v ani jednom jedinci nebyla infekce metacercáriemi prokázána (CPE 2013; Ditrich, nepublikovaná data).

Různonožci jsou běžnými korýši obývajícími dno, porosty mořských řas a také bývají často nalézáni na plovoucím ledu, kde se živí nárosty řas. Různonožci jsou výhradně detritofágové, fytofágové, mrchožrouti a některé druhy jsou i aktivními predátory.

Dospělá stádia opecoelidních motolic byla v zátocě Petuniabukta nalezena ve vrance mořské (*Myoxocephalus scorpius* Linnaeus, 1758) a vrance severní (*Gymnocanthus tricuspis* Reinhardt, 1830). Jde o bentické druhy ryb z čeledi vrankovití (Cottidae), které běžně obývají litorální vody severního Atlantiku a Severního ledového oceánu. Živí se zejména korýši, mlži, kroužkovci a *M. scorpius* také menšími druhy ryb, kdy u větších jedinců *M. scorpius* byl zaznamenán také kanibalismus (Gray et al. 2017). *Myoxocephalus scorpius* obývá zejména chalužové porosty s kamenitým, šterkovitým či písčitém dnem. *Gymnocanthus tricuspis* preferuje litorální biotopy, často poblíž tajících ledovců či ústí ledovcových toků, s písčitém či bahnitým dnem, kde se může snadno zahrabat v případě ohrožení (Brand & Fischer 2016; Fishbase 2021). Dle morfologie a morfometrických parametrů byly opecoelidní

motolice v těchto druzích vranek klasifikovaný jako druh *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905, který již má v odborné literatuře zdokumentovaný svůj životní cyklus a byl již u *M. scorpius* a *G. tricuspis* nalezen; viz Diverzita motolic arktických moří a jejich adaptace životního cyklu (Otáhal 2015; Nicol 1907; Issaitschikov 1928; Polyansky 1955).

V rámci bakalářské práce Novotný 2019 byla na základě sekvencí genu 28S rDNA (velká ribosomální podjednotka) prokázána příbuznost mezi larválními stádii vyskytujícími se v surmovkách a dospělými stádii v *G. tricuspis*. Sekvence byly na základě použití metod maximální věrohodnosti a bayesiánské inference klastrovány se sekvencí druhu *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 z databáze GenBank ze studie Sokolov et al. 2018. Jde o druh opecoelidní motolice z podčeledi Opecoelinae, která byla popsána z mníka čtyřvousého (*Enchelyopus cimbrius*) (Gibson & Bray 1984). Dále byl také zdokumentován u pěti druhů okouníků (*Helicolenus dactylopterus*, *Sebastes fasciatus*, *S. mentella*, *S. norvegicus* a *S. viviparus*), hranáče *Eumicrotremus fedorovi*, mníkovce *Phycis chesteri* a dvou druhů platýsů (*Hippoglossus hippoglossus* a *Reinhardtius hippoglossoides*) (Gibson & Bray 1984; Gibson 1996). Většina druhů hostitelských ryb patří mezi bathydemersální až bentopelagické druhy vyskytující se v hloubkách několika desítek metrů až jednoho kilometru pod hladinou a živící se zejména bentickými bezobratlými živočichy a rybami (Martell & McClelland 1994; Dolgov & Drevetnyak 2011). Životní cyklus *A. koiae* dosud není v odborné literatuře popsán.

2. Cíle práce

1. Pomocí molekulární fylogenetické analýzy popsat životní cyklus motolice druhu *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Digenea: Opecoelidae) v zátocce Petuniabukta na souostroví Svalbard.
2. Data z molekulární studie rozšířit o morfologickou analýzu larválních i dospělých stádií motolic.
3. Poznatky a výsledky z obou analýz přispět k celkovému pochopení ekologických vztahů litorálních oblastí souostroví Svalbard.

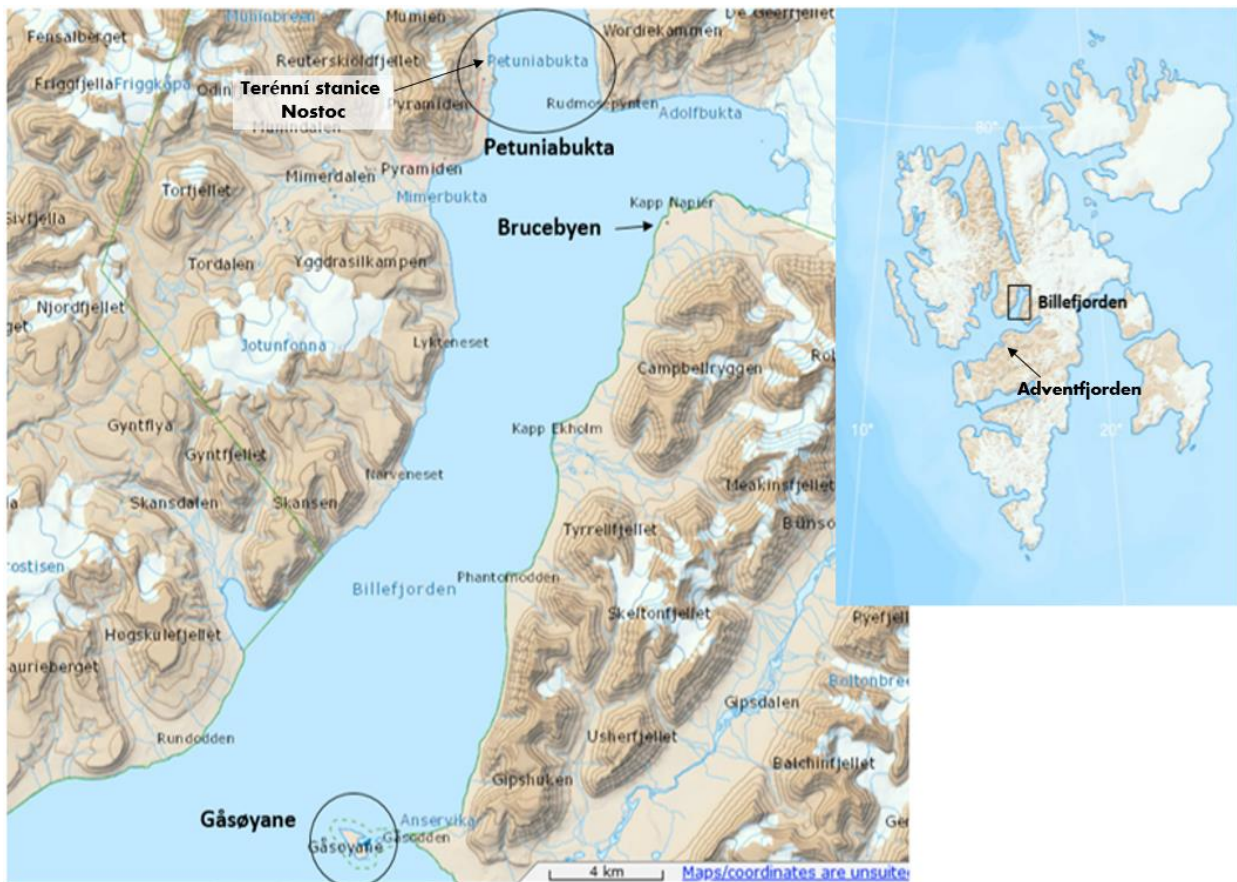
3. Materiály a metody

3.1 Sběr materiálu:

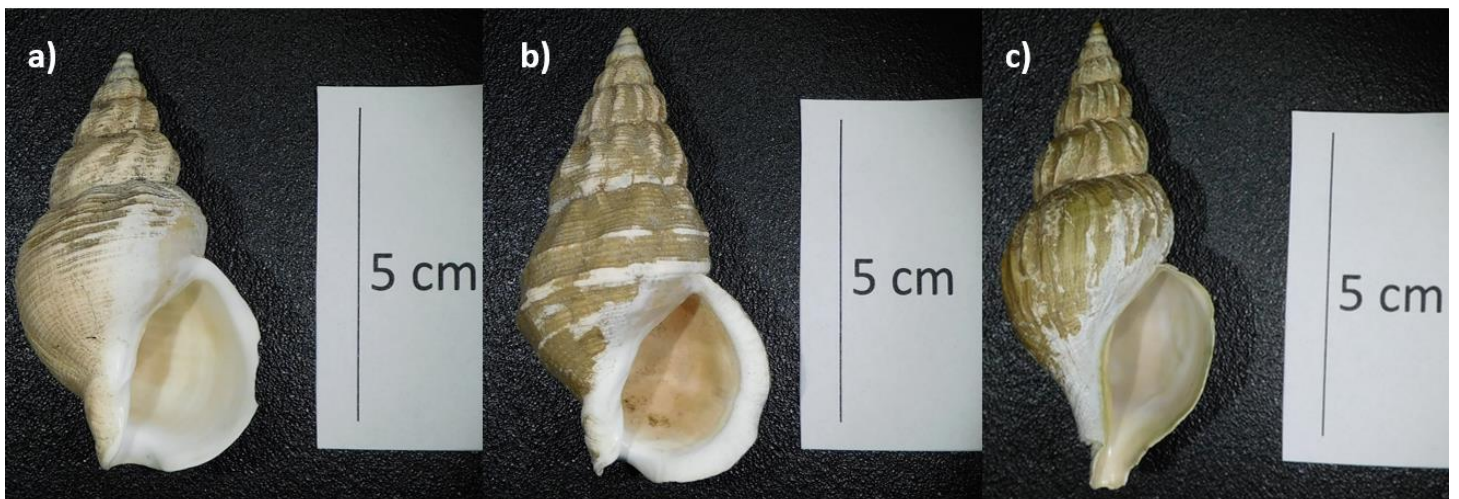
Sběr vzorků probíhal v rámci letních kurzů Centra polární ekologie od roku 2008 - 2018 probíhající od června do září. Převážná část hostitelských druhů vranek (*M. scorpius*, *G. tricuspis*) (Obr. 3) i surmovek (Obr. 2) byla odchycena zejména v zátocě Petuniabukta a menší množství vzorků bylo také odebráno také ve vedlejší zátocě Adolfbukta poblíž osady Brucebyen, přilehlých Husích ostrovech (Gåsøyane) a zálivu Adventfjorden (

Obr. 1). Mimo záliv Adventfjorden jde o mělké zátoky nepřesahující hloubku 20 m a jsou součástí většího zálivu Billefjorden, nacházejícího se na západním pobřeží ostrova Spitzbergen. Na západním pobřeží této zátoky se nachází terénní stanice Nostoc náležící Centru polární ekologie (78° 40' 50" N; 16° 27' 29" E). Vranky byly loveny obvykle v hloubkách mezi 5 - 15 m pomocí sítí na ryby tzv. tenat, zatímco surmovky (Obr. 2) se chytaly jak do tenat nastražených na ryby, tak na jejich sběr byly využity i krabicové pasti na kraby, které byly nastraženy v rozmezí 5 – 20 m hloubky. Některé surmovky byly nasbírány také ručně při ponorech. Ryby byly humánně zabity až před parazitologickou pitvou, poté byla změřena jejich délka a následně byli izolováni makroparaziti z ploutví, žaber, břišní dutiny a trávicího traktu (

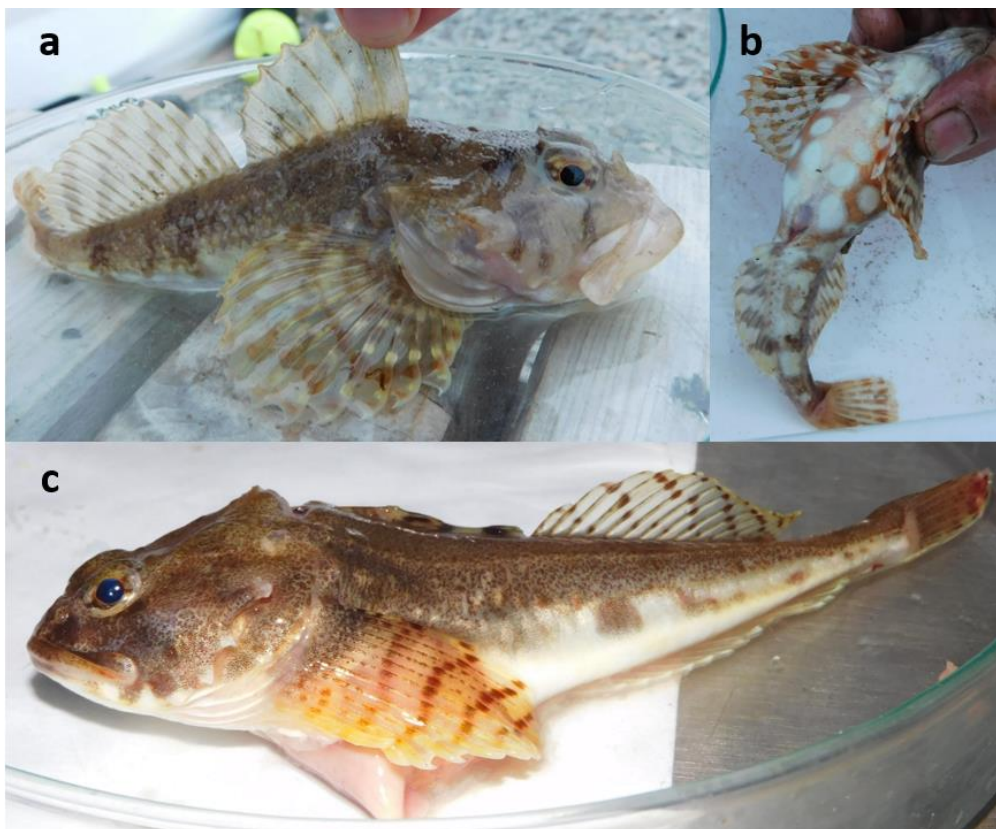
Obr. 3). Sporocysty a cercárie byly získány přímo z hepatopankreatické žlázy plže. U cercárií nebylo pozorováno vyplouvání z těla plže do vnějšího prostředí, i pokud byly v prostředí změněny teplotní či světelné podmínky. Paraziti určené pro molekulární analýzu byli ihned fixováni v 96% etanolu a pro morfologickou analýzu v horkém 10% formalínu (neutral buffered formalin, NBF). Veškeré vzorky parazitů byly poté převezeny do laboratoří Centra polární ekologie sídlícího v Českých Budějovicích, kde na nich byly provedeny podrobnější molekulární a morfologické analýzy.



Obr. 1: Mapa s vyznačenými lokalitami odběru vzorků (vlevo mapa zálivu Billefjorden, vpravo nahoře mapa souostroví Svalbard), (toposvalbard.npolar.no).



Obr. 2: Běžní plži čeledi Buccinidae (surmovky) vyskytující se v zátoce Petuniabukta, Svalbard: **a)** *Buccinum undatum*, **b)** *Buccinum glaciale*, **c)** *Plicifusus kroyeri*.



Obr. 3: Běžní definitivní hostitelé motolic čeledi Opecoelidae v zátoce Petuniabukta: **a** – samice vranky mořské (*Myoxocephalus scorpius*), **b** – samec *M. scorpius* s charakteristickou kresbou na bříše, **c** – vranka severní (*Gymnocanthus tricuspis*).

Pro porovnání DNA sekvencí chybějících v databázi GeneBank (National Center for Biotechnology Information), zejména to platí pro gen ITS2, jsem zažádal o zapůjčení vzorků čtyř referenčních druhů motolic (*Anomalotrema koiae* (hostitel *Enchylopus cimbrius*), *Macvicaria maccasarensis* (hostitel *Lethrinus miniatus*), *Podocotyloides stenometra* (hostitel *Chaetodon lunula*) a *Pseudopecoeloides tenuis* (hostitel neznámý)) z Přírodopisného muzea (Natural History Museum) sídlícího v Londýně. Pro morfologické srovnání mi byly poskytnuty vzorky z helmintologické sbírky Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v. v. i. v Českých Budějovicích druhů *Podocotyle atomon*, *Anomalotrema koiae* a *Steringophorus furciger*.

3.2 Molekulární analýza

Pro molekulární analýzu byly použity vzorky fixované v 96% etanolu. Před lýzí vzorků byly vzorky vysušeny ve vakuovaném koncentrátoru (Concentrator plus, Eppendorf), aby byly zbaveny veškerého etanolu. Izolace a purifikace DNA byla poté provedena za použití izolačních kitů využívající kolonky s křemíkovou (silica) membránou GeneAll SV mini a Macherey - Nagel Nucleo Spin tissue,

kdy bylo postupováno dle návodů výrobce či pomocí metody využívající fenol - chloroform. Izolovaná DNA byla poté skladována při teplotě -20 °C.

Pro DNA amplifikaci byly vybrány 2 markery; D1 – D3 oblasti genu pro velkou ribosomální podjednotku (28S rDNA) a internal transcribed spacer 2 (ITS2) umístěný mezi geny pro 28S rDNA a 5.8S rDNA (Martin et al. 2017a; Nolan & Cribb 2005). 28S rDNA je molekulární marker často využívající se v evoluční biologii pro vyhodnocení širších fylogenetických vztahů různých skupin eukaryotních organismů, zatímco díky citlivějšímu ITS2 markeru lze od sebe odlišit i dva blízce si příbuzné druhy motolic či se dá využít na studium biogeografie jednotlivých druhů a jejich subpopulací (Morgan & Blaire 1995).

Pro amplifikaci genů byly využity PPP Master mix (Top-Bio), PCR H₂O (Top-Bio) a DNA primery (Tab. 1). Veškeré zmíněné chemikálie byly uchovávány při teplotě – 20 °C a během přípravy vzorků pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) byly po dobu přípravy uchovávány v termobloku CH-100 Heating/Cooling Dry Block (Biosan) při teplotě 6 °C.

Tab. 1: Seznam primerů, které byly využity během amplifikace genů metodou PCR.

Marker	Orientace	Druh primeru	Zdroj
28S rDNA	F	LSU5: 5'-TAG GTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC-3'	Littlewood (1994)
	R	1500R: 5'-GCT ATC CTG AGG GAA ACT TCG-3'	Snyder and Tkach (2001)
ITS2 rDNA	F	3S: 5'-GGT ACC GGT GGA TCA CGT GGC TAGTG-3'	Morgan and Blair (1995)
	R	ITS2.2: 5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3'	Cribb, Anderson, Adlard, and Bray (1998)

*F- přední (forward) primer, R- zpětný (reverse) primer

PCR byla provedena pro všechny 3 markery v T100 Thermal cycleru (BIO RAD) a to v následujících denaturačních - nasedajících - prodlužovacích cyklech:

- 28S rDNA: 1x (4 min. 95 °C), 30x (1 min. 95 °C, 1 min. 56 °C, 2 min. 72 °C), 1x (1 min. 95 °C, 45 s 55 °C, 4 min. 72 °C) (Martin et al. 2017a).
- ITS2 rDNA: 1x (3 min. 95 °C, 2 min. 45 °C, 90 s 72 °C), 4x (45 s 95 °C, 45 s 50 °C, 90s 72 °C), 30x (20 s 95 °C, 20 s 52 °C, 90 s 72 °C), 1x (5 min. 72 °C) (Martin et al. 2017a).

Následně byla přítomnost PCR produktů a jejich délka prokázána podrobena gelovou elektroforézou na 1% agarózovém gelu, do kterého byly přidány 2 µl GoodView Nucleic Acid Stain (SBS Genetech). Jako DNA marker byl použit 100 bp DNA ladder (Solis BioDyne) a pro vizualizaci PCR produktů v průběhu elektroforézy byl využit Yellow loading buffer (Top-Bio). Gelová elektroforéza běžela po dobu 45 min. při elektrickém napětí 70 V. Výsledky gelové elektroforézy byly následně vizualizovány pomocí UV transiluminátoru NuGenius (Syngene) při vlnové délce 302 nm.

Pozitivní vzorky byly poté enzymaticky přečištěny pomocí použitím mixu 0,5 µl Exo I (Exonuclease I z *E. coli*, Thermo Scientific, 20 000 U/ml) a 2 µl FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase; Thermo - Fisher Scientific 1 u/µl) a 2,5 µl H₂O v termocycleru T100 Thermal cycler (BIO RAD) při teplotě 37 °C na 15 min. a dalších 15 min. na 80 °C. Přečištěné PCR produkty byly poté zaslány na sekvenaci pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit na sekvenátoru ABI3130 (SEQme, ČR) za použití PCR primerů.

3.3 Fylogenetická analýza

DNA sekvence byly manuálně seřazeny a editovány v programu Geneious Prime 2020.2.4 (Biomatters Ltd.), kdy byly veškeré získané sekvence ořezány o špatně osekvenované konce. Špatně osekvenované sekvence nebo sekvence se slabým signálem byly z celkového výčtu vyřazeny. Dále byly získané sekvence srovnány s podobnými DNA sekvencemi získanými z databáze GeneBank (National Center for Biotechnology Information), k čemuž také pomohl internetový vyhledávací program Standard Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information). Jako outgroup byly zpravidla vybírány DNA sekvence motolic z blízkce příbuzných čeledí. Následně byla provedena editace a srovnání jak na vlastních, tak získaných sekvencích, kdy byly veškeré sekvence daného genu srovnány a zkráceny na totožnou délku. Pro tento proces byl využit plugin MAFFT v. 6 (Kato et al. 2002, 2005) v programu Geneious Prime. Následně fylogenetické vztahy mezi motolicemi byly rekonstruovány pomocí dvou fylogenetických analýz. První z nich je analýza Maximální věrohodnosti (Maximum likelihood, ML) modelem GTR se čtyřmi kategoriemi, který byl zvolen na základě článku Martin et al. 2017a. Bootstrapová podpora byla získána na základě 1000 opakování metodou ultrafast bootstrap. Pro tuto analýzu byl využit plugin PHyML 3.3.20180621 v Programu Geneious Prime (Guindon et al. 2010). Druhou provedenou fylogenetickou analýzou byla Bayesianovská analýza (Bayesian inference, BI). Analýza byla provedena pomocí pluginu MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) v programu Geneious Prime pomocí modelu (GTR+ Γ se čtyřmi kategoriemi) pro 1 000 000 generací, přičemž 100 000 vzorků bylo vyřazeno jako „burn in“ (Martin et al. 2017a). Na závěrečnou úpravu kladogramů byl využit program Inkscape 1.0.1 (Inkscape Project 2020).

3.4 Morfologická analýza

Pro morfologickou analýzu byly určeny vzorky fixované v NBF, ze kterých byly zhotoveny barvené trvalé mikroskopické preparáty.

3.4.1 Příprava mikroskopických trvalých preparátů

V první fázi přípravy preparátů byly veškeré vybrané vzorky vymyty a zavodněny destilovanou vodou dvakrát po dobu pěti minut. Poté bylo provedeno barvení pomocí železitého acetokarmínu, sloužícího v této práci především pro zvýraznění tkáňových a orgánových struktur v těle, avšak dají se tím barvit také chromosomy (Belling 1926; Pokora & Szilman 1991). Délka trvání tohoto procesu závisela na typu vzorku, kdy dospělá stádia motolic se barvila výrazně pomaleji (průměrně 5 hodin) než sporocysty a cercárie, u kterých stačilo barvit 1 hodinu. Po barvení přicházelo odbarvování vzorků v kyselém 70% etanolu (1 ml HCl v 1000 ml etanolu). Tento proces byl průběžně kontrolován, jelikož u každého vzorku trval rozdílnou dobu. U cercárií šlo o jednotky minut a u dospělých stádií mohlo jít o proces probíhající až 3 hodiny. Po odbarvení byly vzorky odvodněny alkoholovou řadou 70%, 80%, 90%, 96% a absolutního etanolu, přičemž v každé sekci zůstávaly vzorky 10 minut. Následně byly vzorky projasněny. Pro dospělá stádia se použil 50% roztok (1:1 s absolutním etanolem) a 100% roztok hřebíčkového oleje. Na projasnění larválních stádií se mi více osvědčil xylen. V projasňujícím roztoku zůstávaly vzorky maximálně 5 minut. V posledním kroku byly vzorky zality kanadským balzámem mezi podložním a krycím sklem, čímž byl vytvořen trvalý mikroskopický preparát, který byl poté využit na studium morfologie a morfometrie motolic.

3.4.2 Morfometrické měření

Následné měření jsem prováděl na mikroskopu Olympus BX53 s digitální kamerou Olympus DP74 pomocí programu cellSens Standard 1.18 (Olympus). V rámci této práce jsem u dospělých stádií motolic změřil veškeré parametry dle Martin et al. 2020. U cercárií byl protokol vytvořen na základě práce Branett et al. 2014 a dalších morfometrických charakteristik, které jsem byl z trvalých preparátů s jistotou schopen vyčíst a změřit.

Nákresy dospělých stádií a cercárií motolic jsem zhotovil v laboratoři Parazitologického ústavu AV ČR s pomocí mikroskopu Olympus BX51 s instalovaným kreslícím zařízením.

3.4.3 Elektronová mikroskopie

Pro morfologický popis zejména povrchových struktur larválních stádií motolic mi byly poskytnuty také fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) JEOL JSM-7401F, který náleží laboratoři elektronové mikroskopie, která spadá pod Parazitologický ústav AV ČR. Fotografie pochází z roku 2009 a zobrazují cercárie izolované ze surmovek rodu *Buccinum*.

4. Výsledky

4.1 Výsledky parazitologických pitev:

Během let 2009 – 2018 bylo na Svalbardu v zátocě Petuniabukta a jejím okolí (protějšá zátoka Adolfbukta, záliv Billefjorden, souostroví Gåsøyane, záliv Adventfjorden; viz Obr. č. 1) chyceno a parazitologicky vyšetřeno 697 vranek mořských (*Myoxocephalus scorpius*), 249 vranek severních (*Gymnocanthus tricuspis*), 642 surmovek (*Buccinum* spp.) a 13 surmovek *Plicifusus kroyeri*. Prevalence motolic během posledního odběru vzorků od června do září roku 2018, kterého jsem se sám účastnil, byla u *M. scorpius* 43% a u *G. tricuspis* 38% (viz Tab. 2). Prevalence larválních stádií motolic čeledi Opecoelidae v surmovkách byla v roce 2018 10% u *B. undatum*, 0% u *B. glaciale* a *B. polare* a 20% u *P. kroyeri* (viz Tab. 2).

Tab. 2: Seznam vyšetřených potenciálních hostitelů motolice *Anomalotrema koiae* v zátocě Petuniabukta a zálivu Adventfjorden v roce 2018. Prevalence byla spočtena jako procentuální podíl infikovaných jedinců k celkovému počtu vyšetřených jedinců.

Hostitelský druh	Počet vyšetřených jedinců	Počet pozitivně infikovaných jedinců	Prevalence (%)
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	41	19	46,3
<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	32	12	37,5
<i>Buccinum undatum</i>	31	3	9,7
<i>Buccinum glaciale</i>	11	0	0
<i>Buccinum polare</i>	4	0	0
<i>Plicifusus kroyeri</i>	5	1	20

4.2 Molekulární analýzy

Pro molekulární analýzy byly použity vzorky z let 2009, 2010, 2011 a 2014 a 2018. Celkově bylo získáno z motolic 27 sekvencí genu 28S rDNA a 12 sekvencí markeru ITS2 (Tab. 3).

Tab. 3: Seznam získaných DNA sekvencí motolic

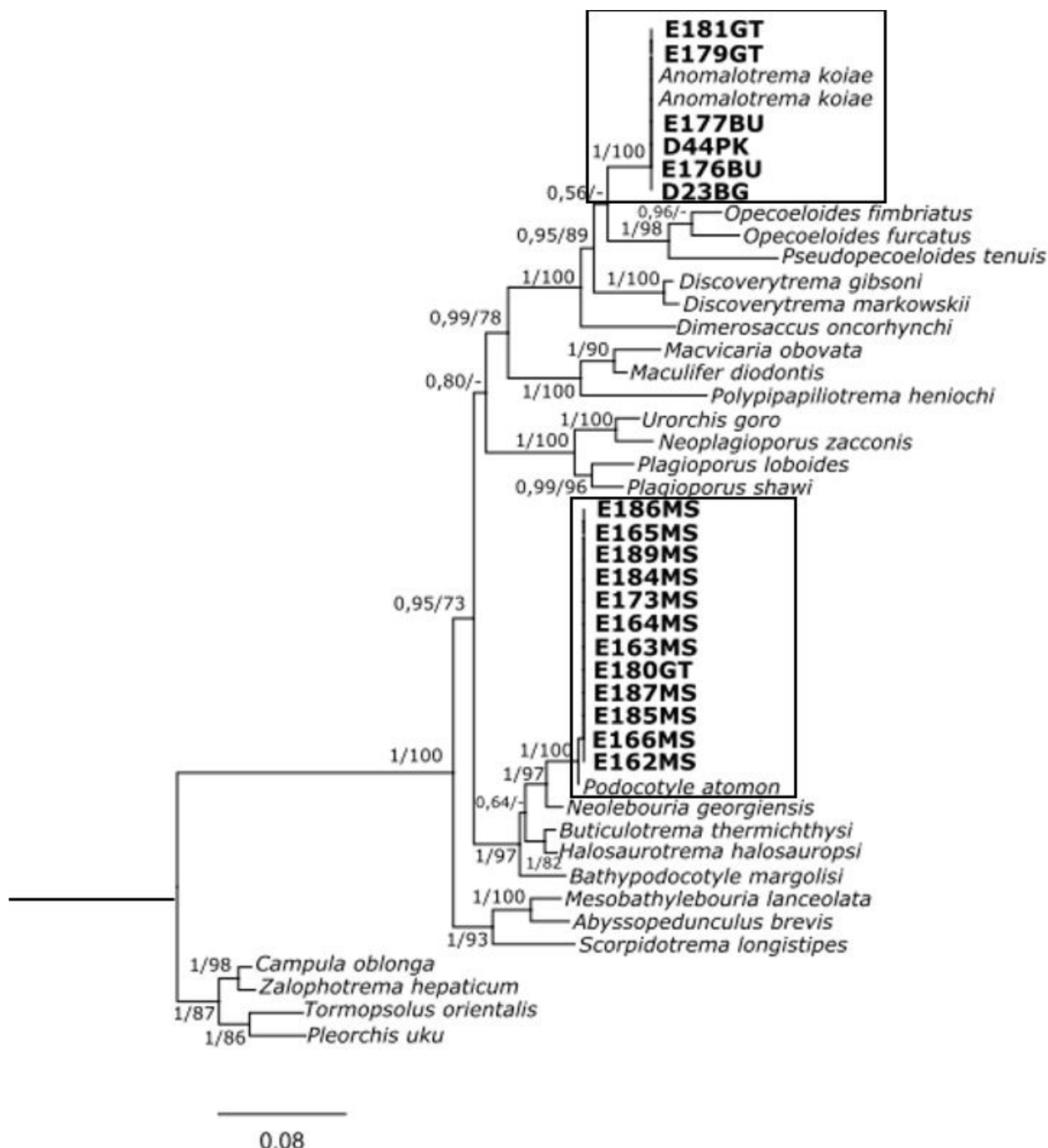
Hostitelský druh	28S rDNA	ITS2 rDNA
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	12	5
<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	9	2
<i>Buccinum undatum</i>	2	2
<i>Buccinum glaciale</i>	1	1
<i>Plicifusus kroyeri</i>	1	1

Pomocí získaných sekvencí, příbuzných sekvencí z databáze GenBank a sekvencí získaných ze vzorků z Přírodopisného muzea byly vymodelovány kladogramy fylogenetických vztahů pomocí metod maximální věrohodnosti a bayesiánské inference. Cílem této analýzy je prokázat příbuznost sekvencí různých stádií motolic z odlišných hostitelů, na jehož základě by poté šel popsat životní cyklus motolice. Pro každý druh sekvence (markeru) byl vymodelován zvláště kladogram s rozdílným seznamem sekvencí, které byly pro tuto analýzu v databázi GenBank v době psaní této práce dostupné.

Pro modelaci kladogramu fylogenetických vztahů pro gen 28S rDNA jsem použil 18 získaných sekvencí ze Svalbardu a 27 sekvencí z databáze GenBank (Tab. 4). Jako outgroup byly použity čtyři sekvence pocházejících z motolic ze sesterských čeledí čeledi Opecoelidae, a to dvě z příslušníků čeledi Brachycladiidae (*Campula oblonga*, *Zalophotrema hepaticum*) a dvě z příslušníků čeledi Acanthocolpidae (*Pleorchis uku*, *Tormopsolus orientalis*). Sekvence byly srovnány a zkráceny na totožnou délku 999 nukleotidových bází a následně byl kladogram vytvořen pomocí metod ML a BI (Obr. 4). Z kladogramu lze vyčíst, že 12 sekvencí (11 z dospělých stádií z *M. scorpius* a 1 z dospělého stádia z *G. tricuspis*) se seskupilo se sekvencí druhu *Podocotyle atomon*. S referenční sekvencí jsou si identické na 99,63% – 99,72%, což odpovídá rozdílu 3 – 5 nukleotidových bází. Dále se zde také seskupilo 6 sekvencí (2 z dospělých stádií z *G. tricuspis*, 2 z larválních stádií z *B. undatum*, 1 z *B. glaciale* a 1 z *P.kroyeri*) s referenční sekvencí druhu *Anomalotrema koiae*. S ní si byly sekvence identické na 98,76% - 100% což odpovídá rozdílu 0 – 28 nukleotidových bází, přičemž jediná sekvence, která se lišila o více, než 1% byla z larválních stádií ze surmovky *B. glaciale*.

Tab. 4: Seznam sekvencí 28S rDNA získaných z databáze GenBank využitých na modelování kladogramu fyl. vztahů.

Druh motolice	Kód v databázi GenBank	Reference
<i>Abyssopedunculus brevis</i>	KJ001212.1	Andres et al. 2014
<i>Anomalotrema koiae</i>	MH161429.1	Sokolov et al. 2019
<i>Anomalotrema koiae</i>	KU320595.1	Bray et al. 2016
<i>Bathypodocotyle margolisi</i>	KU320596.1	Bray et al. 2016
<i>Buticulotrema thermichthysi</i>	KF733984.1	Bray et al. 2014
<i>Campula oblonga</i>	KM258671.1	Fraija-Fernández et al. 2015
<i>Dimerosaccus oncorhynchi</i>	FR870254.1	Shedko et al. 2015
<i>Discoverytrema gibsoni</i>	MH161430.1	Sokolov et al. 2019
<i>Discoverytrema markowskii</i>	MH161431.1	Sokolov et al. 2019
<i>Halosaurotrema halosauropsi</i>	AY222207.1	Olson et al. 2003
<i>Maculifer diodontis</i>	MH933879.1	Martin et al. 2018
<i>Macvicaria obovata</i>	JQ694147.1	Born-Torrijos et al. 2012
<i>Mesobathylebouria lanceolata</i>	KJ001210.1	Andres et al. 2014
<i>Neolebouria georgiensis</i>	MH892478.1	Faltynkova et al. 2017
<i>Neoplagioporus zacconis</i>	KX553949.1	Fayton & Andres 2016
<i>Opecoeloides fimbriatus</i>	KJ001211.1	Andres et al. 2014
<i>Opecoeloides furcatus</i>	AF151937.1	Tkach et al. 2000
<i>Plagiocirrus loboides</i>	EF523477.1	Curran et al. 2007
<i>Plagioporus shawi</i>	KX553951.1	Fayton & Andres 2016
<i>Pleorchis uku</i>	DQ248216.1	Bray et al. 2005
<i>Podocotyle atomon</i>	MH161437.1	Sokolov et al. 2019
<i>Polypipapiliotrema heniochi</i>	MF926406.1	Martin et al. 2017b
<i>Pseudopecoeloides tenuis</i>	KU320605.1	Bray et al. 2016
<i>Scorpidotrema longistipes</i>	MK052936.1	Martin et al. 2019
<i>Tormopsolus orientalis</i>	DQ248217.1	Bray et al. 2005
<i>Urorchis goro</i>	KX553946.1	Fayton & Andres 2016
<i>Zalophotrema hepaticum</i>	AY222255.1	Olson et al. 2003



Obr. 4: Kladogram fylogenetických vztahů motolic čeledi Opcoelidae vytvořený na základě analýz ML a BI genu pro velkou ribosomální podjednotku (28S rDNA). Čísla na uzlech značí apriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP)/ bootstrap hodnotu, přičemž jsou uváděny hodnoty u PP přesahující hodnotu 0,50 a ML bootstrap přesahující 70%. Vzorčky nasbírané na Svalbardu jsou tučně zvýrazněné a jsou označené kódem + iniciály druhu hostitele, ze kterého byly motolice odebrány (BG – *Buccinum glaciale*, BU – *Buccinum undatum*, GT- *Gymnocanthus tricuspis*, MS – *Myoxocephalus scorpius*, PK – *Plicifusus kroyeri*). Obdelníkem jsou vyznačeny sekvence ze Svalbardu a sekvence druhu motolice z databáze GenBank, se kterou se získané sekvence seskupily.

Dále byly vzorky z analýzy markeru 28S rDNA podrobeny stejným analýzám pro vybudování kladogramu fylogenetických vztahů pro marker ITS2, který je zpravidla druhově specifičtější, a tudíž může přinést věrohodnější výsledky (

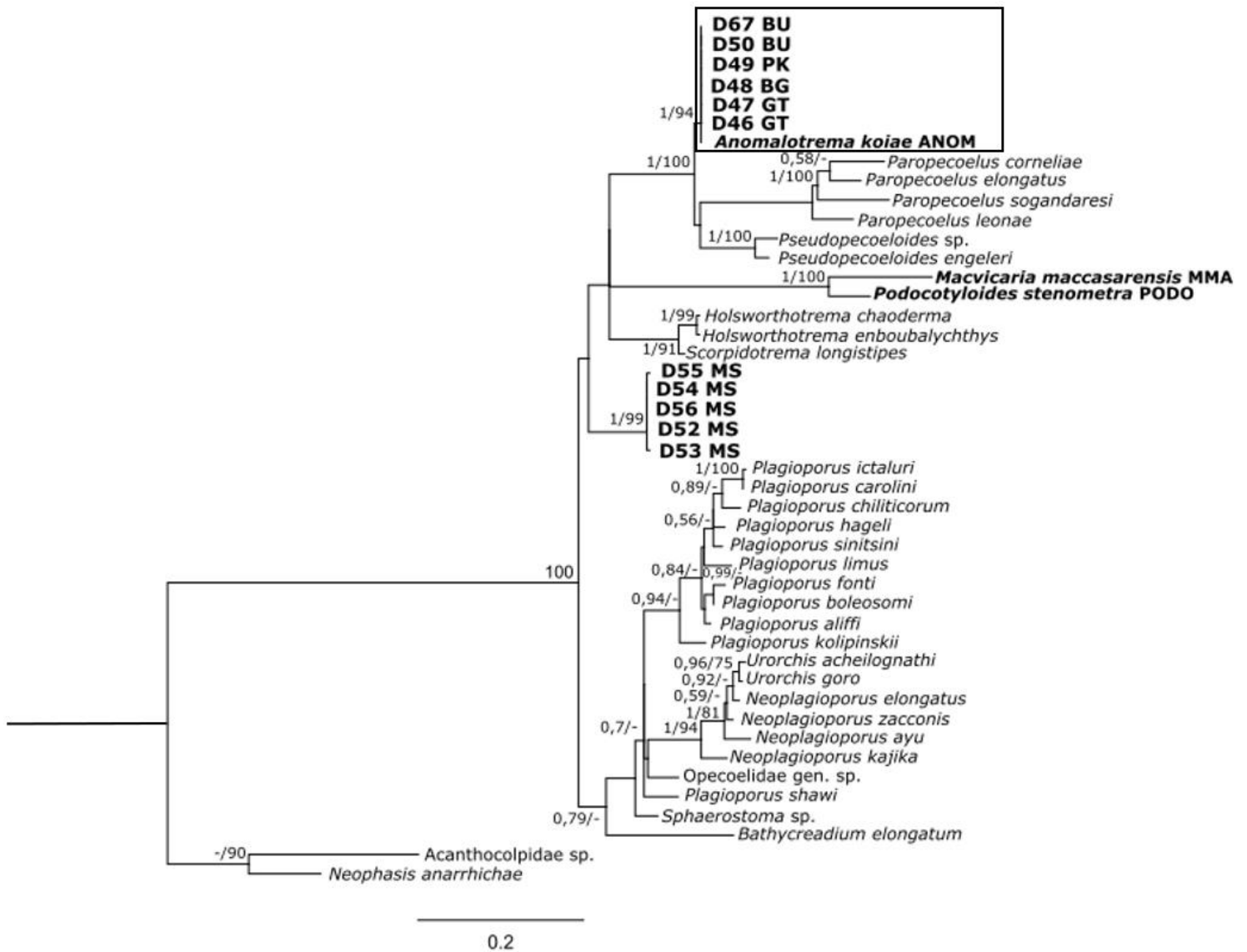
Obr. 5). Tato analýza už byla zaměřena specificky na vzorky, které se v předchozí analýze seřazovaly s druhem *Anomalotrema koiae* a jejichž sekvence pocházely jak z larválních stádií motolic z prvních mezihostitelů *B. undatum*, *B. glaciale* a *P. kroyeri*, tak z dospělých stádií motolic z definitivního hostitele *G. tricuspis*. Pro tvorbu kladogramu pro gen ITS2 bylo použito 11 sekvencí získaných ze vzorků ze Svalbardu (5 z dospělých stádií z *M. scorpius*, 2 z *G. tricuspis*, 2 z larválních stádií z *B. undatum*, 1 z *B. glaciale* a 1 z *P. kroyeri*), 3 referenční sekvence získané ze vzorků z Přírodopisného muzea (*Anomalotrema koiae*, *Macvicaria maccasarensis* a *Podocotyloides stenometra*) a 31 sekvencí z databáze GenBank (Tab. 5). Bohužel ITS2 sekvenci z referenčního vzorku *Pseudopecoeloides tenuis* z Přírodopisného muzea se mi nepodařilo získat. Veškeré sekvence byly před analýzou srovnány a zkráceny na délku 431 nukleotidových bází. Jako outgroup zde byly použity dvě sekvence motolic ze sesterské čeledi Acanthocolpidae (Acanthocolpidae sp., *Neophasis anarrhichae*).

Na kladogramu (

Obr. 5) je opět viditelné, že všech 6 sekvencí z předešlé analýzy bylo seskupeno dohromady se sekvencí druhu *Anomalotrema koiae*, která byla získána ze vzorku z muzejní sbírky. Sekvence druhu *A. koiae* ze Svalbardu jsou si identické s referenční sekvencí vzorku *A. koiae* z muzea na 98,64% - 99,12%, což odpovídá rozdílu ve 4 – 6 nukleotidových bází. Zbylých 5 sekvencí z motolic z *M. scorpius* bylo seskupeno dohromady, avšak nebyla k nim přiřazena žádná sekvence z databáze GenBank, jelikož sekvence markeru ITS2 pro rod *Podocotyle* zatím v databázi chybí. Sekvence byly navzájem identické v řádu 98,84% - 100% což odpovídá rozdílu v 0 – 6 nukleotidových bází.

Tab. 5: Seznam sekvencí z databáze GenBank, použitých při tvorbě kladogramu fylogenetických vztahů motolic čeledi Opecoelidae pro marker ITS2.

Druh motolice	Kód v databázi Genbank	Reference
Acanthocolpidae sp. VII	FJ809039	Barnett et al. 2010
<i>Bathycreadium elongata</i>	JN089758	Constenla et al. 2011
<i>Holsworthotrema enboubalichthys</i>	MK052934	Martin et al. 2019
<i>Holsworthotrema chaoderma</i>	MK052935	Martin et al. 2019
<i>Neophasis anarrhichae</i>	MW750330	Kremnev et al. 2021
<i>Neoplagioporus ayu</i>	KX553947	Fayton & Andres 2016
<i>Neoplagioporus elongatus</i>	KX553948	Fayton & Andres 2016
<i>Neoplagioporus kajika</i>	MH257741	Ding & Fan 2018, Přímé zadání
<i>Neoplagioporus zacconis</i>	KX553949	Fayton & Andres 2016
Opecoelidae gen. sp.	MN726992	Schwelm et al. 2020
<i>Paropecoelus corneliae</i>	KC357691	Rohner & Cribb 2013
<i>Paropecoelus elongatus</i>	KC357695	Rohner & Cribb 2013
<i>Paropecoelus leonae</i>	KC357693	Rohner & Cribb 2013
<i>Paropecoelus sogandaresi</i>	KC357697	Rohner & Cribb 2013
<i>Plagioporus aliffi</i>	KX905056	Fayton et al. 2017
<i>Plagioporus boleosomi</i>	KX553953	Fayton & Andres 2016
<i>Plagioporus carolini</i>	MG214680	Fayton et al. 2018
<i>Plagioporus fonti</i>	KX905054	Fayton et al. 2017
<i>Plagioporus hageli</i>	KX553950	Fayton & Andres 2016
<i>Plagioporus chiliticorum</i>	KX553943	Fayton & Andres 2016
<i>Plagioporus ictaluri</i>	MG214679	Fayton et al. 2018
<i>Plagioporus kolipinskii</i>	KX553952	Fayton & Andres 2016
<i>Plagioporus limus</i>	KX905055	Fayton et al. 2017
<i>Plagioporus shawi</i>	KX553951	Fayton & Andres 2016
<i>Plagioporus sinitsini</i>	KX553944	Fayton & Andres 2016
<i>Pseudopecoeloides engeleri</i>	KC357702	Rohner & Cribb 2013
<i>Pseudopecoeloides</i> sp. 1	KC357704	Rohner & Cribb 2013
<i>Scorpidotrema longistipes</i>	MK052933	Martin et al. 2019
<i>Sphaerostoma</i> sp.	MN726991	Schwelm et al. 2020
<i>Urorchis acheilognathi</i>	KX553945	Fayton & Andres 2016
<i>Urorchis goro</i>	KX553946	Fayton & Andres 2016

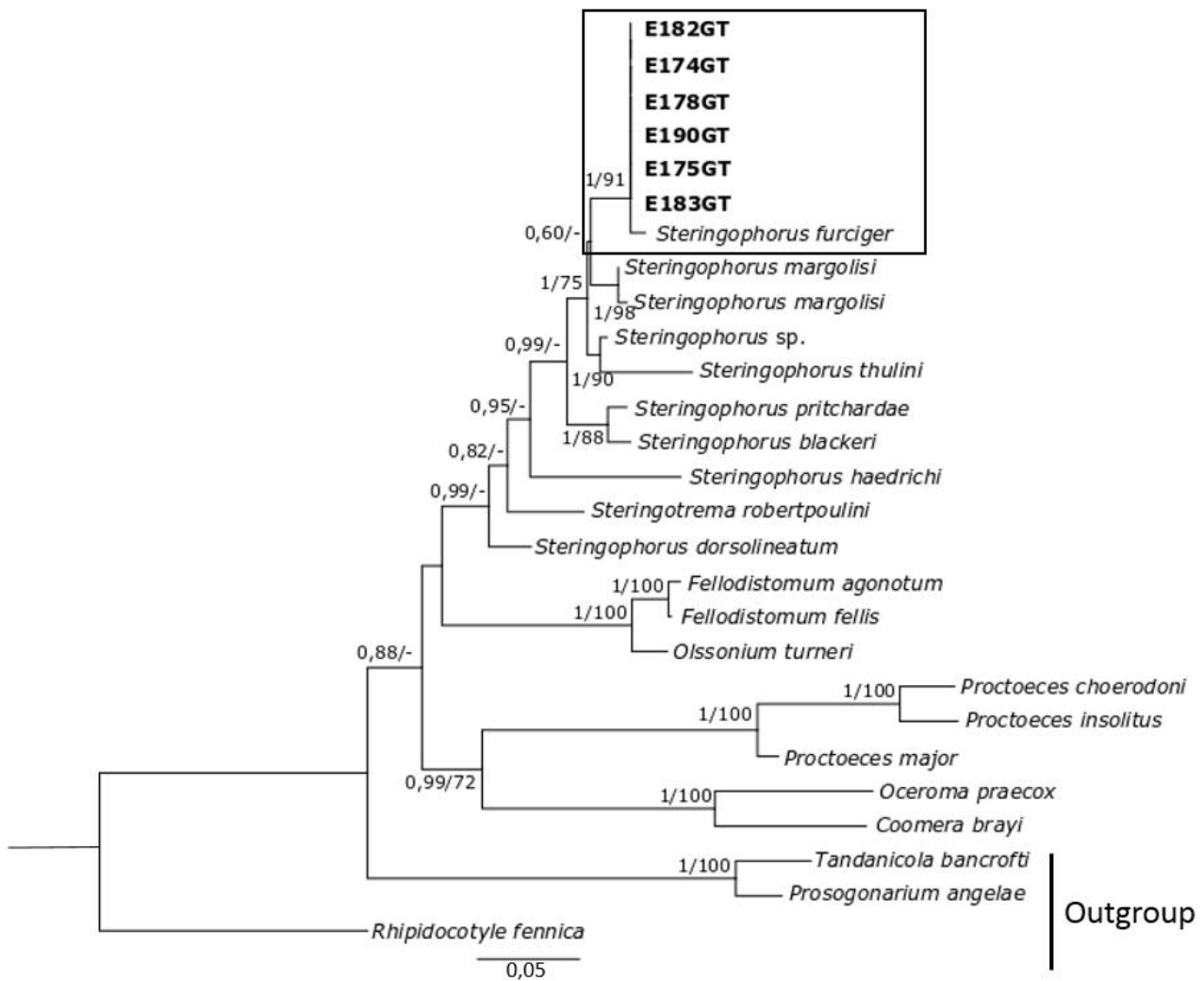


Obr. 5: Kladogram fylogenetických vztahů motolic čeledi Opecoelidae vytvořený na základě analýz ML a BI markeru ITS2 (internal transcribed spacer 2). Čísla na uzlech značí apriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP)/ bootstrap hodnotu, přičemž jsou uváděny hodnoty u PP přesahující hodnotu 0,50 a ML bootstrap přesahující 70%. Vzorky nasbírané na Svalbardu jsou tučně zvýrazněné a jsou označené kódem + iniciály druhu hostitele, ze kterého byly motolice odebrány (BG – *Buccinum glaciale*, BU – *Buccinum undatum*, GT- *Gymnocanthus tricuspis*, MS – *Myoxocephalus scorpius*, PK – *Plicifusus kroyeri*) a také referenční druhy z Přírodopisného muzea. Obdelníkem jsou vyznačeny sekvence ze Svalbardu a referenční sekvence druhu *Anomalotrema koiae* z muzea, se kterou se získané sekvence seskupily.

Mezi ostatní běžně vyskytující se druhy střevních motolic nalezených ve vrankách, které už nenáleží do čeledi Opecoelidae patří motolice z čeledi Fellodistomidae *Steringophorus furciger* (Olsson, 1868) Odhner, 1905. Jde o druh s nízkou hostitelskou specifitou pro definitivních hostitele a byl nalezen u desítek druhů mořských ryb napříč boreálními a polárními oblastmi severní polokoule. V zátocě Petuniabukta se vyskytoval zejména u *G. tricuspis*, kde měl daleko vyšší prevalenci než *A. koiae* či *P. atomon* (9 z 12 případů motolicemi infikovaných *G. tricuspis* v roce 2018). Pro jeho druhovou identifikaci byl zhotoven kladogram fylogenetických vztahů markeru 28S rDNA (Obr. 6) s využitím 6 sekvencí *S. furciger* z hostitele *G. tricuspis* ze Svalbardu a 21 sekvencí z databáze GenBank (Tab. 6). U sekvencí proběhlo zkrácení na totožnou délku 740 nukleotidových bází a následně byla provedena analýza ML a BI. Jako outgroup byly použity tři sekvence ze dvou sesterských čeledí (*Rhipidocotyle fennica* z čeledi Bucephalidae, *Tandanicola bancrofti* a *Prosogonarium angelae* z čeledi Tandanicolidae). Z kladogramu lze poté vyčíst, že všech šest sekvencí se seskupilo se sekvencí druhu motolice *Steringophorus furciger*, přičemž jsou si s referenční sekvencí identické na 99,101% - 99,308%, což odpovídá rozdílu 5 – 8 nukleotidových bází.

Tab. 6: Seznam sekvencí z databáze GenBank, použitých při tvorbě kladogramu fylogenetických vztahů motolic čeledi Fellodistomidae pro marker 28S rDNA.

Druh motolice	Kód v databázi GenBank	Reference
<i>Coomera brayi</i>	KJ425462	Cribb et al. 2014
<i>Fellodistomum agonotum</i>	AJ405289	Bray et al. 1999
<i>Fellodistomum fellis</i>	AY222282	Olson et al. 2003
<i>Oceroma praecox</i>	KJ425464	Cribb et al. 2014
<i>Olssonium turneri</i>	AY222283	Olson et al. 2003
<i>Proctoeces choerodoni</i>	KX671299	Wee et al. 2017
<i>Proctoeces insolitus</i>	KX671300	Wee et al. 2017
<i>Proctoeces major</i>	KX671309	Wee et al. 2017
<i>Prosogonarium angelae</i>	AY222285	Olson et al. 2003
<i>Rhipidocotyle fennica</i>	KF184364	Petkevičiūtė et al. 2014
<i>Steringophorus blackeri</i>	AJ405296	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus dorsolineatum</i>	AJ405291	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus furciger</i>	AJ405292	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus haedrichi</i>	AJ405293	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus margolisi</i>	AJ405294	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus margolisi</i>	AY222281	Olson et al. 2003
<i>Steringophorus pritchardae</i>	AJ405295	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus sp.</i>	AJ405299	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus thulini</i>	AJ405297	Bray et al. 1999
<i>Steringotrema robertpoulini</i>	MG696893	Perez-Ponce de Leon et al. 2018
<i>Tandanicola bancrofti</i>	KJ425466	Cribb et al. 2014



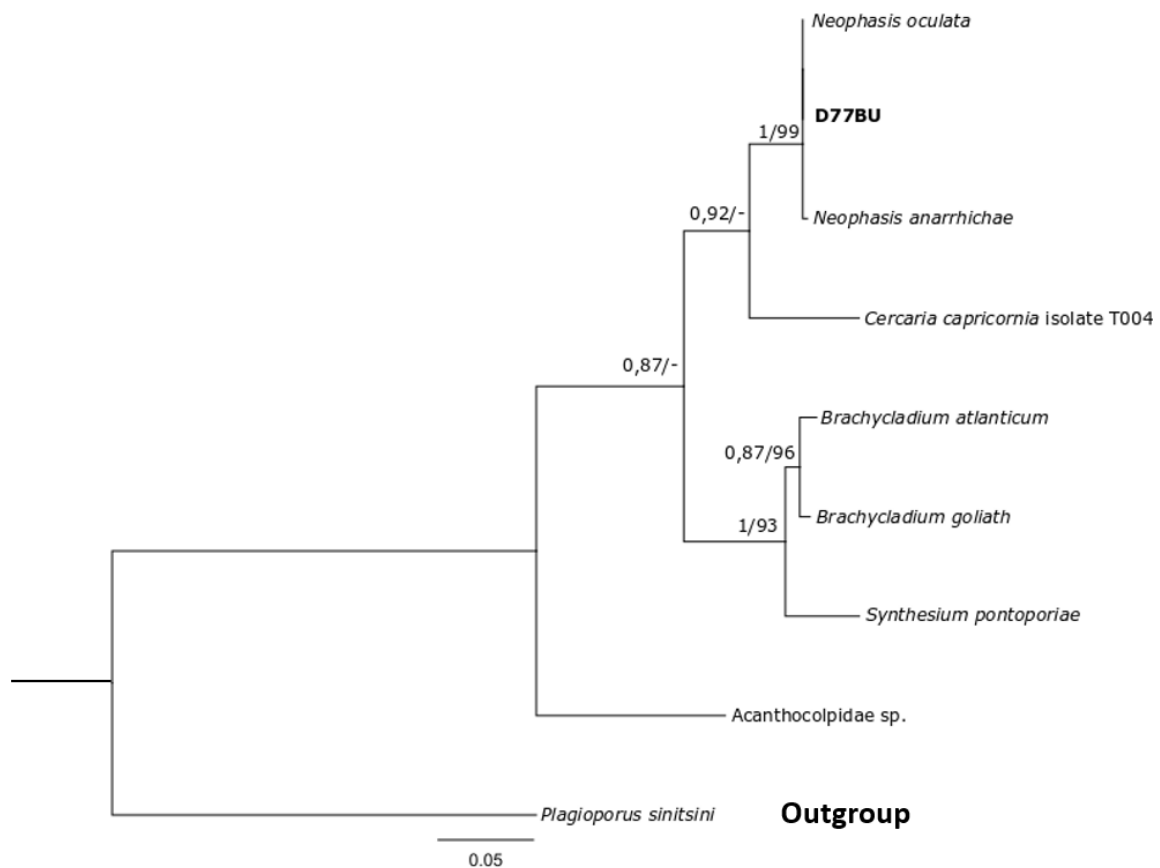
Obr. 6: Kladogram fylogenetických vztahů motolic čeledi Fellodistomidae vytvořený na základě analýz ML a BI markeru 28S rDNA. Čísla na uzlech značí apriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP)/ bootstrap hodnotu, přičemž jsou uváděny hodnoty u PP přesahující hodnotu 0,50 a ML bootstrap přesahující 70%. Vzorke nasbírané na Svalbardu jsou tučně zvýrazněné a jsou označené kódem + iniciály druhu hostitele, ze kterého byly motolice odebrány (GT- *Gymnocanthus tricuspis*).

U surmoven se mimo larvální stádia motolic čeledi Opecoelidae vyskytovala také larvální stádia motolic, jež byla charakteristická výskytem rédií v jejich životním cyklu a také rozdílným typem cercárií, distomních okulocercárií s ocáskem vyvinutým k pohybu ve vodním sloupci. Vyskytovaly se zejména v surmovkách v zálivu Adventfjorden, kde měly v roce 2018 vyšší prevalenci, než opecoelidní larvální stádia (4 případy z 5 pozitivních surmoven). Pro jejich druhovou identifikaci byla použita molekulární analýza markeru ITS2, ze které byl poté za pomoci analytických metod ML a BI vytvořen kladogram. Na tvorbu kladogramu byla použita jedna sekvence z larválních stádií z hostitele *Buccinum undatum* ze Svalbardu a 8 sekvencí z databáze GenBank (Tab. 7). Po použití programu Nucleotide Blast bylo zjištěno, že larvální stádia patří do parafyletické čeledi Acanthocolpidae, načež byl vybrán jako outgroup sekvence druhu *Plagioporus sinitsini* patřící do jejich sesterské čeledi Opecoelidae. Před samotnou analýzou byly sekvence zkráceny na totožnou délku 466 nukleotidových bází.

Z kladogramu (Obr. 7) lze poté vyčíst, že se sekvence z larválních stádií z *B. undatum* seskupila se sekvencemi rodu *Neophasis*, přičemž od sekvence druhu *N. oculata* se odlišuje pouze v jedné nukleotidové bázi a od *N. anarrhichae* se odlišuje ve dvou nukleotidových bázích, a tudíž nelze s jistotou určit druhovou příslušnost těchto larválních stádií. Od *N. anarrhichae* se však odlišuje tvorbou cercárií, které se ihned metamorfují do stádia metacercárie ve stejném hostiteli (Kremnev et al. 2021).

Tab. 7: Seznam sekvencí motolic z databáze GenBank využitých na tvorbu kladogramu fylogenetických vztahů motolic čeledi Acanthocolpidae a Brachycladiidae na základě markeru ITS2.

Druh motolice	Kód v databázi Genbank	Reference
Acanthocolpidae sp.	FJ809039	Barnett et al. 2010
<i>Brachycladium atlanticum</i>	FJ211250	Blasco-Costa et al. 2009
<i>Brachycladium goliath</i>	KR703279	Briscoe et al. 2016
<i>Cercaria capricornia</i> isolate T004	MG642789	Barnett & Miller 2018
<i>Neophasis anarrhichae</i>	MW750330	Kremnev et al. 2021
<i>Neophasis oculata</i>	MW750311	Kremnev et al. 2021
<i>Plagioporus sinitsini</i>	KX553944	Fayton & Andres 2016
<i>Synthesium pontoporiae</i>	JX644085	Marigo et al. 2015



Obr. 7: Kladogram fylogenetických vztahů motolic čeledi Acanthocolpidae a Brachycladiidae vytvořený na základě analýz ML a BI markeru ITS2. Čísla na uzlech značí apriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP)/ bootstrap hodnotu, přičemž jsou uváděny hodnoty u PP přesahující hodnotu 0,50 a ML bootstrap přesahující 70%. Vzorky nasbírané na Svalbardu jsou tučně zvýrazněné a jsou označené kódem + iniciály druhu hostitele, ze kterého byly motolice odebrány (BU – *Buccinum undatum*).

4.3 Morfologická analýza:

V rámci morfologické analýzy bylo obarveno a změřeno 28 preparátů dospělých stádií motolic (18 z *M. scorpius* a 10 z *G. tricuspis*), 87 cercárií (38 z *B. undatum* a 49 z *P. kroyeri*) a 16 sporocyst z *P. kroyeri*. Morfologické parametry dospělých stádií byly zaznamenány do protokolu vytvořeného dle práce Martin et al. 2020, zatímco u sporocyst a cercárií byly zaznamenány parametry dle práce Barnett et al. 2014 a další parametry, které jsem z trvalých preparátů dokázal s jistotou vyčíst: délka a šířka styletu a délka vylučovacího měchýře. K detailnímu porovnání a druhové identifikaci trvalých preparátů dospělých stádií byly také využity trvalé preparáty z helmintologické sbírky Parazitologického ústavu AVČR.

4.3.1 Larvální stádia:

Během morfologické analýzy jsem celkem obarvil a změřil 16 preparátů sporocyst a 87 preparátů cercárií druhu *Anomalotrema koiae* izolovaných z hepatopankreatu plžů *Buccinum undatum*, *B. glaciale* a *Plicifusus kroyeri*. Jde o první morfologický popis larválních stádií tohoto druhu. Pro detailní popis byly využity také fotografie ze SEM (viz kapitola 3.4.3).

***Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Tab. 8, Obr. 8, Obr. 9, Obr. 10)**

Hostitelé: *Buccinum undatum*, *B. glaciale*, *Plicifusus kroyeri*.

Lokalita: zátoky Petuniabukta a Adolfbukta.

Lokalizace v hostiteli: hepatopankreatická žláza.

Popis:

Dceřiná sporocysta

Tělo sporocysty je cylindrické a protáhlé, nabývající červovitého tvaru. Délka těla je 557 – 1070 μm (medián 870 μm), což průměrně odpovídá šestinásobku šířky těla, která činí 110 – 194 μm (medián 151 μm), či také trojnásobku délky těla cercárie (viz Tab. 8). Na těle není patrné žádné větvení. Průměrně se v jedné sporocystě vyvíjí množství 10 – 20 cercárií. Germinální shluky byly náhodně umístěny v těle sporocysty a nebylo tu pozorováno žádné jejich přichycení ke stěně těla.

Cercárie

Tělo cercárie je protáhlé a válcovité. Povrch těla je hladký až mírně zvrásněný rýhami táhnoucími se po okruhu těla. Po celém těle jsou nepravidelně umístěna políčka s krátkými ciliemi (jednotky mikrometrů), které nejspíše mají senzorickou funkci. Na ventrální straně je patrná ústní a břišní

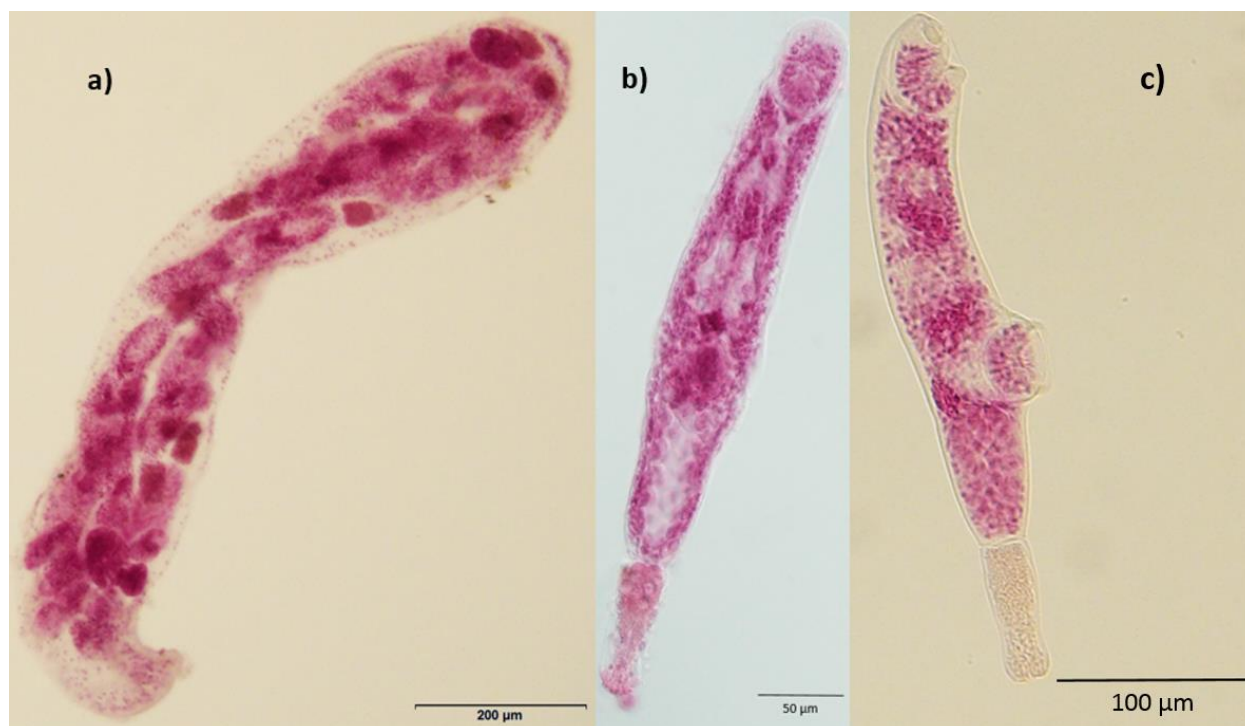
přísavka. Ústní přísavka bývá zpravidla větší než břišní přísavka, ač ta se může zdát na fotografiích ze SEM výraznější. Obústí obou přísavek je celé kryto ciliemi a vnitřní část břišní přísavky je po celém svém povrchu pokryta šupinkovitými útvary (Obr. 10). Břišní přísavka obvykle mírně vystupuje z těla. Anteriorně od ústní přísavky se nachází otvor, který je ústím kapsy, ve které je uložený stylet. Stylet je uložený anteriorně od ústní přísavky, je výrazný, široký a svými dvěma hroty směřuje k dorsální straně těla. Na styletu je také patrný límeček který obkružuje hroty styletu, a tudíž se někdy může jevit stylet jako čtyřhrotý. Šířka styletu odpovídá přibližně dvojnásobku délky styletu (Obr. 10). V oblasti styletu a ústní přísavky také ústí 4 páry penetračních žlázy, kdy jeden pár se nachází anteriorně od farynxu a 3 páry v oblasti mezi farynxem a břišní přísavkou. Pod břišní přísavkou se nachází 2 výrazné shluky buněk, kdy nejpravděpodobněji jde o pohlavní primordia. Celé tělo posteriorně od břišní přísavky vyplňuje oválný exkreceční měchýř. Na tělo se na posteriorní straně napojuje zakrnělý ocásek se dvěma žlázami produkujícími lepivý sekret, který slouží k ukotvení cercárie k podkladu. Délka ocásku odpovídá přibližně třetině až čtvrtině délky těla cercárie. Posteriorní strana ocásku je výrazně hrbolatá a jsou na ní patrné otvory, kterými ústí ocasní žlázy na povrch (Obr. 10).

Poznámky:

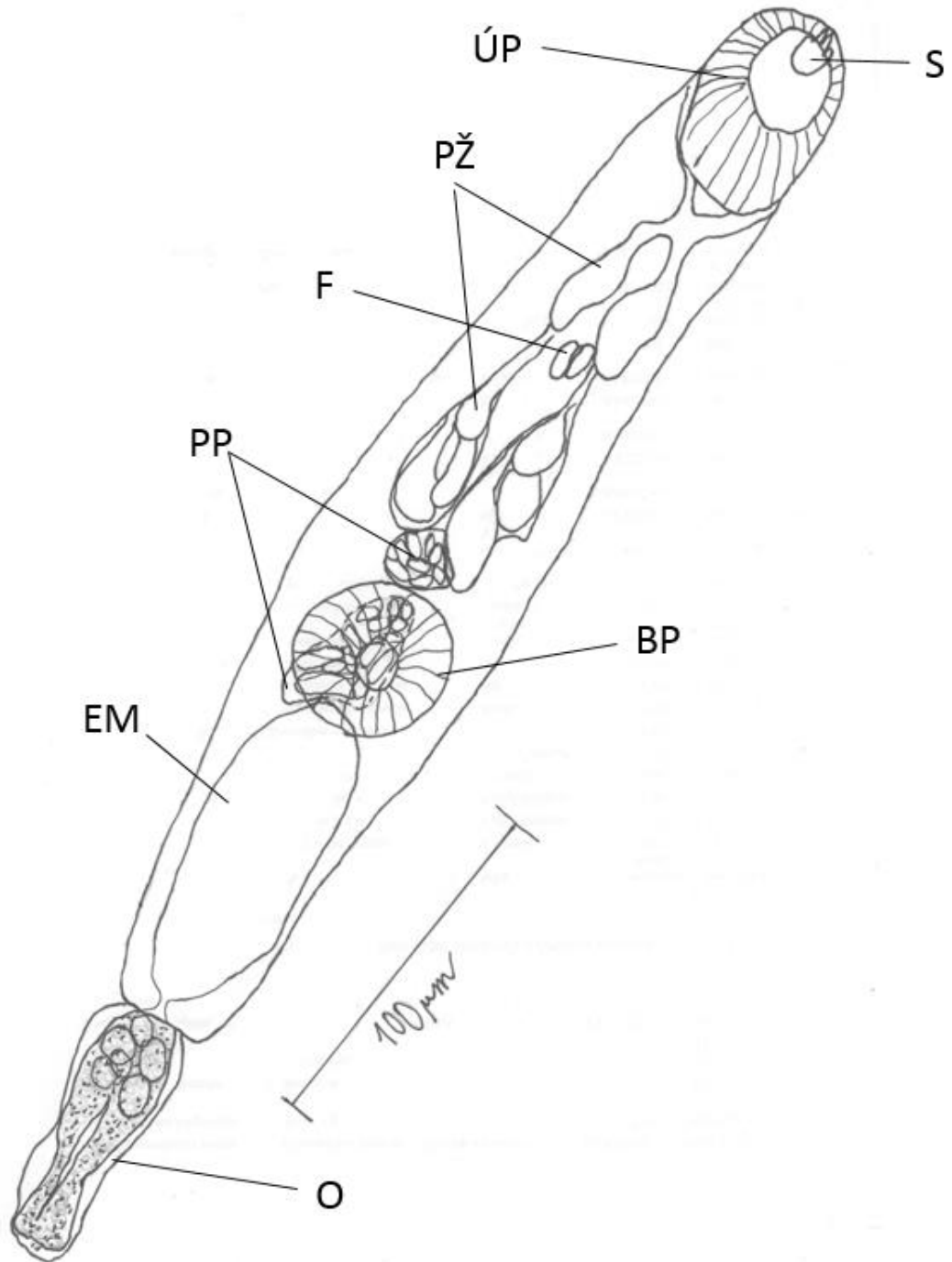
Veškeré morfologické údaje o cercáriích pocházejí z cercárií přímo izolovaných z hepatopankreatické žlázy surmovky, jelikož se nikdy nepodařilo i za přirozených a experimentálních podmínek zaznamenat vyplouvání cercárií z těla plže.

Tab. 8: Morfologické parametry cercárií druhu *Anomalotrema koiae* z hostitelů *Buccinum undatum*, *B. glaciale* a *Plicifusus kroyeri*. V závorce je uvedena hodnota mediánu. Rozměry jsou uváděny v μm .

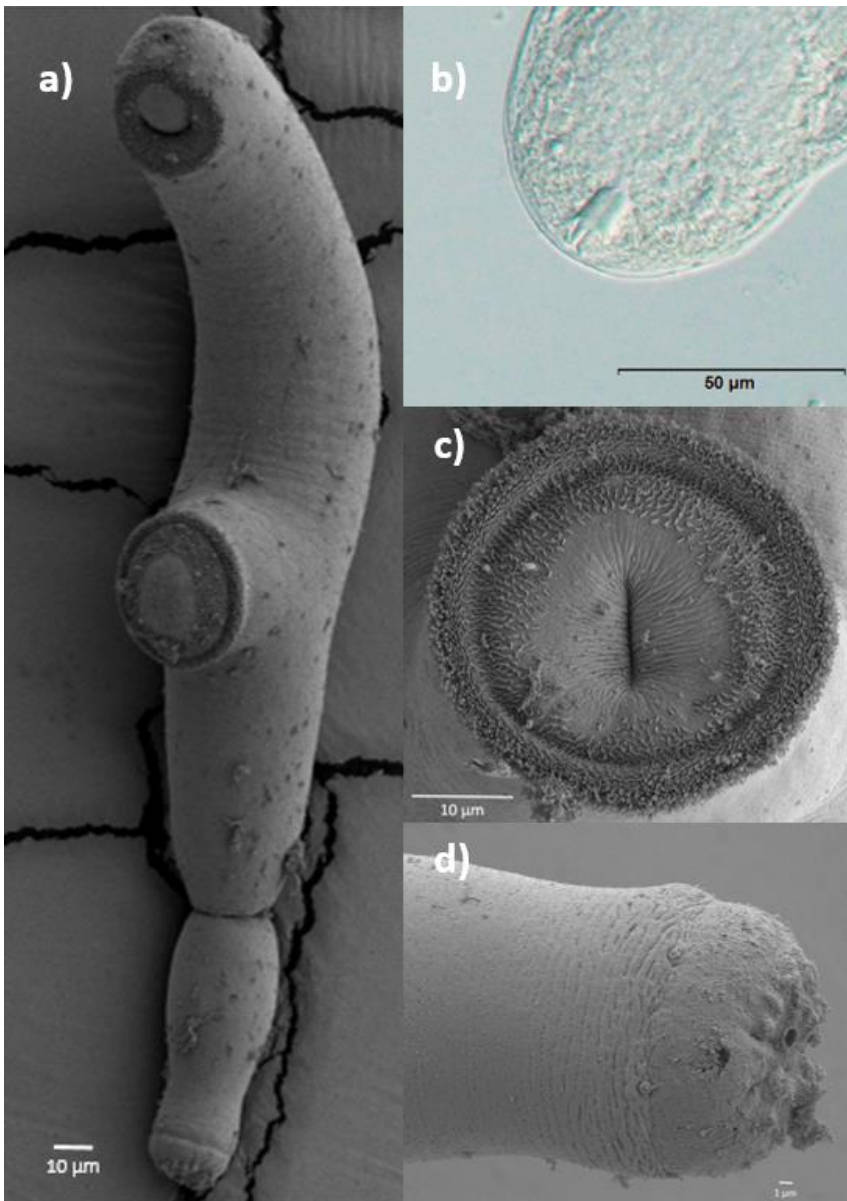
Morfologické parametry	Rozměry
Počet preparátů	87
Délka těla (DT)	192 - 388 (295)
Šířka těla	36 - 104 (60)
Délka ocásku (DO)	49 - 101 (76)
Šířka ocásku	25 - 54 (34)
DO/DT (%)	20,1 – 40,3 (25,5)
Vzdálenost mezi přísavkami	68 - 171 (119)
Délka ústní přísavky	46 - 72 (56)
Šířka ústní přísavky	37 - 61 (44)
Délka břišní přísavky	31 - 52 (42)
Šířka břišní přísavky	34 - 54 (41)
Délka styletu	9 - 19 (16)
Šířka styletu	4 - 11 (7)
Délka exkrecečního měchýře	47 - 106 (85)



Obr. 8: Trvalé preparáty larválních stádií motolic druhu *Anomalotrema koiae*: **a)** dceřiná sporocysta s vyvíjejícími se cercáriemi, hostitel *Plicifusus kroyeri*, **b)** cercárie, hostitel *P. kroyeri*, **c)** cercárie, hostitel *B. undatum*.



Obr. 9: Podrobný nákres cercárie z hostitele *P. kroyeri* s popisem její anatomie: BP – břišní přísavka, EM – exkretční měchýř, F – farynx, O – ocásek, PP – pohlavní primordia, PŽ – penetrační žlázy, S – stylet, ÚP – ústní přísavka.



Obr. 10: Cercárie druhu *Anomalotrema koiae*, hostitel *Buccinum* sp.: **a)** SEM preparát celého těla, **b)** stylet, **c)** břišní přísavka s obústím pokrytým ciliemi, **d)** posteriorní konec s ocásku s patrným vyústěním ocasních žláz, měřítko 1 µm (SEM fotografie Ditrich, 2009).

4.3.2 Dospělá stádia:

Během morfologické analýzy 30 preparátů dospělých stádií z *M. scorpius* a *G. tricuspis* se mi podařilo na základě morfologických charakteristik nalézt a popsat morfologii tří druhů motolic: *Anomalotrema koiae* (Digenea: Opecoelidae) *Podocotyle atomon* (Digenea: Opecoelidae) a *Steringophorus furciger* (Digenea: Fellodistomidae).

***Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Tab. 9, Obr. 11, Obr. 12)**

Hostitelé: *Gymnocanthus tricuspis*

Lokalita: zátoka Petuniabukta

Lokalizace v hostiteli: střevo, pylorické výběžky

Popis:

Tvar těla protáhlý cylindrický s mírným zúžením posteriorně od břišní přísavky v oblasti, kde začínají vitelária. Povrch těla je hladký bez viditelných ostnů či cilií. Obě přísavky se nacházejí v anteriorní třetině těla. Ústní přísavka nabývá kulatého tvaru, nesespecializovaná a posteriorně z ní vede počátek trávicí trubice prefarynx. Břišní přísavka je oválná, výrazně větší než ústní přísavka a často mírně vystupuje z těla. Prefarynx dále vede ve svalnatý farynx nabývající 30% - 40% velikosti ústní přísavky. Z farynxu poté vede jícnem až k větvení střeva. Střevo se poté táhne ve dvou větvích až k posteriornímu konci těla, kde je každá z větví zakončená análním otvorem nacházejícím se ventrálně od exkrecního póru. Z ventrálního pohledu na pravé straně od jícnu se nacházejí genitální pór, kde ústí samčí i samičí část pohlavní soustavy; ejakulační kanálek a cirrum a děloha, přičemž metraterm zde nebyl zaznamenán. Varlata jsou vždy dvě umístěná tandemově za sebou, přičemž mezera mezi nimi bývá zpravidla vyplněna vitelinními folikuly. Jsou zpravidla kulatá až oválná, velká, průměrně zabírající kolem tří čtvrtin šířky těla a víc. Z nich poté vede vas efferentia anteriorním směrem a napojuje se na seminální vezikulum. Cirrový vak prochází pod břišní přísavkou a je zakončen v levé části těla v oblasti dělohy. Je membránový a kryje zcela seminální vezikulum, které je ze začátku širší ale směrem ke genitálnímu póru se výrazně zužuje v pars prostatica a ejakulační kanálek, který je poté zakončen cirrem. Vaječník se nachází anteriorně od anteriorního varlete, přičemž mohou být od sebe někdy hůře rozeznatelné, protože se mezi nimi často nenachází žádná mezera. Je složen ze tří laloků směřujícími posteriorně. Velikostně odpovídá tak dvěma třetinám velikosti varlat. Z vaječníku poté anteriorně vede vejcovod až k oblasti s Mehlisovými žlázami. Zde se také napojují žloutkové kanálky, které vedou z vitelárií umístěnými laterálně posteriorně od břišní přísavky, přičemž po stranách a v oblasti posteriorně od varlat hustě vyplňují veškerý volný prostor. Laurerův kanálek je zde přítomný, ale nebyl jsem ho schopný identifikovat. Receptakulum seminis je děložní. Poté je zde patrná stočená a zkroucená děloha zpravidla plná vajíček, nacházející se mezi vaječníkem a břišní přísavkou. Pod pravou částí břišní přísavky pak vede děloha až ke genitálnímu póru. Exkrecní vak je zpravidla rovný a nevětvený.

Poznámky:

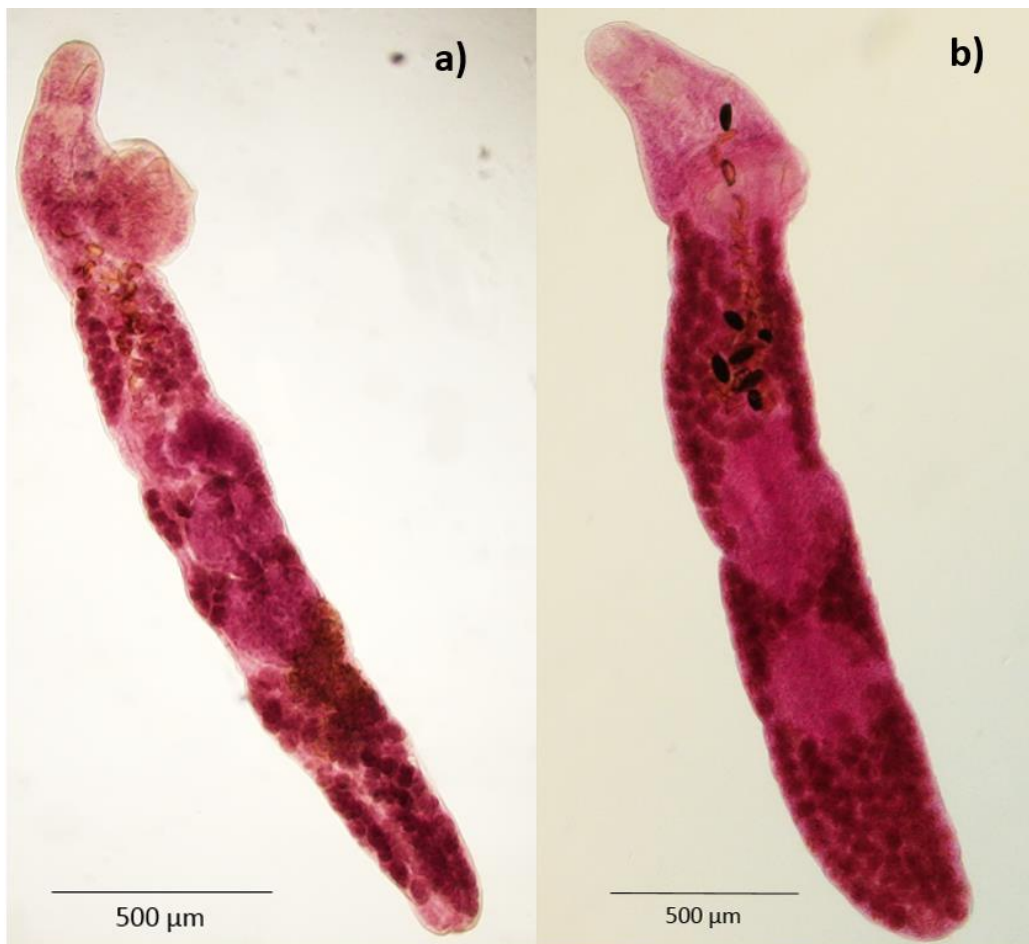
Na morfometrickou analýzu tohoto druhu jsem měl pouze 1 použitelný preparát z vranky *G. tricuspis*. Její morfologie odpovídala popisu i kresbám v pracích Gibson & Bray 1984 a Sokolov et al. 2018, které se tímto druhem zabývají, tak také v mnohých rysech odpovídala trvalým preparátům *A. koiae* zapůjčeným z helmintologické sbírky. Ty mi také pomohly s popisem celkové anatomie tohoto druhu, kterou jsem nebyl schopen z mého preparátu na první pohled vyčíst. Jediný znak, který jsem nebyl z mikroskopických preparátů vyčíst a který je charakteristický pro rod *Anomalotrema* je výskyt papil v oblasti břišní přísavky přičemž *A. koiae* mívá dvě v anteriorní části a jednu v posteriorní části přísavky (Gibson & Bray 1984; Cribb 2004). Pro vyčtení tohoto znaku by se více hodila morfologická metoda na studium povrchových struktur parazitů např. SEM. V čem se preparát ze Svalbardu liší od preparátů ze sbírky, je zejména celková velikost těla, kdy je přibližně 1,5 násobně větší, než preparáty ze sbírky, avšak procentuální proporce těla ve většině rozměrech sedí. Odlišuje se pak výrazně pouze procentuální délkou těla za posteriorním varletem (viz Tab. 9).

Tab. 9: Morfologické parametry motolic druhu *Anomalotrema koiiae* získaných z *G. tricuspis* na Svalbardu a preparátů *A. koiiae* z helmintologické sbírky AV ČR. V závorce je uvedena hodnota mediánu. Rozměry jsou uváděny v μm .

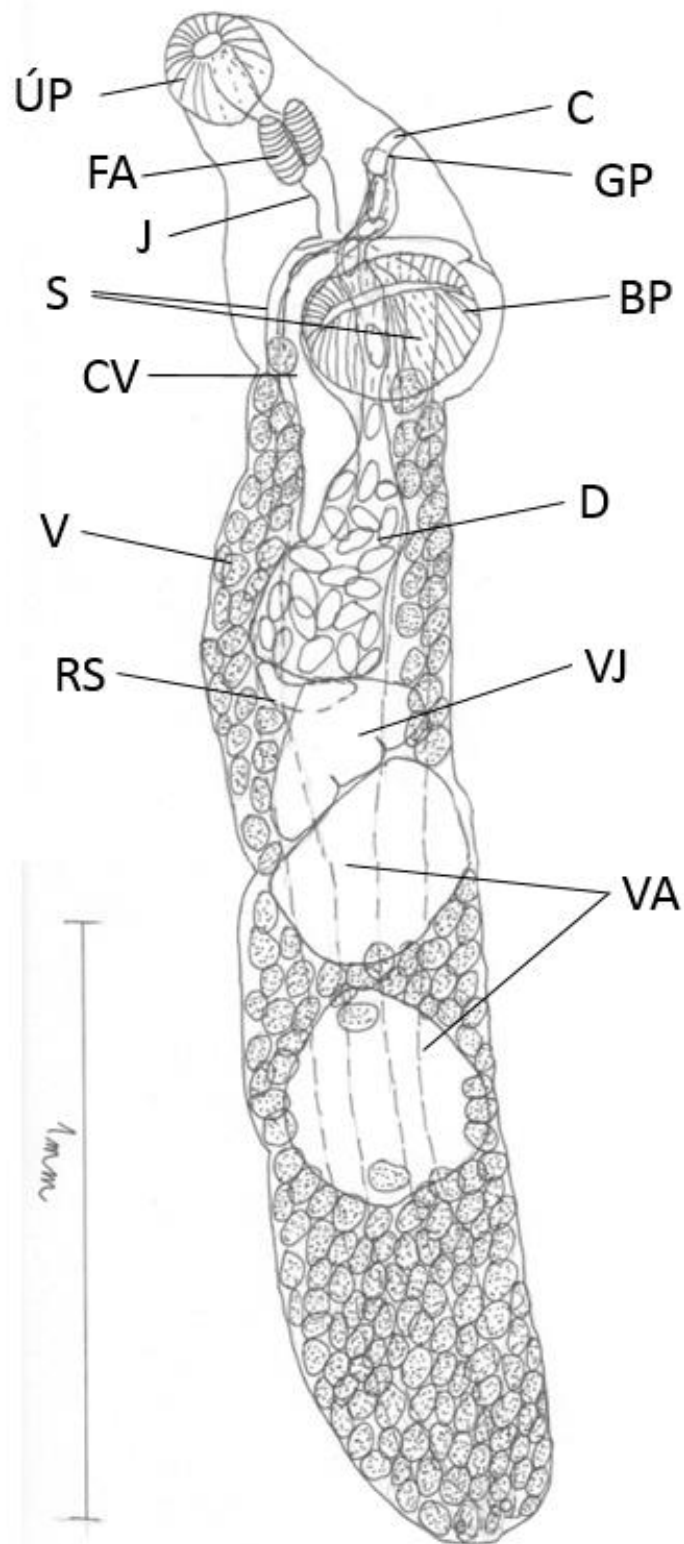
	<i>A. koiiae</i> (Svalbard)	<i>A. koiiae</i> (AV ČR)
počet preparátů	1	4
délka těla (DT)	2598	1163 - 2516 (2306)
šířka těla (ŠT)	404	231 - 305 (292)
ŠT/DT (%)	15,6	11,6 - 19,9 (13,0)
forebody (FB)	476	258 - 362 (336)
FB/DT (%)	18,3	10,3 - 28,4 (15,3)
délka ÚP (DÚP)	181	127 - 136 (129)
šířka ÚP (ŠÚP)	157	104 - 124 (115)
ŠÚP/DÚP	0,87	0,81 - 0,91 (0,89)
délka BP (DBP)	229	209 - 271 (247)
šířka BP (ŠBP)	287	230 - 279 (251)
ŠBP/DBP	1,25	0,91 - 1,23 (1,03)
ŠBP/ŠÚP	1,83	1,97 - 2,48 (2,22)
délka farynxu (DF)	104	67 - 73 (71)
šířka farynxu (ŠF)	105	69 - 93 (85)
ŠF/DF	1,01	0,99 - 1,30 (1,21)
ŠF/ŠÚP	0,67	0,60 - 0,82 (0,75)
délka jícnu (DJ)	158	56 - 221 (156)
DJ/DT (%)	6,1	4,8 - 9,2 (6,6)
Preovariální DT (PODT)	1128	887 - 1024 (936)
PODT/DT (%)	43,4	39,0 - 80,0 (40,5)
DT před větvením střeva (VSDT)	452	263 - 425 (354)
VSDT/DT (%)	17,4	14,7 - 22,6 (16,5)
VSDT/FB (%)	95,0	79,7 - 143,0 (108,3)
DT před genitálním pórem (GPDT)	366	260 - 350 (280)
GPDT/DT (%)	14,1	11,9 - 22,4 (13,2)
Previtelinní DT (PVDT)	530	476 - 567 (551)
PVDT/DT (%)	20,4	19,7 - 46,9 (23,9)
Post-testes DT (PTDT)	583	674 - 820 (752)
PTDT/DT (%)	22,4	31,0 - 58,0 (33,5)
Post-ceca DT (PCDT)	-	-
PCDT/DT (%)	-	-
délka cirrového vaku (DCV)	680	287 - 356 (305)
šířka cirrového vaku	66	47 - 67 (57)
DCV/BL (%)	26,2	11,6 - 27,3 (14,0)
Délka anteriorního varlete (DAV)	377	171 - 242 (230)
Šířka anteriorního varlete (ŠAV)	335	118 - 245 (206)
Délka posteriorního varlete (DPV)	348	187 - 282 (257)
Šířka posteriorního varlete (ŠPV)	334	144 - 232 (209)

DAV/DPV	1,08	0,86 - 0,91 (0,90)
ŠAV/ŠPV	1,00	0,82 - 1,08 (0,98)
Délka vaječníku	288	99 - 202 (169)
Šířka vaječníku	283	68 - 202 (121)
Délka mezi vaječníkem a AV (DV-AV)	472	337 - 498 (350)
DV-AV/BL(%)	18,2	15,0 - 29,1 (17,6)
Délka mezi ÚP a AV (DÚP-AV)	603	484 - 753 (516)
DÚP-AV/DT (%)	23,2	22,1 - 41,6 (26,3)
Průměrná délka vajíček	76	52 - 63 (60)
Průměrná šířka vajíček	32	34 - 40 (36)

* AV – anteriorní varle, BP – břišní přísavka, ÚP – ústní přísavka,



Obr. 11: Trvalé preparáty motolice *Anomalotrema koiae*: **a)** *A. koiae* z helmintologické sbírky AV ČR, hostitel *Enchelyopus cimbrius* (mník čtyřvousý), **b)** *A. koiae* ze Svalbardu, hostitel *Gymnocanthus tricuspis*



Obr. 12: Podrobný nákres *A. koiiae* z hostitele *G. tricuspis* s popisem její anatomie: BP – břišní přísavka, C – cirrus, CV – cirrový vak, D – děloha, FA – farynx, GP – genitální pór, J – jícen, RS – receptakulum seminis, S – střevo, V – vitelária, VA – varlata, VJ – vaječník.

***Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905 (Tab. 10, Obr. 13, Obr. 14)**

Hostitelé: *Gymnocanthus tricuspis*, *Myoxocephalus scorpius*.

Lokalita: zátoka Petuniabukta a Adolfbukta.

Lokalizace v hostiteli: střevo a pylorické výběžky.

Popis:

Tělo cylindrické až protáhlé. Přední část těla (forebody) tvoří čtvrtinu celkové délky těla. Orální přísavka obvykle kulatá či mírně delší než širší. Ventrální přísavka vždy větší než ústní přísavka, nespécializovaná, nevyčnívá nijak výrazně z těla a tvarově je mírně širší než delší. Prefarynx krátký, často ani nevyčnívá zpod ústní přísavky. Farynx výrazný oválný až mírně hranatý, zabírající 2 – 3 pětiny plochy ústní přísavky. Jícen krátký. Větvení střeva obvykle ve spodní části forebody či ve stejné vzdálenosti jako anteriorní okraj ventrální přísavky. Slepá střeva široká a zakončená až v poslední desetíně posteriorního konce těla. Varlata, vždy dvě, se nacházejí mezi větvemi slepého střeva mezi druhou až třetí třetinou těla tandemově za sebou. Jsou obvykle kulatá či mírně laločnatá. Posteriorní varle bývá zpravidla větší než anteriorní, nebo mohou dosahovat stejné velikosti. Svoji šířkou dosahují poloviny šířky těla motolice. Cirrový vak je svalnatý, protáhlý a rozšiřující se k posteriornímu konci. Z ventrálního pohledu posteriorní část zahýbá doleva a tvarově připomíná obrácené písmeno L. Probíhá pod ventrální přísavkou a zasahuje až do anteriorní části dělohy. Genitální pór, kde vyúsťuje cirrový vak a děloha, se nachází na ventrální straně vpravo od jícnu v první čtvrtině těla motolice. Vaječník se nachází mezi dělohou a anteriorním varletem. Je tvořen třemi laloky směřujícími posteriorně. Velikostně je menší než varlata. Vpravo od vaječníku se nachází kulaté kanalikulární receptakulum seminis velikostně podobné vaječníku. Laurerův kanálek protáhlý, ústící v oblasti posteriorního varlete. Vitelinní rezervoár mediální, anteriorně od vaječníku, s rozvinutou sítí vitelinních větví táhnoucích se po obou stranách těla a táhnoucích se k anteriornímu i posteriornímu konci těla. Vitelinní folikuly jsou hustě a početně rozmístěny rovnoměrně na obou stranách posteriorních tří čtvrtin těla. Mohou zasahovat až do oblasti anteriorně od břišní přísavky a zasahují i mezi varlata, avšak nespojují se tam. Levá a pravá strana vitelárií se spojuje až za posteriorním varletem a níž. Děloha se rozkládá mezi břišní přísavkou a vaječníkem, načež vyúsťuje v oblasti genitálního póru. Je obvykle plná vajíček bez viditelného opercula. Exkreceční měchýř zasahuje až do oblasti vaječníku, tvarově široký nevětvený.

Poznámky:

Pro porovnání naměřených parametrů s morfologickými parametry uváděnými v literatuře byly použity články (Brinkmann 1975; Kōie 1981). Od příbuzného druhu *Podocotyle reflexa*, který se může vyskytovat ve stejných hostitelích, se odlišuje *P. atomon* zejména plošším tvarem těla, viteláriemi, které se nespojují v oblasti mezi varlaty a šířkou varlat, které výrazně nepřesahují polovinu šířky celého těla (Brinkmann 1975). Tyto charakteristické rysy ovšem platí zejména pro plně vyvinutá dospělá stádia a

v práci (Køie 1981) je podotknuto, že plně nevyvinutá stádia těchto dvou druhů se od sebe nedají morfologicky odlišit.

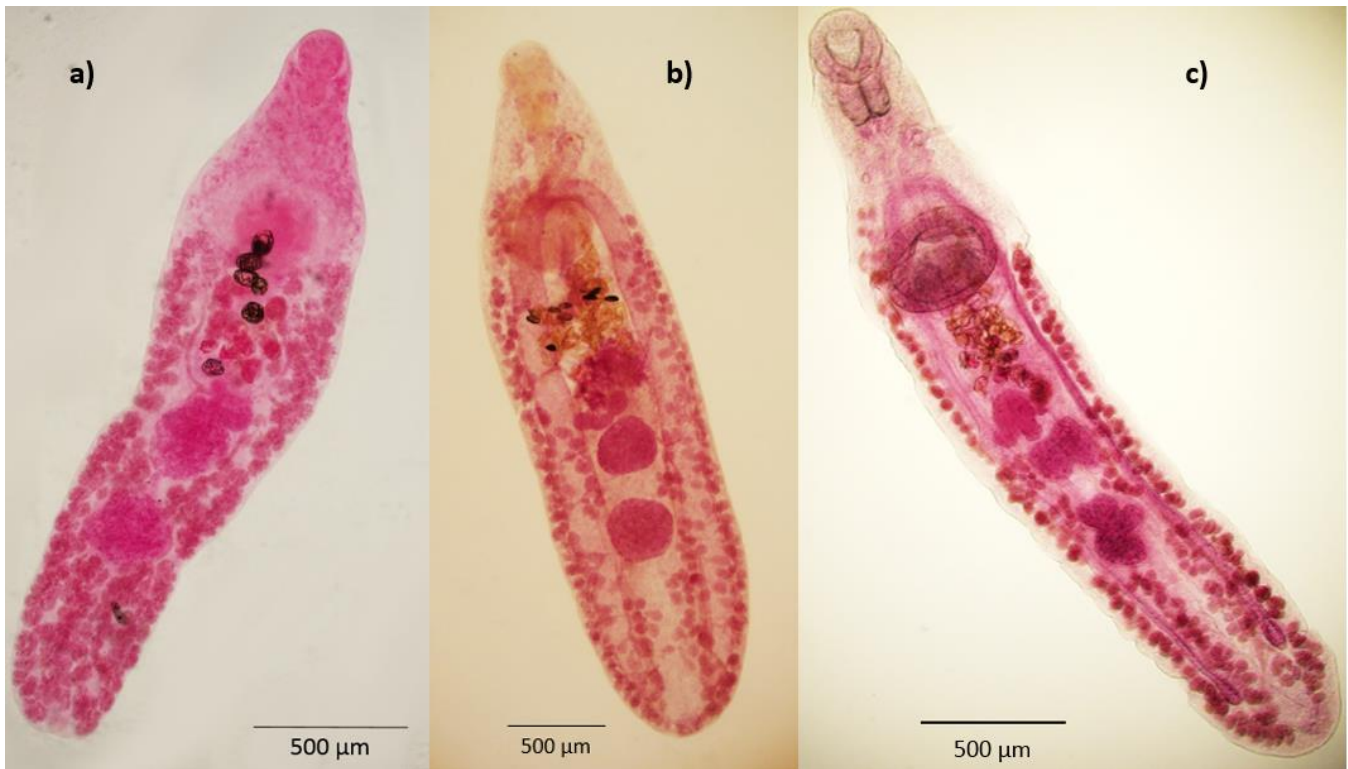
Po porovnání 19 preparátů *P. atomon* ze Svalbardu se čtyřmi preparáty *P. atomon* z helmintologické sbírky AV ČR se veškeré preparáty shodovaly v morfologii a umístění orgánových soustav, avšak při porovnání morfometrických dat pomocí nepárového t – testu se naměřené hodnoty signifikantně lišily ($p < 0,05$) v 16 ze 48 parametrů, což odpovídá jedné třetině. Jde zejména o rozměry obou přísavek, rozměry farynxu, rozměry vaječníku, délku cirrového vaku, poměry délky těla a vzdáleností mezi břišní přísavkou a vaječníkem, délky těla a vzdálenosti mezi břišní přísavkou a anteriorním varletem, a také šířku vajíček. Avšak tyto rozdíly jdou vysvětlit tím, že *P. atomon* má vyšší fenotypovou plasticitu a byl použit nízký počet jak kontrolních, tak získaných preparátů.

Tab. 10: Morfologické parametry motolic druhu *Podocotyle atomon* získaných z *M. scorpius* a *G. tricuspis* na Svalbardu a preparátů *P. atomon* z helmintologické sbírky AV ČR. V závorce je uvedena hodnota mediánu. Rozměry jsou uváděny v μm .

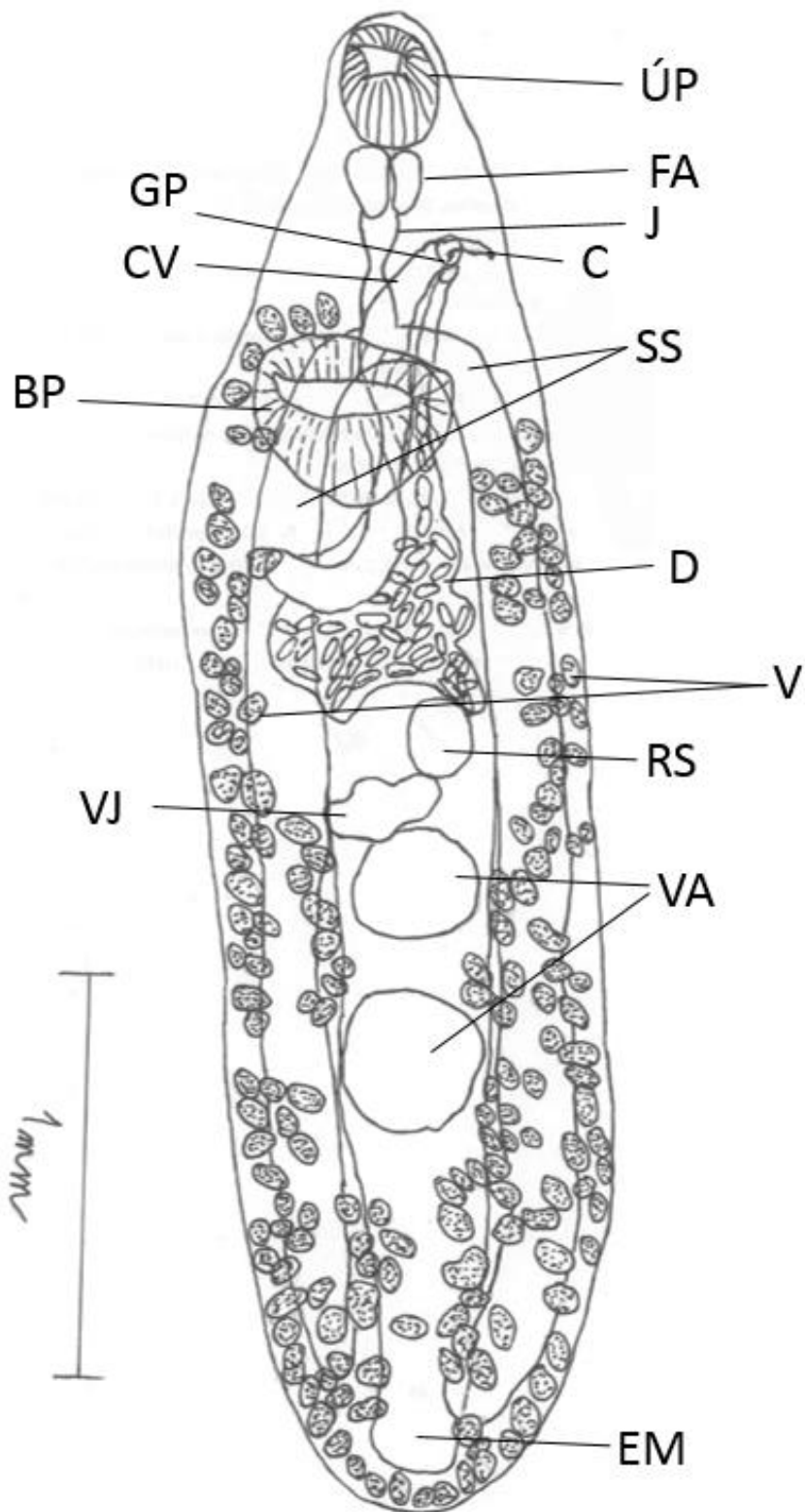
	<i>P. atomon</i> (Svalbard)	<i>P. atomon</i> (AV ČR)
počet preparátů	19	5
délka těla (DT)	1739 - 3645 (2546)	1854 - 3099 (2290)
šířka těla (ŠT)	517 - 973 (600)	423 - 667 (590)
ŠT/DT (%)	17,9 - 47,7 (21,9)	19,83 - 26,0 (22,8)
forebody (FB)	324 - 797 (583)	346 - 559 (511)
FB/DT (%)	17,1 - 34,9 (21,7)	16,2 - 24,4 (21,8)
délka ÚP (DÚP)	178 - 292 (242)	135 - 185 (167)
šířka ÚP (ŠÚP)	140 - 279 (239)	124 - 173 (150)
ŠÚP/DÚP	0,76 - 1,18 (1,01)	0,72 - 0,97 (0,92)
délka BP (DBP)	288 - 426 (333)	219 - 293 (244)
šířka BP (ŠBP)	316 - 496 (411)	227 - 284 (253)
ŠBP/DBP	1,01 - 1,31 (1,17)	0,93 - 1,12 (1,05)
ŠBP/ŠÚP	1,27 - 2,33 (1,68)	1,63 - 1,89 (1,81)
délka farynxu (DF)	91 - 230 (165)	72 - 103 (91)
šířka farynxu (ŠF)	101 - 206 (157)	71 - 120 (87)
ŠF/DF	0,67 - 1,45 (0,98)	0,83 - 1,2 (1,08)
ŠF/ŠÚP	0,51 - 0,81 (0,69)	0,56 - 0,69 (0,65)
délka jícnu (DJ)	131 - 293 (203)	160 - 434 (236)
DJ/DT (%)	4,8 - 12,7 (8,1)	7,0 - 14,00 (10,8)
Preovariální DT (PODT)	860 - 1828 (1235)	854 - 1477 (1277)
PODT/DT (%)	40,1 - 59,2 (47,8)	46,1 - 57,6 (48,7)
DT před větvením střeva (VSDT)	426 - 754 (554)	390 - 732 (483)
VSDT/DT (%)	17,2 - 29,5 (21,0)	17,0 - 30,5 (22,0)
VSDT/FB (%)	83,6 - 131,5 (96,7)	69,8 - 145,5 (117,6)
DT před genitálním pórem (GPDT)	305 - 557 (430)	184 - 426 (339)
GPDT/DT (%)	13,3 - 25,9 (15,8)	9,9 - 16,2 (13,8)

Previtelinní DT (PVDT)	396 - 918 (722)	557 - 746 (606)
PVDT/DT (%)	15,0 - 37,3 (27,9)	19,6 - 30,3 (27,8)
Post-testes DT (PTDT)	438 - 1014 (748)	461 - 701 (467)
PTDT/DT (%)	23,4 - 31,5 (27,6)	20,3 - 24,9 (22,6)
Post-ceca DT (PCDT)	128 - 389 (209)	139 - 402 (225)
PCDT/DT (%)	4,6 - 12,5 (8,0)	6,1 - 17,7 (10,0)
délka cirrového vaku (DCV)	489 - 903 (696)	378 - 600 (392)
šířka cirrového vaku	46 - 98 (70)	29 - 77 (59)
DCV/BL (%)	19,3 - 33,6 (24,1)	15,7 - 26,2 (18,8)
Délka anteriorního varlete (DAV)	102 - 343 (223)	149 - 291 (208)
Šířka anteriorního varlete (ŠAV)	173 - 324 (261)	185 - 266 (247)
Délka posteriorního varlete (DPV)	133 - 413 (279)	200 - 292 (222)
Šířka posteriorního varlete (ŠPV)	193 - 346 (257)	191 - 282 (215)
DAV/DPV	0,64 - 1,26 (0,80)	0,67 - 1,14 (0,90)
ŠAV/ŠPV	0,68 - 1,17 (1,02)	0,94 - 1,17 (1,01)
Délka vaječniku	73 - 220 (182)	56 - 119 (100)
Šířka vaječniku	109 - 318 (208)	91 - 187 (136)
Délka mezi vaječníkem a AV (DV-AV)	154 - 713 (333)	320 - 952 (603)
DV-AV/BL(%)	8,3 - 19,7 (12,3)	15,9 - 30,7 (26,6)
Délka mezi ÚP a AV (DÚP-AV)	217 - 889 (502)	409 - 1048 (694)
DÚP-AV/DT (%)	11,7 - 24,6 (18,0)	18,4 - 33,8 (30,6)
Průměrná délka vajíček	56 - 80 (75)	72 - 88 (76)
Průměrná šířka vajíček	26 - 49 (35)	42 - 70 (52)

*AV – anteriorní varle, BP – břišní přísavka, ÚP – ústní přísavka



Obr. 13: Trvalé preparáty motolice *Podocotyle atomon*: **a)** *P. atomon* z helmintologické sbírky AV ČR, hostitel *Gasterosteus aculeatus* (koljuška tříostná), **b)** *P. atomon* ze Svalbardu, hostitel *Gymnocanthus tricuspis*, **c)** *P. atomon* ze Svalbardu, hostitel *Myoxocephalus scorpius*.



Obr. 14: Podrobný nákres *P. atomon* z hostitele *G. tricuspis* s popisem anatomie: BP – břišní přísavka, C – cirrus, CV – cirrový vak, D – děloha, EM – exkretční měchýř, FA – farynx, GP – genitální pór, J – jícen, RS – receptakulum seminis, SS – slepé střevo, V – vitelária, VA – varlata, VJ – vaječník.

***Steringophorus furciger* (Olsson, 1868) Odhner, 1905 (Tab. 11, Obr. 15, Obr. 16)**

Hostitelé: *Gymnocanthus tricuspis*.

Lokalita: zátoky Petuniabukta a Adolfbukta.

Lokalizace v hostiteli: střevo, pylorické výběžky.

Popis:

Tělo oválné nebo zejména u mladších nedovyvinutých stádií nabývající tvaru kosočtverce. Šířka těla odpovídá třetině až dvěma pětinaám délky těla. Ústní přísavka kulatá a menší než břišní přísavka. Břišní přísavka oválná, mírně širší než delší, nespecializovaná a nijak nebývá vystouplá z těla. Prefarynx nepřítomný. Farynx výrazný, nabývající čtvrtinové velikosti ústní přísavky. Jícen krátký zakončený větvicím se slepým střevem do dvou větví táhnoucích se až do posteriorní části těla. Střevo se větví v přední části těla (forebody) anteriorně od cirrového vaku a genitálního póru. Zakončeno je anteriorně od dělohy nebo až v její oblasti. Varlata jsou dvě, kulatá, stejně veliká a zpravidla vedle sebe posteriorně od břišní přísavky či u mladších jedinců zasahují do posteriorní oblasti břišní přísavky. Cirrový vak je svalnatý, kulatý až oválný, vyplňující veškerý prostor mezi větvemi střeva a anteriorní částí břišní přísavky. Genitální pór se z ventrálního pohledu na levé části cirrového vaku anteriorně od břišní přísavky. Vaječník je velikostně menší nebo srovnatelný s velikostí varlat, laločnatý a nachází se anteriorně od pravého varlete, často zcela zakrytý posteriorní částí břišní přísavky. Vitelária tvořena dvěma shluky nacházejícími se laterálně jak na levé tak pravé straně zpravidla v půlce délky těla v oblasti břišní přísavky a varlat. Děloha se nachází posteriorně od varlat a střeva a u vyspělejších jedinců vyplňuje značnou část (2/3 – 3/4) posteriorní části celého těla. V posteriorní části také ústí exkreceční měchýř, který je zpravidla tvaru velkého písmene Y, kdy se měchýř větví zpravidla posteriorně od břišní přísavky a jednotlivé větve dosahují až do oblasti laterálně od jícnu.

Poznámky:

Morfologie preparátů motolic ze Svalbardu zcela souhlasí s popisem rodu *Steringophorus* daným v Keys to Trematoda (Bray 2002).

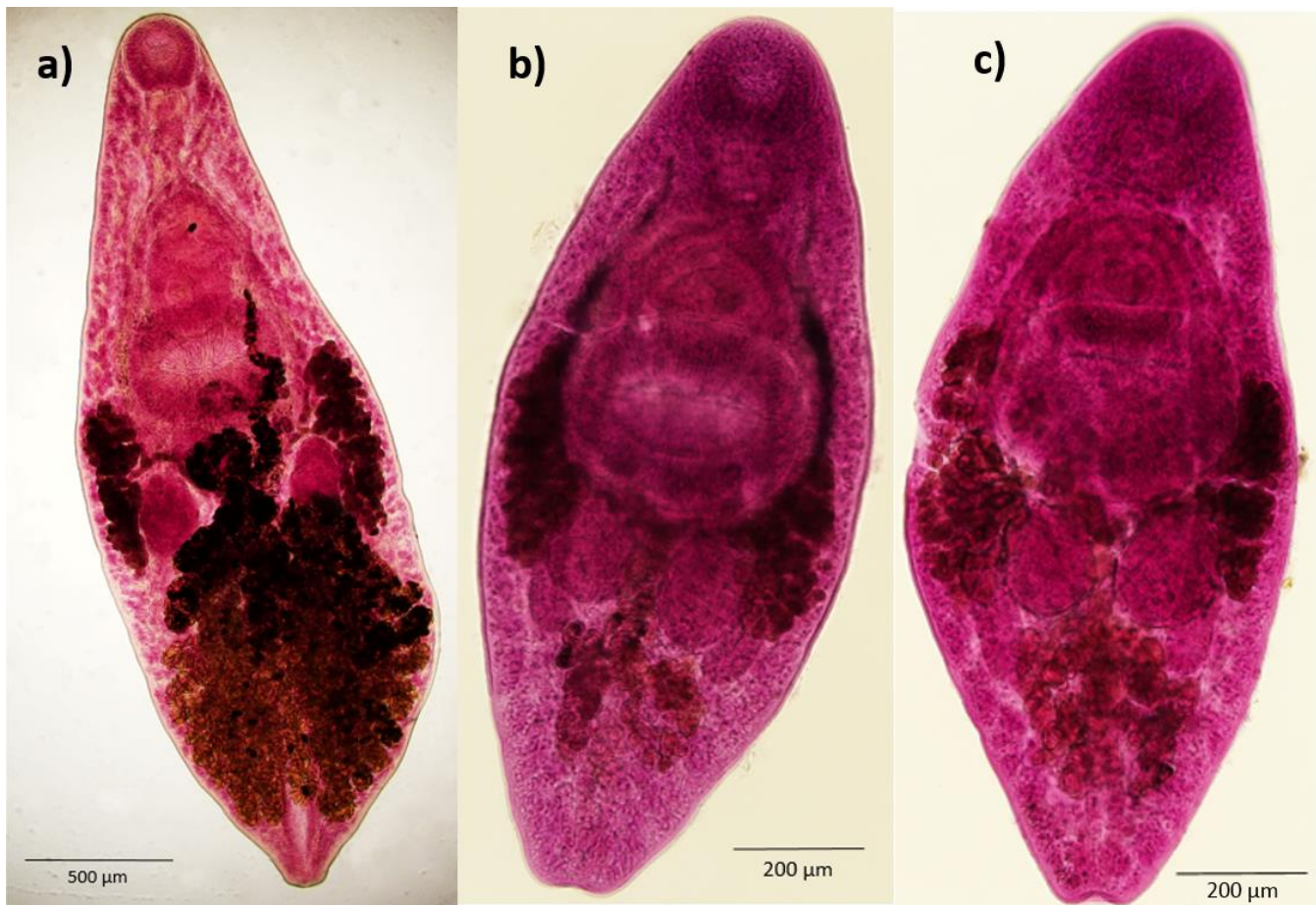
Z tabulky (

Tab. 11) je patrné, že se preparáty z *G. tricuspis* ze Svalbardu v mnohých morfometrických parametrech lišily od preparátů z helmintologické sbírky. Důvodem může být fakt, že značnou část získaných vzorků ze Svalbardu tvoří ještě plně nedovyvinutí dospělí jedinci, u kterých je patrná zcela nedovyvinutá děloha a varlata, která jsou ještě částečně kryta posteriorní částí břišní přísavky.

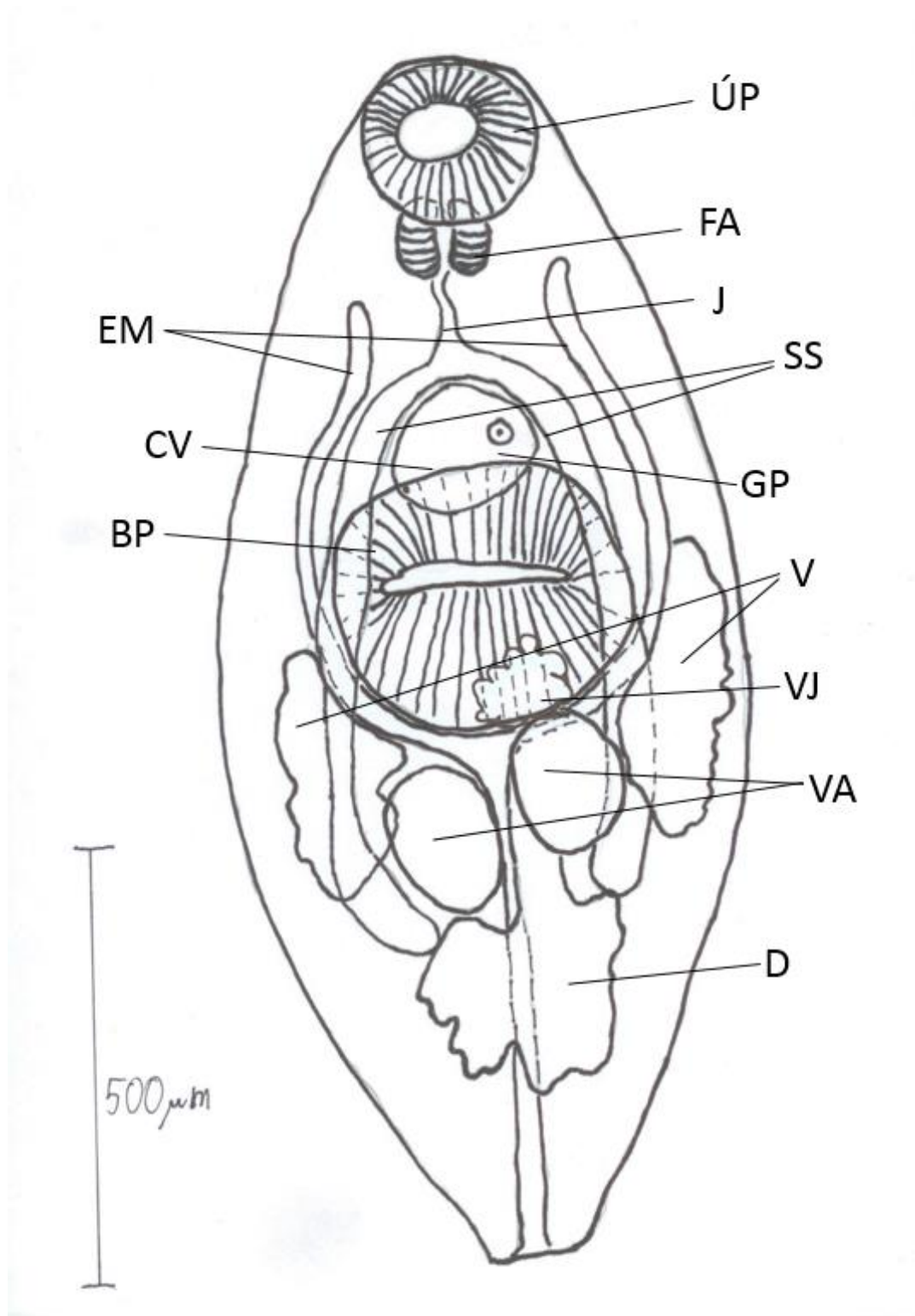
Tab. 11: Morfologické parametry motolic druhu *Steringophorus furciger* získaných z *G. tricuspis* na Svalbardu a preparátů *S. furciger* z helmintologické sbírky AV ČR. V závorce je uvedena hodnota mediánu. Rozměry jsou uváděny v μm .

	<i>S. furciger</i> (Svalbard)	<i>S. furciger</i> (AV ČR)
počet preparátů	8	4
délka těla (DT)	1331 - 2188 (1415)	2218 - 3760 (2989)
šířka těla (ŠT)	505 - 668 (554)	879 - 1532 (1025)
ŠT/DT (%)	30,5 - 46,9 (36,9)	34,3 - 40,7 (37,0)
forebody (FB)	383 - 595 (489)	545 - 948 (902)
FB/DT (%)	27,2 - 37,8 (32,6)	24,6 - 31,7 (26,9)
délka ÚP (DÚP)	167 - 235 (193)	257 - 284 (271)
šířka ÚP (ŠÚP)	169 - 246 (190)	250 - 305 (282)
ŠÚP/DÚP	0,94 - 1,05 (1,02)	0,97 - 1,10 (1,03)
délka BP (DBP)	270 - 449 (300)	466 - 610 (490)
šířka BP (ŠBP)	282 - 439 (364)	521 - 676 (547)
ŠBP/DBP	0,83 - 1,29 (1,21)	1,08 - 1,16 (1,11)
ŠBP/ŠÚP	1,53 - 2,17 (1,83)	1,82 - 2,22 (2,08)
délka farynxu (DF)	88 - 104 (95)	132 - 180 (163)
šířka farynxu (ŠF)	95 - 128 (102)	125 - 155 (145)
ŠF/DF	1,00 - 1,28 (1,09)	0,83 - 1,04 (0,87)
ŠF/ŠÚP	0,44 - 0,59 (0,54)	0,48 - 0,55 (0,50)
délka jícnu (DJ)	61 - 72 (65)	34 - 176 (114)
DJ/DT (%)	3,0 - 5,2 (4,3)	1,5 - 5,9 (3,4)
Preovariální DT (PODT)	560 - 805 (684)	1011 - 1503 (1356)
PODT/DT (%)	36,8 - 52,2 (46,9)	40,0 - 47,3 (44,5)
DT před větvením střeva (VSDT)	254 - 402 (308)	331 - 563 (540)
VSDT/DT (%)	18,2 - 24,7 (20,9)	14,8 - 18,8 (16,2)
VSDT/FB (%)	58,3 - 69,3 (66,9)	58,9 - 61,0 (60,1)
DT před genitálním pórem (GPDT)	222 - 512 (380)	585 - 831 (658)
GPDT/DT (%)	16,4 - 30,3 (24,3)	21,8 - 26,4 (22,1)
Previtelinní DT (PVDT)	473 - 732 (582)	734 - 1195 (1108)
PVDT/DT (%)	33,5 - 43,6 (39,9)	28,7 - 40,0 (35,6)
Post-testes DT (PTDT)	382 - 921 (422)	915 - 1623 (1172)
PTDT/DT (%)	28,7 - 42,1 (31,2)	39,0 - 43,2 (40,3)
délka cirrového vaku (DCV)	125 - 353 (278)	369 - 498 (433)
šířka cirrového vaku	108 - 248 (190)	285 - 348 (307)
DCV/BL (%)	8,7 - 25,3 (15,6)	13,2 - 16,6 (14,5)
Délka varlat (DV)	181 - 209 (197)	206 - 375 (296)
Šířka varlat (ŠV)	129 - 172 (156)	189 - 251 (201)
Délka vaječníku	140 - 221 (186)	97 - 407 (228)
Šířka vaječníku	82 - 148 (125)	211 - 283 (221)
Délka mezi BP a varlaty (DBP-V)	15 - 92 (21)	22 - 242 (157)
Průměrná délka vajíček	39 - 48 (45)	42 - 47 (45)
Průměrná šířka vajíček	21 - 30 (24)	22 - 28 (25)

* BP – břišní přísavka, ÚP – ústní přísavka



Obr. 15: Trvalé preparáty *Steringophorus furciger*: **a)** *S. furciger* z helmintologické sbírky AV ČR, hostitel *Limanda limanda* (platýs limanda), **b)** a **c)** *S. furciger* ze Svalbardu, hostitel *Gymnocanthus tricuspis*.



Obr. 16: Podrobný náčrt *S. furciger* z hostitele *G. tricuspis* s popisem anatomie: BP – břišní přísavka, C – cirrum, CV – cirrový vak, D – děloha, EM – exkretční měchýř, FA – farynx, GP – genitální pór, J – jícen, SS – slepé střevo, V – vitelária, VA – varlata, VJ – vaječník.

5. Diskuse

5.1 Systematika

Na základě dat z molekulární analýzy markerů 28S rDNA a ITS2 bylo v trávicím traktu hostitelů motolice druhu *Anomalotrema koiae* v zátocích Petuniabukta, Adolfbukta a zálivu Adventfjorden nalezeny 4 druhy motolic náležících do tří různých čeledí: Acanthocolpidae, Fellodistomidae a Opecoelidae.

Výskyt druh *Anomalotrema koiae* ve střevě vranky *Gymnocanthus tricuspis* a v hepatopankreatu surmovky *Buccinum undatum* byl mimo molekulární analýzy 28S rDNA, která již byla provedena v rámci méj bakalářské práce (Novotný 2019), také potvrzen molekulární analýzou markeru ITS2. Pro získání ITS2 sekvence byly použity referenční vzorky *A. koiae* z Přírodopisného muzea v Londýně, jelikož doposud neměl tento druh v databázi GenBank zastoupenou ITS2 sekvenci. Nově byl druh *A. koiae* popsán na základě zmíněných molekulárních metod ze surmavek *Buccinum glaciale* a *Plicifusus kroyeri*. Také je v této práci poskytnut první detailní popis morfologie larválních stádií druhu *A. koiae*, a to zejména cercárií, na který byly použity metody barvení fixovaných preparátů a SEM. Bohužel na provedení morfologické či molekulární studie nebyly nalezeny žádné vzorky či preparáty metacercárií, které by morfologicky odpovídaly druhu *A. koiae*.

Morfologicky se larvální stádia motolice *A. koiae*, zejména cercárie, odlišují od ostatních xiphidiocercárií cotylomikrocerního typu vyskytujících se ve stejných oblastech a hostitelích zejména délkou ocásku, která až dvojnásobně přesahuje délku ocásku cercárií druhu *Podocotyle atomon* (~ 26 μm) a *P. reflexa* (~ 55 μm) a dosahuje 20% - 40% délky těla (Køie 1981; Barnett et al. 2014). Od cercárií druhu *P. reflexa*, které byly též popsány ze surmavek *B. undatum*, se také odlišuje umístěním penetračních žláz, kdy cercárie *P. reflexa* je mají všechny umístěné v jedné úrovni posteriorně od farynxu, kdyžto cercárie *A. koiae* je mají umístěn aspoň 1 pár v oblastech anteriorně od farynxu a tři páry posteriorně od farynxu (Køie 1981). Larvální stádia motolice *A. koiae* jsou popsána teprve jako druhý druh motolic čeledi Opecoelidae, které parazitují u plžů čeledi Buccinidae. Tomuto tvrzení protirečí údaje v článku Barnett et al. 2014, kde byly mimo druh *P. reflexa* zaznamenány ještě dva další druhy opecoelidních motolic v plžích čeledi Buccinidae. Oba druhy plžů ovšem byly později přeřazeny do jiných čeledí, *Lirabuccinum dirum* (hostitel motolice *Cercaria searlesiae*) byl zařazen do čeledi Tudicilidae a *Pisania striata* (hostitel motolice *Cercaria pisaniae*) byl zařazen do čeledi Pisaniidae (Barnett et al. 2014; Kantor et al. 2021). Druh *A. koiae* patří do podčeledi Opecoelinae. Z této podčeledi již bylo popsáno deset druhů cercárií, a to především z plžů čeledi Columbelloidea (pět druhů) náležejících do stejné nadčeledi, jako čeleď Buccinidae, a to nadčeledi Buccinoidea. Jde o čeleď malých mořských epibentických plžů (většina nepřesahuje délku 20 mm) s vyšší diverzitou v tropických oblastech (Demaintenon 2019). Dále byly cercárie podčeledi Opecoelinae popsány z čeledí Nassariidae

(1 druh), Semisulcospiridae (1 druh) a Hydrobiidae (3 druhy), z čehož poslední dvě vyjmenované čeledi jsou plži žijící zejména ve sladkých až brakických vodách (Barnett et al. 2014).

Mimo larvální stádia *A. koiae* se také v surmovkách, zejména rodu *Buccinum*, v litorálních vodách Svalbardu vyskytovala také larvální stádia rodu *Neophasis*, která by si mohla o zmíněné hostitele konkurovat.

Dospělé motolice *A. koiae* byly v zátokách Petuniabukta a Adolfbukta nalezeny na základě molekulárních i morfologických analýz pouze u vranky severní (*Gymnocanthus tricuspis*). V literatuře byla *A. koiae* nalezena také ve čtyřech druzích okouníků rodu *Sebastes*, včetně druhu *Sebastes mentella*, který se vyskytuje zejména v hlubších vodách kolem Svalbardu (hloubka 30 m a víc), avšak pozitivně infikovaný *S. mentella* zatím nebyl na Svalbardu zaznamenán (Bakay & Mel'nikov 2008; OBIS 2021).

Rod *Anomalotrema* obsahuje 2 druhy: *A. koiae* a *A. putjatini*. Mezi základní rozdíly uváděnými v práci Gibson & Bray 1984, které odlišují druh *A. koiae* od *A. putjatini*, patří méně vystouplá (protažená) břišní přísavka a vaječník, který se znatelně skládá ze tří až čtyř laloků, přičemž vaječník druhu *A. putjatini* je vaječník popsán s nestálým a často nerozeznatelným počtem laloků. Také se od sebe odlišují odlišným poměrem velikostí ústní a břišní přísavky, přičemž *A. putjatini* ho má 1 : 1,47 – 1,6 a *A. koiae* má 1 : 1,8 – 2,4 (Gibson & Bray 1984). Preparát *A. koiae* ze Svalbardu měl poměr velikosti přísavky 1 : 2,3. Také se od sebe odlišují svojí oblastí výskytu, přičemž *A. koiae* obývá vody jak severního Atlantiku, tak severního Pacifiku, zatímco *A. putjatini* byla zaznamenána pouze v severním Pacifiku. Co se týká hostitelské specifity, *A. putjatini* byla nalezena v rybách řádů Scorpaeniformes a Gadiformes a *A. koiae* u ryb řádů Scorpaeniformes, Gadiformes a Pleuronectiformes (Zhukov 1957; Gibson & Bray 1984; Sokolov et al. 2018).

Na první pohled už při samotné pitvě lze odlišit *A. koiae* od příbuzného a běžnějšího druhu *Podocotyle atomon*, který na Svalbardu parazituje u stejných definitivních hostitelů jako *A. koiae*. Jde zejména výrazněji protáhlým a tenčím tvarem těla a výrazněji oddělenou přední částí těla (forebody) a zadní částí těla (hindbody). Také břišní přísavka u *A. koiae* bývá více vystouplá, než je tomu u *P. atomon*.

Od dalšího běžnějšího druhu motolice *Steringophorus furciger* jde snadno na první pohled odlišit druh *A. koiae* zejména rozdílnou šířkou těla a rozdílným seskupením vitelárií, která jsou viditelná i u neobarvených jedinců *S. furciger*, jsou tmavá a nacházejí se ve dvou polích laterálně v prostřední části těla. Již v minulosti byly v některých případech motolice z čeledi Fellodistomidae zaměňovány s motolicemi z čeledi Opecoelidae. U některých druhů mohou vypadat neobarvené vzorky velice podobně, ale hlavní rozdíly mezi těmito dvěma čeleděmi je rozdílně tvarovaný exkreční vak a rozdílná distribuce vitelárií, jejichž rozložení je více omezené jen na určitou oblast u čeledi Fellodistomidae (Cribb 2005).

5.2 Životní cyklus motolice *Anomalotrema koiae* (Obr. 18)

Na základě výsledků z molekulárních analýz markerů velké ribosomální podjednotky (28S rDNA) a ITS2 jasně vyplývá příbuznost mezi larválními stádii ze surmoven *B. undatum*, *B. glaciale* a *P. kroyeri* a dospělých stádií z vranky severní (*G. tricuspis*). U kladogramu fylogenetických vztahů pro 28S rDNA (Obr. 4) se sekvence motolic z výše zmíněných hostitelů seskupily se sekvencí motolice druhu *Anomalotrema koiae* získanou z databáze GenBank. Výsledky byly i následně potvrzeny v kladogramu fylogenetických vztahů pro marker ITS2 (

Obr. 5), ve kterém se sekvence z totožných motolic z předešlé analýzy seskupily se sekvencí motolice druhu *A. koiae*, která byla získána ze vzorku poskytnutého Přírodopisným muzeem v Londýně, a tudíž ho považují za důvěryhodný. Druhovou náležitost prokazuje také jeden preparát *A. koiae* z *G. tricuspis*, jehož morfologie se shoduje s popisem morfologie tohoto druhu v odborné literatuře (Gibson & Bray 1984) a také s preparáty poskytnutými Parazitologickým ústavem AV ČR. Na základě zmíněných dat mohou prohlásit, že námi nalezená larvální stádía ze surmoven *B. undatum*, *B. glaciale* a *P. kroyeri* a dospělá stádía z vranky *G. tricuspis* patří tomu stejnému druhu, a to motolici druhu *Anomalotrema koiae*. Stádium miracidia nebylo u druhu *A. koiae* doposud pozorováno.

Surmovky *B. undatum*, *B. glaciale* a *P. kroyeri* slouží pro motolici *A. koiae* jako první mezihostitelé. Druh *A. koiae* nemá striktní hostitelskou specifitu, pro první mezihostitele, jelikož rody *Buccinum* a *Plicifusus* náleží do rozdílných podčeledí (Vaux et al. 2017). Proto lze předpokládat i výskyt u dalších druhů surmoven čeledi Buccinidae nacházejících se na Svalbardu, a to zejména u ostatních druhů rodu *Buccinum*, např. *B. polare*, nebo u surmoven rodů *Neptunea* a *Volutopsius*, které se také v podobných habitatech jako surmovky rodu *Buccinum* nachází (Rózycki 1989; Hop et al. 2002).

V plících následně probíhá vývoj larválních stádií a jejich množení, kdy první generaci tvoří mateřská sporocysta, u které dochází v germinálních shlucích k tvorbě dceřiných sporocyst. Ty poté migrují zejména do hepatopankreatické žlázy plže. Zde poté zůstávají, během čehož přijímají živiny a vylučují svým tegumentem, zatímco se jim v těle ze zárodečných buněk vyvíjí cercárie. Cercárie poté unikají z těla hostitele, přičemž u motolic čeledi Opecoelidae byl pozorován jak cirkadiánní, tak nepravidelný rytmus vyplouvání cercárií. Cirkadiánní rytmy jsou spojeny především s pravidelnou fluktuací abiotických podmínek v prostředí prvního řádu, jako např. teplota vody. Ta ovlivňuje např. vyplouvání cercárií druhu *Podocotyle atomon* (Prokofiev et al. 2016). Nepravidelné vyplouvání může být spjato s životními cykly jejich hostitele, jak je tomu např. u *Allopodocotyle* sp., která parazituje u ušně *Haliothis asinina*, která vyplouvá zejména během rozmnožování mezihostitele. Autoři to vysvětlují tím, že v tuto dobu má největší pravděpodobnost narazit na dalšího hostitele, který se nejspíše živí gametami ušně (Lucas et al. 2005). U mnohých druhů není nepravidelný interval vyplouvání dosud vysvětlen jako např. u *Cercaria capricornia* XII (Barnett et al. 2014). U cercárií druhu *A. koiae* žádné vyplouvání pozorováno nebylo (viz experiment v kapitole 1.6.2) (Ditrich & Bednářová ústní sdělení). Důvody pro neúspěšné navedení podmínek pro vyplouvání mohou být tři. První by mohl být nesprávně

zvolený stimul, který by mohl cercárie přimět k vyplouvání. Druhým důvodem může být fakt, že vývoj mnohých druhů motolic, zvláště v boreálních a polárních oblastech, je řízen sezónními podmínkami v prostředí během roku, což znamená, že vyplouvání cercárií probíhá pouze v omezené části roku. Zdokumentováno je to u cercárií druhu *P. atomon*, u kterých byl studován vývoj larválních stádií v plžích *Littorina saxatilis* v Barentsově moři, které mají vrcholy vyplouvání zejména během jarních měsíců (březen – duben) a poté v pozdním létě a na podzim (září – říjen), přičemž záleží na období, kdy byli samotní plži infikováni (Glaktionov & Dobrovolskij 2003). Tím, že experiment probíhal v letní sezóně, jsme se nemuseli trefit do správného období, kdy cercárie obvykle vyplouvají z těla hostitele, avšak jak dokazují preparáty cercárií v mé studii, již během pitev surmoven v časných letních měsících (červen – srpen) byly v jejich hepatopankreatu nalezeny kromě sporocyst i plně vyvinuté cercárie. Třetím důvodem může být rozdílná strategie vyhledání a infekce dalšího meziphostitele. Ditrich a spol. se během experimentů prováděných v sezóně 2013 pokoušeli infikovat druhého meziphostitele různonožce rodu *Gammarus* podáváním potravy složené z hepatopankreatických žláz surmoven infikovaných cotylomikrocerními cercáriemi. Následně byla u různonožců pozorována ve svalovině časná stádia metacercárií vykazující ještě některé znaky cercárií jako např. přítomnost styletu (CPE 2013). Z toho lze usuzovat, že strategie cercárií *A. koiae* spočívá ve vyčkání na smrt či usmrcení surmovenky. Její mrtvola poté přiláká mrchožrouty, kterými jsou v litorálním pásmu Svalbardu především různonožci. Následně se buď cercárie nechají pasivně jimi pozřít, přičemž proniknou do svaloviny různonožce skrz trávicí trubici, nebo aktivně dolezou ke krmicímu se různonožci a infikují ho skrz mezery v exoskeletonu korýšů. U vztahu mezi larválními stádií opecoelidních motolic a plži ještě nebyl studován vztah mezi přítomností či intenzitou infekce a délkou života jejich hostitele. Jediný známý případ, kde byl studován vztah mezi larválními stádií čeledi Opecoelidae a jejich hostitelem, je parazitická kastrace plže druhu *Haliotis asinina* opecoelidní motolicí rodu *Allopodocotyle*, která pozměnila i expresi některých genů v mozku plže (Rice et al. 2006). Viditelnou parazitární kastraci jsme u parazitovaných plžů čeledi Buccinidae nepozorovali, jejich pohlavní ústrojí se nelišila od pohlavních ústrojí neinfikovaných jedinců.

Pokud je blešivec infikován skutečně polknutím cercárie, nejde mezi motolicemi o ojedinělý jev. Podobný způsob nákazy byl zaznamenán zejména u motolic čeledí Azygiidae a Bivesiculidae, kde cercárie přímo infikuje definitivního hostitele, zpravidla rybu, když jí jsou pozřeny. Také jsou tím známy larvy motolic z čeledi Echinostomatidae, rody *Petasiger* a *Echinochasmus*, které jsou schopné nakazit rybu, která je pozře. Zde jim však ryba slouží jako druhý meziphostitel (Glaktionov & Dobrovolskij 2003). U cystoforních cercárií motolic druhu *Halipegus occidualis* (Digenea: Hemiuridae) nebylo pozorováno žádné aktivní přizpůsobení k hledání dalšího meziphostitele. Cercárie tohoto druhu jsou schopné se až po dobu několika měsíců pasivně vznášet ve vodním sloupci, dokud je nepozře korýš (klanonožec nebo lasturnatka), který slouží v jejím životním cyklu jako druhý meziphostitel (Goater et al. 1990). Další možností, jak by mohli být korýši pasivně nakaženi cercáriemi, je přes žábry, kterými prohánějí vodu, která může obsahovat cercárie. Ty následně mohou snadno do měkké tkáně žaber

penetrovat. Tohoto způsobu využívají motolice zejména skupin Lecithodendrioidea a Microphallidae (Glaktionov & Dobrovolskij 2003). Žádná taková strategie ovšem nebyla u cercárií čeledi Opecoelidae doposud zaznamenána. Pokud můžeme soudit podle chování cercárií, které jsme pozorovali, nejeví se tento způsob jako příliš pravděpodobný. Uvolněné cercárie neměly tendenci plavat ve vodním sloupci; naopak, vyhledávaly pevný podklad a pohybovaly se po nich „píd'alkovitým“ pohybem. Bylo by určitě užitečné zopakovat experiment prováděný Ditrichem a spol. z roku 2013, přičemž by se pozorovalo, zda se cercárie aktivně nepokouší do těla různonožce dostat, nebo zda by je různonožec nepojídal takovým způsobem, aby se nepoškozené cercárie dostaly dovnitř těla. Avšak aby to mohl pozorovatel sledovat, musel by zpočátku utlumit aktivitu či zcela pozastavit pohyb různonožce (např. mě napadá velice nízkou teplotou či mechanicky) tak, aby byl proces nákazy viditelný.

Také by bylo užitečné dříve zmíněný experiment zopakovat pro získání vzorků zejména metacercárií, jelikož v laboratorních sbírkách na CPE chybějí, a proto jsem je nemohl zavést do svojí studie. Veškeré informace o potenciálním druhém mezihostiteli různonožci druhu *Gammarus setosus* mám z laboratorních protokolů a výroční zprávy z roku 2013, kde byl výše zmíněný experiment zaznamenán.

Ve svalovině *G. setosus* probíhá zapouzdření cercárie do stádia metacercárie, které vyčkává, až je hostitel pořízen definitivním hostitelem. U příslušníků čeledi Opecoelidae byl u některých druhů pozorován vývoj progenetických metacercárií. *Coitocaecum parvum* (Opecoelidae: Opecoelinae) má fakultativně tříhostitelský cyklus, kde jako druhý mezihostitel taktéž slouží různonožci (*Paracalliope fluviatilis*). Při absenci definitivního hostitele v prostředí, kde se různonožec nachází, může *C. parvum* podstoupit progenezi a je schopná produkovat vajíček ještě v těle různonožce (Lagrue & Poulin 2006). Avšak u metacercárií druhu *A. koiae*, který patří do stejné podčeledi jako *C. parvum*, nebyla progeneze metacercárií pozorována.



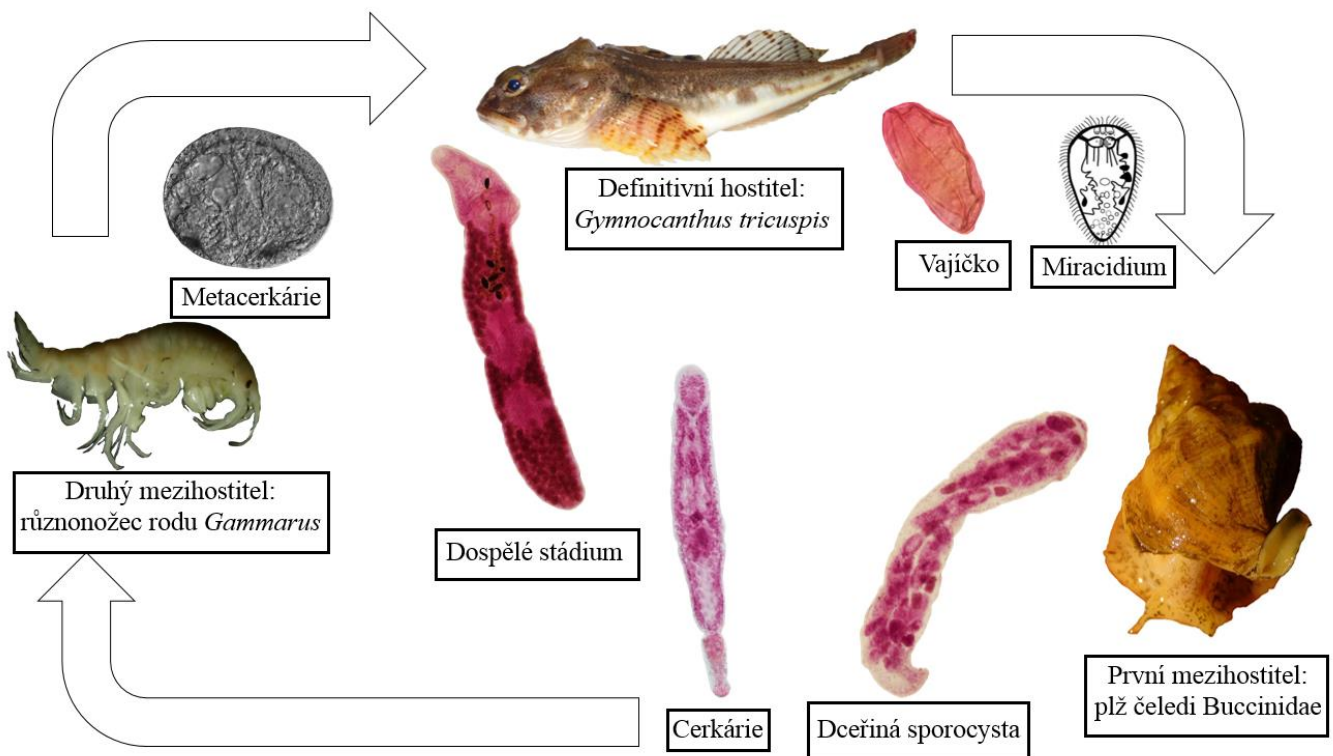
Obr. 17: Fotografie z experimentu prováděného Ditrichem a spol. v roce 2013 na Svalbardu, **a)** Potenciální druhý mezihostitel motolice *A. koiae*, různonožec *Gammarus setosus* (Šíchová 2013), **b)** rané stádium metacerkárie *A. koiae* zapouzdřené ve svalovině *G. setosus* (Ditrich 2013).

Definitivním hostitelem motolice *A. koiae* je v zátokách Petuniabukta a Adolfbukta je vranka severní (*Gymnocanthus tricuspis*). Ta se vyskytuje na Svalbardu obvykle v mělkých vodách s bahnitým či písčítým dnem bez vegetace. Oproti konkurenčnímu druhu *M. scorpius* snáší chladnější vodu s nižší salinitou, a proto převažuje na místech poblíž tajících ledovců, nebo míst kde se vlévá voda z ledovců do moře (Brand & Fischer 2016). Ledovce také s sebou přinášejí mnoho sedimentů, které vytvářejí ideální prostředí pro tento druh. Jde o potravního generalistu, v jehož potravě převažují zejména bentičtí korýši, zejména různonožci, měkkýši a kroužkovci (Gray et al. 2017). Dospělá stádia *A. koiae* byla nalezena zejména v pylorických výběžcích a ve střevech. Během terénního kurzu na Svalbardu v roce 2018 nebyl nalezen ani jeden *G. tricuspis* s velkým počtem *A. koiae*, vždy byly nalézány pouze v řádu jednotek kusů.

Je zde zajímavé podotknout, že ač dva druhy vranek *G. tricuspis* a *M. scorpius* obývají tytéž oblasti a sdílí podobající se niky jakožto bentičtí predátoři, z výsledků zejména molekulární analýzy vyplývá, že mají rozdílnou skladbu střevních motolic. Zatímco u *M. scorpius* zcela převažuje druh motolice *Podocotyle atomon*, u *G. tricuspis* převažuje zejména fellodistomidní motolice *Steringophorus furciger* a v minoritním zastoupení také *A. koiae* a *P. atomon*. Může to být dáno rozdílnou habitatovou preferencí (zmněno o odstavec výše), kdy prvním mezihostitelům *S. furciger*, mlžům rodu *Nucula*, vyhovuje spíše habitat s písčítým či bahnitým sedimentem, ve kterém bývají po většinu času zahrabaní, než habitat s kamenitým dnem a nárostem chaluh, který obývá zejména vranka *M. scorpius* (Køie 1979; Brand & Fischer 2016). Také v tom může hrát roli rozdílná potravní preference, kdy sice menší jedinci obou druhů vranek se živí obdobnou potravní skladbou skládající se zejména z menších korýšů a kroužkoců, přičemž dospělí *G. tricuspis* setrvávají na podobné potravní skladbě bentičtých korýšů, měkkýšů a kroužkoců po celý život, kdyžto dospělí jedinci *M. scorpius* mají rozmanitější potravní skladbu, kde převažují větší druhy korýšů (krevety, krabi) a menší druhy ryb. U vranky *M. scorpius* byla

také zaznamenána častější konzumace pelagického zooplanktonu, než je tomu u *G. tricuspis* (Gray et al. 2017). Dalším druhem vranky, kde byl výskyt *A. koiae* v literatuře prokázán, je vranka atlantská (*Artediellus atlanticus*), která se taktéž vyskytuje ve vodách Svalbardu, ale oproti studovaným vrankám přebývá ve větších hloubkách (35 – 900 m) a její výskyt nebyl v odběrových lokalitách ani jednou zaznamenán (Køie 2000; Rees & Byrkjedal 2013; Froese & Garilao 2021).

Motolice *A. koiae* má nízkou hostitelskou specifitu, co se týká definitivních hostitelů. Mimo záznamy ve vrankovitých rybách byla také popsána z řádů treskovitých a platýsovitých ryb (Gibson & Bray 1984; Boje et al. 1997). Mezi druhy s podobnou potravní specializací jako *G. tricuspis*, ve které tvoří značnou část jídelníčku bentičtí korýši, patří zejména některé druhy platýsovitých ryb, přičemž ve vodách okolí Svalbardu se nachází zejména druhy platýs atlantský (*Hippoglossoides platessoides*) a platýs černý (*Reinhardtius hippoglossoides*), u kterých lze předpokládat, že by také mohli být potenciálními definitivními hostiteli motolice *A. koiae* i na Svalbardu (Martell & McClelland 1994; Boje et al. 1997; Høines & Gundersen 2008). *Hippoglossoides platessoides* je v zátocě Petuniabukta vzácným úlovkem, kdežto v zálivu Adventfjorden je počátkem letní sezóny dominantní bentickou rybou. Na uvedených lokalitách však při pitvě nebyla nikdy *A. koiae* nalezena.



Obr. 18: Závěrečné schéma tříhostitelského životního cyklu motolice *A. koiae* v litorálních vodách souostroví Svalbard s vyznačenými hostiteli a rozdílnými stádii tohoto druhu. (Chybí zde vyznačené stádium mateřské sporocysty, jelikož doposud nebylo u tohoto druhu pozorováno.)

6. Závěry

- Životní cyklus motolice *Anomalotrema koiae* je tříhostitelský (Obr. 18).
- Jako první mezihostitelé motolice *A. koiae* byly molekulárně prokázány surmovky *Buccinum undatum*, *B. glaciale* a *Plicifusus kroyeri*, přičemž u druhů *B. glaciale* a *P. kroyeri* jde o první záznam tohoto druhu. Také je v této práci uveden první morfologický popis dceřiných sporocyst a cercárií *A. koiae*.
- Experimentálně byl potvrzen předpoklad, že druhými mezihostiteli motolice *A. koiae* jsou různonožci rodu *Gammarus*.
- Definitivním hostitelem motolice *A. koiae* je na Svalbardu vranka severní (*Gymnocanthus tricuspis*).
- Morfologické údaje motolice *A. koiae* a dalších druhů motolic nalezených během práce potvrzují výsledky z molekulární analýzy. Morfologická data mohou také pomoci s druhovou identifikací střevních motolic u mořských ryb během budoucích expedic a odběrů vzorků na souostroví Svalbard.

Použitá literatura:

- Alves, P. V., Viera, F. M., Santos, C. P., Scholz, T., Luque, J. L., (2015), A checklist of the Aspidogastrea (Platyhelminthes: Trematoda) of the World, *Zootaxa*, 3918: 339 – 396.
- Andres, M. J., Pulis, E. E., Overstreet, R. M., (2014), New genus of opecoelid trematode from *Pristipomoides aquilonaris* (Perciformes: Lutjanidae) and its phylogenetic affinity within the family Opecoelidae, *Folia Parasitologica*, 61(3): 223 - 230.
- Anokhin, I. A., (1966), Diurnal cycle of the activity and behaviour of ants (*Formica pratensis* Retz.) invaded by metacercaria of *Dicrocoelium lanceatum* during the grazing period, *Zoologicheskii Zhurnal*, 45: 687 - 692.
- Ardyna, M., Arrigo, K. R., (2020), Phytoplankton dynamics in a changing Arctic Ocean, *Nature Climate Change*, 10: 892 - 903.
- Arlov, T. B., (1994), A short History of Svalbard (Polarhåndbok), 2. edice, Norsk Polarinstitutt, 95 pp.
- Arthur, J. R., Albert, E., (1994), A survey of the parasites of greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) caught of Atlantic Canada, with notes of their zoogeography in this fish, *Canadian Journal of Zoology - Revue Canadienne de Zoologie*, 72(4): 765 - 778.
- Arundell, K. L., Dubuffet, A., Wedell, N., Bojko, J., Rogers, M. S. J., Dunn, A. M., (2019), *Podocotyle atomon* (Trematoda: Digenea) impacts reproductive behaviour, survival and physiology in *Gammarus zaddachi* (Amphipoda), *Disease of Aquatic Organisms*, 136: 51 - 62.
- Ataev, G. L., Dobrovskij, A. A., Fournier, A., Jourdane, J., (1997), Migration and Development of Mother Sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae), *The Journal of Parasitology*, 83(3): 444 - 453.
- Atopkin, D. M., Shedko, M. B., Sokolov, S. G., Zhokov, A. E., (2018), Phylogenetic relationships among European and Asian representatives of the genus *Aspidogaster* Baer, 1827 (Trematoda: Aspidogastrea) inferred from molecular data, *Journal of Helminthology* 92: 343 - 352.
- Auld, S. K. J. R., Tinsley, M. C., (2014), The evolutionary ecology of complex lifecycle parasites: linking phenomena with mechanisms, *Heredity*, 114: 125 - 132.
- Bakay, Y. I., (2011), Ecological and Parasitological Characteristics of Redfish *Sebastes mentella* (Scorpaeniformes: Sebastidae) from the Norwegian Sea and Adjacent Waters, *Journal of Ichthyology*, 51(1): 90 - 97.
- Bakay, Y. I., Mel'nikov, S. P., (2008), Biological and Ecological Characteristics of Deepwater Redfish *Sebastes mentella* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) at Different Depths in the Pelagial of the Irminger Sea, *Journal of Ichthyology*, 48(1): 68 - 80.
- Barger, M., A., Esch, G., W., (2000), *Plagioporus sinitsini* (Digenea: Opecoelidae): A One-Host Life Cycle, *Journal of Parasitology*, 86: 150 - 153.
- Barnett, L. J., Miller, T. L., (2018), Phenotypic plasticity of six unusual cercariae in nassariid gastropods and their relationships to the Acanthocolpidae and Brachycladiidae (Digenea), *Parasitology International*, 67(2): 225 - 232.
- Barnett, L., Miller, T. L., Cribb, T. H., (2010), Two New *Stephanostomum* - Like Cercariae (Digenea: Acanthocolpidae) From *Nassarius dorsatus* and *N. olivaceus* (Gastropoda: Nassariidae) In Central Queensland, Australia, *Zootaxa*, 2445: 35 - 52.

- Barnett, L., Miller, T. L., Cribb, T. H., (2014), A review of the currently recognised opecoelid cercariae, including the identification and emergence ecology of *Cercaria capricornia* XII (Digenea: Opecoelidae) from *Nassarius olivaceus* (Gastropoda: Nassariidae) in Central Queensland, Australia, *Parasitology International*, 63(5): 670 - 682.
- Basch, P. F., Lie, K. J., Heyneman, D., (1969), Antagonistic interaction between Strigeid and Schistosome sporocysts within a snail host, *Journal of Parasitology*, 55: 753 - 758.
- Belling, J., (1926), The Iron-Acetocarmine Method of Fixing and Staining Chromosomes, *Biological Bulletin*, 50(2): 160 - 162.
- Blasco-Costa, I., Balbuena, J. A., Kostadinova, A., Olson, P. D., (2009), Interrelationships of the Haploporinae (Digenea: Haploporidae): a molecular test of the taxonomic framework based on morphology, *Parasitology International*, 58(3): 263 - 269.
- Boje, J., Riget, F., Køie, M., (1997), Helminth parasites as biological tags in population studies of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)), in the north-west Atlantic, *ICES Journal of Marine Science*, 54: 886 - 895.
- Born-Torrijos, A., Kostadinova, A., Raga, J. A., Holzer, A. S., (2012), Molecular and morphological identification of larval opecoelids (Digenea: Opecoelidae) parasitising prosobranch snails in a Western Mediterranean lagoon, *Parasitology International*, 61(3): 450 - 460.
- Brand, M., Fischer, F., (2016), Species composition and abundance of the shallow water fish community of Kongsfjorden, Svalbard, *Polar Biology*, 39: 2155 - 2167.
- Branišová, V., (2020), Motolice nadčeledi Hemiuroidea v rybách a ploutvenkách na Svalbardu, bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 52 pp.
- Bray, R. A., (2002), Fellodistomidae, *Keys to Trematoda*, 1: 261 - 293.
- Bray, R. A., (2020), Digenean parasites of deep-sea teleosts: A progress report, *Parasites and Wildlife*, 12: 251 - 264.
- Bray, R. A., Cribb, T. H., (2003), The digeneans of elasmobranchs - distribution and evolutionary significance, *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*, Tome 1: 67 - 96.
- Bray, R. A., Cribb, T. H., Littlewood, D. T. J., Waeschenbach, A., (2016), The molecular phylogeny of the digenean family Opecoelidae Ozaki, 1925 and the value of morphological characters, with the erection of a new subfamily, *Folia Parasitologica*, 63:013.
- Bray, R. A., Kuchta, R., (2006), Digeneans from deep-sea marine teleosts off the Outer Hebrides, Scotland, including the description of *Brachyenteron helicoleni* sp. nov. (Zoogonidae), *Acta Parasitologica*, 51: 169 - 175.
- Bray, R. A., Littlewood, D. T. J., Herniou, E. A., Williams, B., Henderson, R. E., (1999), Digenean parasites of deep-sea teleosts: a review and case studies of intrageneric phylogenies, *Parasitology*, 119, Supplement S1: Parasite Adaptation to Environmental Constraints: S125 - S144.
- Bray, R. A., Waeschenbach, A., Dyal, P., Littlewood, D. T. J., Morand, S., (2014), New digeneans (Opecoelidae) from hydrothermal vent fishes in the south eastern Pacific Ocean, including one new genus and five new species, *Zootaxa*, 3768: 73 - 87.
- Bray, R. A., Webster, B. L., Bartoli, P., Littlewood, D. T. J., (2005), A molecular phylogenetic study of the Acanthocolpidae (Digenea), *Acta Parasitologica*, 50: 281 - 291.

- Brindley, P. J., Correia de Costa, J. M., Sripa, B., (2015), Why does infection with some helminths cause cancer?, *Trends in Cancer*, 1(3): 174 - 182.
- Brinkmann, A. Jr., (1975), Trematodes of Greenland, *Meddr Grenland*, 205(2): 1 - 88.
- Briscoe, A. G., Bray, R. A., Brabec, J., Littlewood, D. T. J., (2016), The mitochondrial genome and ribosomal operon of *Brachycladium goliath* (Digenea: Brachycladiidae) recovered from a stranded minke whale, *Parasitology International*, 65(3): 271 - 275.
- Cable, R. M., (1938), Studies on larval trematodes from Kentucky with a summary of known related species, *American Midland Naturalist*, 19: 440 – 464.
- Carlsson, A. M., Justin Irvine, R., Wilson, K., Piertney, S. B., Halvorsen, O., Coulson, S. J. et al., (2012), Disease transmission in an extreme environment: Nematode parasites infect reindeer during the Arctic winter, *International Journal for Parasitology*, 42(8): 789 – 795.
- Castro, G. A., (1996), Chapter 86 Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development, *Medical Microbiology*, 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Combes, C., (1982), Trematodes: antagonism between species and sterilizing effects on snails in biological control, *Parasitology*, 84(4): 151 - 175.
- Constenla, M., Carrassón, M., Moyà, C. M., Fernández-Chacón, A., Padrós, F., Repullés-Albelda, A., Montero, F. E., (2011), Parasitisation by *Bathycreadium elongatum* (Digenea, Opecoelidae) in pyloric caeca of *Trachyrincus scabrus* (Teleostei, Macrouridae), *Diseases of Aquatic Organisms*, 96(3): 239 - 247.
- Cribb, T. H., (1998), The diversity of the Digenea of Australian animals, *International Journal for Parasitology*, 28(6): 899 - 911.
- Cribb, T. H., (2004), Family Opecoelidae Ozaki, 1925, *Key to the Trematoda*, 2: 443 - 531.
- Cribb, T. H., Anderson, G. R., Adlard, R. D., & Bray, R. A., (1998), A DNA-based demonstration of a three-host life-cycle for the Bivesiculidae (Platyhelminthes: Digenea), *International Journal of Parasitology*, 28: 1791 – 1795.
- Cribb, T. H., Bray, R. A., Olson, P. D., Littlewood, D. T. J., (2003), Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny, *Advances in Parasitology*, 54: 197 - 254.
- Cribb, T. H., Miller, T. L., Bray, R. A., Cutmore, S. C., (2014), The sexual adult of *Cercaria praecox* Walker, 1971 (Digenea: Fellodistomidae), with the proposal of *Oceroma* n. g., *Systematic Parasitology*, 88(1): 1 - 10.
- Curran, S. S., Overstreet, R. M., Tkach, V. V., (2007), Phylogenetic Affinities of *Plagiocirrus* Van Cleave and Mueller, 1932 with the Description of a New Species from the Pascagoula River, Mississippi, *Journal of Parasitology*, 93(6): 1452 - 1458.
- Dawes, B., (1946), *The Trematoda*, Cambridge University Press, 644 pp.
- Demaintenon, M. J., (2019), The Columbelloid species of the northeast Pacific coast from the Aleutian Islands to Cedros Island, Baja California (Neogastropoda: Columbelloidae), *Zoosymposia*, 13: 160 - 183.
- Dobrovolskij, A. A., Ataev, G. L., (2003), The nature of reproduction of Digenea rediae and sporocysts, *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*, Tome 1: 249 - 272.
- Dobson, A., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., Hechinger, R. F., Jetz, W., (2008), Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105: 11482 - 11489.

- Dolgov, A. V., Drevetnyak, K. V., (2011), Feeding of three species from the genus *Sebastes* in the Barents Sea, ICES CM 2011/A:26., 13 pp.
- Faltýnková, A., Georgieva, S., Kostadinova, A., Bray, R. A., (2017), Biodiversity and Evolution of Digeneans of Fishes in the Southern Ocean, Biodiversity and Evolution of Parasitic Life in the Southern Ocean, pp. 49 - 75.
- Fayton, T. J., Andres, M. J., (2016), New species of *Plagioporus* Stafford, 1904 (Digenea: Opecoelidae) from California, with an amendment of the genus and a phylogeny of freshwater plagioporines of the Holarctic, Systematic Parasitology, 93: 731 - 748.
- Fayton, T. J., Choudhury, A., McAllister, C. T., Robinson, H. W., (2017), Three new species of *Plagioporus* Stafford, 1904 from darters (Perciformes: Percidae), with a redescription of *Plagioporus boleosomi* (Pearse, 1924) Peters, 1957, Systematic Parasitology, 94(2): 159 - 182.
- Fayton, T. J., McAllister, C. T., Robinson, H. W., Connior, M. B., (2018), Two New Species of *Plagioporus* (Digenea: Opecoelidae) from the Ouachita Madtom, *Noturus lachneri*, and the Banded Sculpin, *Cottus carolinae*, from Arkansas, The Journal of Parasitology, 104(2):145 - 156.
- Frajia-Fernández, N., Olson, P. D., Crespo, E. A., Raga, J. A., Aznar, F. J., Fernández, M., (2015), Independent host switching events by digenean parasites of cetaceans inferred from ribosomal DNA, International Journal of Parasitology, 45(2-3): 167 - 173.
- Froese, R., Garilao, C. V., [cit. 24. 11. 2021], *Arteidiellus atlanticus* Jordan & Evermann, 1898, Databáze Fishbase, Dostupné na: <https://www.fishbase.se/summary/Arteidiellus-atlanticus>.
- Galaktionov, K. V., (2006), Phenomenon of parthenogenetic metacercariae in gymnophallids and aspects of trematode evolution, Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, 310: 51 - 58.
- Galaktionov, K. V., (2017), Patterns and processes influencing helminth parasites of Arctic coastal communities during climate change, Journal of Helminthology, 91(4): 387 - 408.
- Galaktionov, K. V., Bustnes, J. O., (1999), Distribution patterns of marine bird digenean larvae in periwinkles along the southern coast of the Barents Sea, Disease of Aquatic Organisms, 37(3): 221 - 230.
- Galaktionov, K. V., Nikolaev, K. E., Aristov, D. A. et al., (2019), Parasites on the edge: patterns of trematode transmission in the Arctic intertidal at the Pechora Sea (South-Eastern Barents Sea), Polar Biology, 42: 1719 - 1737.
- Galaktionov, K. V., Węśławski, J. M., Stempniewicz, L., (2021), Food chain, parasites and climate changes in the high Arctic: a case study on trophically transmitted parasites of common eider *Somateria mollissima* at Franz Josef Land, Polar Biology, 44: 1321 - 1342.
- Galaktionov, K. V., Dobrovolskij, A. A., (2003), The Biology and Evolution of Trematodes, An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions and Evolution of Digenetic Trematodes, Kulwer Academic Publishers, 592 pp.
- Gibson, D. I. & Bray, R. A., (1984), On *Anomalotrema* Zhukov, 1957, *Pellamyzon* Montgomery, 1957 and *Opecoelina* Manter, 1934 (Digenea, Opecoelidae), with a description of *Anomalotrema koiae* n. sp. from North Atlantic waters, Journal of Natural History, 18: 949 - 964.
- Gibson, D. I., (1996), Guide to the parasites of Canadian fishes. Part IV. Trematoda, NRC Research Press, Ottawa, 373 pp.

- Goater, T. M., Browne, C. L., Esch, G. W., (1990), On the life history and functional morphology of *Halipegus occidualis* (Trematoda: Hemiuridae), with emphasis on the cystophorous cercaria stage, *International Journal for Parasitology*, 20(7): 923 - 934.
- Gray, B. P., Norcross, B. L., Baudreau, A. H., Blanchard, A. L., Seitz, A. C., (2017), Food habits of Arctic staghorn sculpin (*Gymnocanthus tricuspis*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) in the northeastern Chukchi and western Beaufort Seas, *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 135: 111 - 123.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., (2010), New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology*, 59: 307 - 321.
- Henttonen, H., Fuglei, E., Gower, C. N., et al., (2001), *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: introduction of an intermediate host has enabled the local life-cycle, *Parasitology*, 123(6): 547 - 552.
- Hertel, L. A., Bayne, C. J., Loker, E. S., (2002), The symbiont *Capsaspora owczarzaki*, nov. gen. nov. sp., isolated from three strains of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* is related to members of the Mesomycetozoa, *International Journal for Parasitology*, 32: 1183 - 1191.
- Himmelman, J. H., Hamel, J. R., (1993), Diet, behaviour and reproduction of the whelk *Buccinum undatum* in the northern Gulf of St. Lawrence, eastern Canada, *Marine Biology*, 116: 423 - 430.
- Hisdal, V., (1998), Svalbard. Nature and History, Oslo, Norsk Polarinstitutt, 123 pp.
- Hoberg, E. P., Galbreath, K. E., Cook, J. A., Kutz, S. J., Polley, L., (2012), Chapter 1 - Northern Host-Parasite Assemblages: History and Biogeography on the Borderlands of Episodic Climate and Environmental Transition, *Advances in Parasitology*, 79: 1 - 97.
- Høines, Å., Gundersen, A. C., (2008), Rebuilding the Stock of Northeast Arctic Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*), *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 41: 107 - 117.
- Hop, H., Pearson, T., Hegseth, E. N., Kovacs, K. M. et al., (2002), The marine ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard, *Polar Research*, 21(1): 167 - 208.
- Horák, P., Kolářová, L., Dvořák, J., (1998), *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae) a new nasal schistosome from Europe, *Parasite*, 5(4): 349 - 357.
- Hudson, P. J., Dobson, A. P., Lafferty, K. D., (2006), Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites?, *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 381 - 385.
- Huelsenbeck, J., Ronquist, F., (2001), MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics*, 17: 754 - 755.
- Hunninen, A. V., & Cable, R. M., (1943), The Life History of *Podocotyle atomon* (Rudolphi) (Trematoda: Opecoelidae), *Transactions of the American Microscopical Society*, 62(1), 57 - 68.
- Chambers, C., (2008), Determining deep-sea fish community structure in the Arctic: using species assemblages, stomach contents, parasite infracommunities and stable isotopes to evaluate trophic interactions. Department of Biological Sciences. University of Manitoba, Winnipeg.
- Chubb, J. C., (1979), Seasonal Occurrence of Helminths in Freshwater Fishes Part II Trematoda, *Advances in Parasitology*, 17: 142 - 314.
- Chubrik, G. K., (1966), Fauna and ecology of trematode larvae from molluscs in the Barents and White Seas, *Trudy Murmanskogo morskogo biologicheskogo instituta*, 10: 78 - 166.
- Inkscape Project, (2020), Inkscape 1.0.1, Dostupné z: <https://inkscape.org>.

- Issaitschikov, I. M., (1928), Contributions to the knowledge of parasitic helminths of some groups of vertebrates in the Russian Arctic, A. Trematodes (part 1), Trudy Morskoi Nauchnyi Institut, Moskva, 3: 5-79.
- Johansen, C. E., Lydersen, C., Aspholm, P. E., Haug, T., & Kovacs, K. M., (2010), Helminth Parasites in Ringed Seals (*Pusa hispida*) From Svalbard, Norway with Special Emphasis on Nematodes: Variation with Age, Sex, Diet, and Location of Host, *Journal of Parasitology*, 96(5): 946 – 953.
- Kantor, Y. I., Fedosov, A. E., Kosyan, A. R., Puillandre, N., Sorokin, P. A., Kano, Y., Clark, R., Bouchet, P., (2021), Molecular phylogeny and revised classification of the Buccinoidea (Neogastropoda), *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlab031.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., (2002), MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acid Research*, 30(14): 3059 - 3066.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., (2005), MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment, *Nucleic Acid Research*, 33(2): 511 - 518.
- Khan, R. A., Chandra, C. V., (2006), Influence of climatic changes on the parasites of Atlantic cod *Gadus morhua* off coastal Labrador, Canada, *Journal of Helminthology*, 80(2): 193 – 197.
- Klimpel, S., Palm, H. W., Busch, M. W., Kellermanns, E., Ruckert, S., (2006), Fish parasites in the Arctic deep-sea: poor diversity in pelagic fish species vs. Heavy parasite load in a demersal fish, *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.*, 53: 1167 – 1181.
- Køie, M., (1981), On the morphology and life-history of *Podocotyle reflexa* (Creplin, 1825) Odhner, 1905, and a Comparison of its developmental stages with those of *P. atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905 (Trematoda, Opecoelidae), *Ophelia*, 20(1): 17 - 43.
- Køie, M., (2000), Metazoan parasites of teleost fishes from atlantic waters off the Faroe Islands, *Ophelia*, 52: 25 - 44.
- Kremnev, G., Gonchar, A., Krapivin, V., Uryadova, A., Miroljubov, A., Krupenko, D., (2021), Life cycle truncation in Digenea, a case study of *Neophasis* spp. (Acanthocolpidae), *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 15: 158 - 172.
- Kulkin, V. V., Kuklina, M. M., Kisova, N. E., (2012), Species composition and seasonal dynamics of the helminthofauna of the bullroak (*Myoxocephalus scorpius*, Cottidae) from Kola bay of the Barents sea, *Zoologicheskyy Zhurnal*, 91(2): 131 - 137.
- Lagrange, C., Poulin, R., (2006), Life cycle abbreviation in the trematode *Coitocaecum parvum*: can parasites adjust to variable conditions?, *Journal of Evolutionary Biology*, 20(3): 1189 - 1195.
- Lajtner, J., Lucić, A., Marušić, M., & Erben, R., (2008), The effects of the trematode *Bucephalus polymorphus* on the reproductive cycle of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the Drava River, *Acta Parasitologica*, 53(1): 85 - 92.
- Lindquist, H. D. A., Cross, J. H., (2017), 195 - Helminths, *Infectious Diseases* (Fourth edition), 2: 1763 - 1779.
- Littlewood, D. T. J., (1994), Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 221 – 229.
- Locker, E. S., Bayne, C. J., Buckley, P. M., Kruse, K. T., (1982), Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of the juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda), *Journal of Parasitology*, 68: 84 - 94.

- Lucas, T., O'Brien, E. K., Cribb, T. H., Degnan, B. M., (2005), Digenean trematodes infecting the tropical abalone *Haliotis asinina* have species-specific cercarial emergence patterns that follow daily or semilunar spawning cycles, *Marine Biology*, 148: 285 - 292.
- Manter, H. W., (1955), The Zoogeography of Trematodes of Marine Fishes, *Experimental Parasitology*, 4(1): 62 - 86.
- Marigo, J., Cunha, J. A., Bertozzi, C. P., Souza, S. P., et al., (2015), Genetic diversity and population structure of *Synthesium pontoporiae* (Digenea, Brachycladiidae) linked to its definitive host stocks, the endangered Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei* (Pontoporiidae) off the coast of Brazil and Argentina, *Journal of Helminthology*, 89(1): 19 - 27.
- Martell, D. J., McClelland, J., (1994), Diets of sympatric flatfishes, *Hippoglossoides platessoides*, *Pleuronectes ferrugineus*, *Pleuronectes americanus*, from Sable Island Bank, Canada, *Journal of Fish Biology*, 44(5): 821 - 848.
- Martin, S. B., Cutmore, S. C., Cribb, T. H., (2017), Revision of *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea: Opecoelidae), with *Trilobovarium* n. g., for species infecting tropical and subtropical shallow-water fishes, *Systematic Parasitology*, 94: 307 - 338.
- Martin, S. B., Cutmore, S. C., Cribb, T. H., (2017), Revision of *Podocotyloides* Yamaguti, 1934 (Digenea: Opecoelidae), resurrection of *Pedunculacetabulum* Yamaguti, 1934 and the naming of a cryptic opecoelid species, *Systematic Parasitology*, 95(1): 1 - 31.
- Martin, S. B., Huston, D. C., Cutmore, S. C., Cribb, T. H., (2019), A new classification for deep-sea opecoelid trematodes based on the phylogenetic position of some unusual taxa from shallow-water, herbivorous fishes off south-west Australia, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186(2): 385 - 413.
- Martin, S. B., Ribu, D., Cutmore, S. C., Cribb, T. H., (2018), Opistholobetines (Digenea: Opecoelidae) in Australian tetraodontiform fishes, *Systematic Parasitology*, 95(8-9): 743 - 781.
- Meenakshi, M., Madhavi, R., Swarnakumari, V. G. M., (1993), The life-cycle of *Helicometra gibsoni* n. sp. (Digenea: Opecoelidae), *Systematic Parasitology*, 25: 63 - 72.
- Morgan, J. A. T., Blair, D., (1995), Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: An aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group, *Parasitology*, 111: 609 - 615.
- Murzina, S. A., Sokolov, S. G., Pekkoeva, S. N. et al., (2019), First data on the parasite fauna of daubed shanny *Leptoclinus maculatus* (Fries 1838) (Actinopterygii, Perciformes: Stichaeidae) in Svalbard waters, *Polar Biology*, 42: 831 - 834.
- Münster, J., Klimpel, S., Fock, H. O., MacKenzie, K., Kuhn, T., (2015), Parasites as biological tags to track an ontogenetic shift in the feeding behaviour of *Gadus morhua* off West and East Greenland, *Parasitology Research*, 114: 2723 - 2733.
- Myšková, E., Brož, M., Fuglei, E., Kvičerová, J. et al., (2019), Gastrointestinal parasites of arctic foxes (*Vulpes lagopus*) and sibling voles (*Microtus levis*) in Spitsbergen, Svalbard, *Parasitology Research*, 118: 3409 - 3418.
- Negrão-Corrêa, D., Mattos, A. C. A., Pereira, C. A. J., Martins-Souza, R. L., & Coelho, P. M. Z., (2012), Interaction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts and Hemocytes of *Biomphalaria*, *Journal of Parasitology Research*, 2012, 1 - 6.
- Nicoll, W., (1907), A contribution towards a knowledge of the Entozoa of British marine fishes. Part 1, *Annals and Magazine of Natural History*, 7 series, 19: 66 - 94.

- Nolan, M. J., Cribb, T. H., (2005), The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species, *Advances in Parasitology*, 60: 101 - 163.
- Norwegian Polar Institute n. d., [cit. 6. 10. 2021], Zátoka Billefjord a mapa souostroví Svalbard, Dostupné na: <https://toposvalbard.npolar.no>.
- Novotný, D., (2019), Životní cyklus a diverzita motolic čeledi Opecoelidae na Svalbardu, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 46 pp.
- Ocean Biodiversity Information Systém (OBIS), [cit. 15. 10. 2021], *Sebastes mentella* Distribution, Dostupné na: <https://obis.org/taxon/127254>.
- Olson, P. D., Cribb, T. H., Tkach, V. V., Bray, R. A., Littlewood, D. T. J., (2003), Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda), *International Journal of Parasitology*, 33: 733 - 755.
- Parker, G. A., Chubb, J. C., Ball, M. A., Roberts, G. N., (2012), Evolution of complex life cycles in helminth parasites, *Nature*, 425: 480 - 484.
- Pearson, J. C., (1972), A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea, *Advances in Parasitology*, 10: 153 - 189.
- Perez-Ponce de Leon, G., Anglade, T., Randhawa, H. S., (2018), A new species of *Steringotrema* Odhner, 1911 (Trematoda: Fellodistomidae) from the New Zealand sole *Peltorhamphus novaezeelandiae* Günther, 1862 off Kaka point in the Catlins, South Island, New Zealand, *Systematic Parasitology*, 95(2-3): 213 - 222.
- Petkevičiūtė, R., Stunžėnas, V., Stanevičiūtė, G., (2014), Differentiation of European freshwater bucephalids (Digenea: Bucephalidae) based on karyotypes and DNA sequences, *Systematic Parasitology*, 87(2): 199 - 212.
- Pokora, Z., Szilman, P., (1991), Use of acetocarmines for staining of larvae of digenetic Trematoda in situ, *Wiadomosci parazytologiczne*, 37(2): 235 - 240.
- Polyanski, Y. I., (1955), The parasitology of fish from the northern seas of the U. S. S. R. Parasites of fish from the Barents Sea, *Trudy Zoologicheskogo Instituta. Akademiya Nauk SSSR*, 19: 5 - 170.
- Poulin, R., Cribb, T. H., (2002), Trematode life cycles: short is sweet?, *Trends in Parasitology*, 18(4): 176 - 183.
- Prokofiev, V. V., (1994), The ambush behavior of cercariae of some marine trematodes, *Zoologicheskyy Zhurnal*, 73(5): 13 - 20.
- Prokofiev, V. V., Galaktionov, K. V., Levakin, I. A., (2016), Patterns of parasite transmission in polar seas: Daily rhythms of cercarial emergence from intertidal snails, *Journal of Sea Research*, 113: 85 - 98.
- Przybylak, R., Arażny, A., Nordli, Ø., Finkelnburg, R., Kejna, M., Budzik, T., Migala, K., Sikora, S., Puczko, D., Rymer, K., Rachlewicz, G., (2014), Spatial distribution of air temperature on Svalbard during 1 year with campaign measurements, *International Journal of Climatology*, 34: 3702 - 3719.
- Rees, D., Byrkjedal, I., (2013), Lack of taxonomic information from parietal spine size invalidates subspecies in the Atlantic hookear sculpin *Artediellus atlanticus*, *Journal of Fish Biology*, 82(1): 277 - 285.
- Rice, T., McGraw, E., O'Brien, E. K., Reverter, A., Jackson, D. J., Degan, B. M., (2006), Parasitic castration by the digenian trematode *Allopodocotyle* sp. alters gene expression in the brain of the host mollusc *Haliotis asinina*, *FEBS letters*, 580(15): 3769 - 3774.

- Rohner, C. A., Cribb, T. H., (2013), Opecoelidae (Digenea) in northern Great Barrier Reef goatfishes (Perciformes: Mullidae), *Systematic Parasitology*, 84(3): 237 - 253.
- Różycki, O., (1989), A survey of benthic gastropods of South-West Svalbard coastal waters, *Polish Polar Research*, 10(2): 231 – 239.
- Shedko, M. B., Sokolov, S. G., Atopkin, D. M., (2015), The first record of *Dimerosaccus oncorhynchi* (Trematoda: Opecoelidae) in fishes from rivers of Primorsky territory, Russia, with a discussion on its taxonomic position using morphological and molecular data, *Parazitologiya*, 49(3): 171 - 189.
- Schwelm, J., Kudlai, O., Smit, N. J., Selbach, C., Sures, B., (2020), High parasite diversity in a neglected host: larval trematodes of *Bithynia tentaculata* in Central Europe, *Journal of Helminthology*, 94: e120.
- Smithsin, P., Addison, K., Atkinson, K., (2008), *Fundamentals of the Physical Environment* (Fourth edition), Routledge, 776 pp.
- Snyder, S. D., & Tkach, V. V., (2001), Phylogenetic and biogeographical relationships among some holarctic frog lung flukes (Digenea: Haematoloechidae), *Journal of Parasitology*, 87: 1433 – 1440.
- Sokolov, S. G., Shchenkov, S. V., Gordeev, I. I., (2019), Records of opecoeline species *Pseudopecoelus* cf. *vulgaris* and *Anomalotrema koiiae* Gibson & Bray, 1984 (Trematoda, Opecoelidae, Opecoelinae) from fish of the North Pacific, with notes on the phylogeny of the family Opecoelidae, *Journal of Helminthology*, 93(4): 475 - 485.
- Stange, R., (2014), [cit. 15. 9. 2021], Polar night, polar day, Dostupné na: spitsbergen-svalbard.com.
- Stibbs, H. H., Owczarzak, A., Bayne, C. J., DeWan, P., (1979), Schistosome Sporocyst-Killing Amoebae Isolated from *Biomphalaria glabrata*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 33: 159 - 170.
- Stitt, A. W., Fairweather, I., Trudgett, A. G., Johnston, C. F., & Anderson, S. M. L., (1992), Localisation of actin in the liver fluke, *Fasciola hepatica*, *Parasitology Research*, 78(2), 96 – 102.
- Studer, A., Poulin, R., (2012), Effects of salinity on an intertidal host–parasite system: Is the parasite more sensitive than its host?, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 412: 110 - 116.
- The Norwegian polar institute, [cit. 24. 2. 2020], The sea and ocean currents, Arctic System, Dostupné z: <http://www.arcticsystem.no/en/outsideworld/oceancurrents/>.
- Thorsen, S. a jeho tým, [cit 15. 9. 2021], Longyearbyen, Svalbard, Norway — Sunrise, Sunset, and Daylength, Dostupné na: timeanddate.com.
- Tkach, V., Pawlowski, J., Mariaux, J., (2000), Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences, *International Journal for Parasitology*, 30(1): 83 - 93.
- Toledo, R., Fried, B. et al. (2014), Digenetic Trematodes, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 766: 473 pp.
- Uhrig, E. J., Spagnoli, S. T., Tkach, V. V., Kent, M. L., & Mason, R. T., (2015), *Alaria mesocercariae* in the tails of red-sided garter snakes: evidence for parasite-mediated caudectomy, *Parasitology Research*, 114(12): 4451 – 4461.
- van Pelt, W. J. J., Kohler, J., Liston, G. E., Hagen, J. O., Luks, B., Reijmer, C. H., Pohjola, V. A., (2016), Multidecadal climate and seasonal snow conditions in Svalbard, *Journal of Geophysical Research - Earth Surface*, 121: 2100 - 2117.

- Vaux, F., Hills, S. F. K., Marshall, B. A., Trewick, S. A., Morgan - Richards, M., (2017), A phylogeny of Southern Hemisphere whelks (Gastropoda: Buccinulidae) and concordance with the fossil record, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 114: 367 - 381.
- Volf, P., Horák, P., (2007), *Paraziti a jejich biologie*, Nakladatelství TRITON, 320 pp.
- Wassmann, P., Slagstad, D., Ellingsen, I., (2019), Advection of Mesozooplankton Into the Northern Svalbard Shelf Region, *Frontiers in Marine Science*, 6: 458.
- Wee, N. Q., Cribb, T. H., Bray, R. A., Cutmore, S. C., (2017), Two known and one new species of *Proctoeces* from Australian teleosts: Variable host-specificity for closely related species identified through multi-locus molecular data, *Parasitology International*, 66(2): 16 - 26.
- Wharton, D. A., (1999), Parasites and low temperatures, *Parasitology*, 119: 7 - 17.
- Whitfield, P. J., & Evans, N. A., (1983), Parthenogenesis and asexual multiplication among parasitic platyhelminths, *Parasitology*, 86(4): 121 - 160.
- Wisz, M. S., Pottier, J., Kissling, W. D., et al., (2013), The role of biotic interactions in shaping distributions and realised assemblages of species: implications for species distribution modelling, *Biological Reviews*, 88(1): 15 - 30.
- Włodarska-Kowalczyk, M., Pearson, T. H., Kendall, M. A., (2005), Benthic response to chronic natural physical disturbance by glacial sedimentation in an Arctic fjord, *Marine Ecology Progress Series*, 303: 31 - 41.
- Włodarska-Kowalczyk, M., Renaud, P. E., Węśławski, J. M., Cochrane, S. K. J., Denisenko, S. G., (2012), Species diversity, functional complexity and rarity in Arctic fjordic versus open shelf benthic systems, *Marine Ecology Progress Series*, 463: 73 - 87.
- Wu, X. J., Dinguirard, N., Sabat, G., Lui, H. D., Gonzalez, L., Gehring, M., Bickham-Wright, U., Yoshino, T. P., (2017), Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*, *PLoS Pathogens*, 13(5):e1006081.
- Zander, C. D., (2003), Four-year monitoring of parasite communities in gobiid fishes of the south-western Baltic - I. Guild and component community, *Parasitology Research*, 90(6): 502 - 511.
- Zander, C. D., (2006), Parasite diversity of sticklebacks from the Baltic Sea, *Parasitology Research*, 100(2): 287 - 297.
- Zelmer, D. A., Esch, G. W. (1998), Bridging the gap: the odonate naiad as a paratenic host for *Halipegus occidualis* (Trematoda: Hemiuridae), *Journal of Parasitology*, 84: 94 - 96.
- Zhukov, E. V., (1957), New genera and species of trematodes parasites offish in the Far-Eastern seas, *Zoologicheskii Zhurnal*, 36: 840 - 846.