



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

***Motolice *Aporocotyle simplex* ze svalbardských platýzů  
*Hippoglossoides platessoides****

## **Bakalářská práce**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ ZDRAVOTNÍ  
LABORANT**

**Autor:** Šárka Hájková

**Vedoucí práce:** Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Motolice Aporocotyle simplex* ze svalbardských platýzů *Hippoglossoides platessoides* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na obhajobu plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....  
Šárka Hájková

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za jeho odbornou pomoc, cenné rady, ochotu, čas a především trpělivost, kterou věnoval vedení této práce. Můj neskonalejší dík také patří Petře Masařové, Mgr. Hynku Mazancovi a RNDr. Evě Myškové za jejich vedení a pomoc s praktickou částí mé práce.

Praktická část mé bakalářské práce byla prováděna na více pracovištích, podle metod a prostor pro ně uzpůsobených. Morfologické zpracování vzorku mi bylo umožněno v laboratořích Parazitologického ústavu (Biologické centrum AV ČR), zpracování vzorků metodou skenovací elektronové mikroskopie v Laboratoři elektronové mikroskopie a molekulární analýza vzorků v laboratoři Centra polární ekologie.

V neposlední řadě děkuji celé své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

# **Motolice *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 ze svalbardských platýzů *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius)**

## **Abstrakt**

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala motolicemi z platýzů *Hippoglossoides platessoides*, získaných během expedic na Svalbard v letech 2014 a 2018. Cílem bylo morfologické a molekulární zpracování přivezeného materiálu, díky němuž se mi podařilo potvrdit determinaci nalezených motolic jako *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900. Je to často se vyskytující parazit platýzů, a to především u *Hippoglossoides platessoides*, dále pak u *Limanda limanda* a *Pleuronectes platessa*. Druh *A. simplex* je geograficky rozšířen v zálivu sv. Vavřince v Kanadě, na západním pobřeží Švédska, v Barentsově a Beringově moři, u pobřeží Kamčatky a Grónska. Z mých výsledků vyplývá, že druh *A. simplex* je rozšířen i na Svalbardu. V praktické části jsem se zabývala metodami, které mi pomohly charakterizovat zkoumané vzorky. Pozorovala jsem povrchové struktury motolice prostřednictvím skenovacího elektronového mikroskopu SEM JEOL JSM-7401F. Vnitřní orgány byly zviditelněny použitím Mayerova-Schubergova karmínu, což mi umožnilo zhotovit nákres motolice s využitím světelného mikroskopu (Olympus BX51) vybaveného kreslícím zařízením. Dále jsem provedla izolaci DNA s využitím komerčního kitu Exgene Tissue SV mini (GeneAll). Izolovaná DNA (gen pro velkou ribozomální podjednotku, 28S rRNA) byla amplifikována pomocí PCR, získané PCR produkty byly sekvenovány na automatickém sekvenátoru (ABI Prism 3130xl nebo 3730xl, firma SEQme). Nově získané sekvence (celkem tři) byly alignovány v programu Geneious 8.0.5 se sekvencemi dostupnými z GenBanku (64 sekvencí). Fylogenetická analýza vztahů v rámci druhů čeledi Aporocotylidae byla provedena metodou maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood) s užitím modelu TPM2u+F+G4 jako nejlepšího. *Aporocotyle simplex* spadá do samostatné větve společně s *A. michaudi*, od kterého se však výrazně odlišuje svou morfologií (rozmístění a počet tělních ostnů ve shluku, počet varlat, poměr délky jícnu k délce těla) a zeměpisným rozšířením (*A. michaudi* se vyskytuje v jižním Atlantském oceánu).

## **Klíčová slova**

*Aporocotyle*; motolice; morfologie; molekulární diagnostika; PCR; platýz, Schistosomatoidea

## **The fluke *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 from the American plaice *Hippoglossoides platessoides* in Svalbard**

In my bachelor thesis I studied trematodes from plaice *Hippoglossoides platessoides* obtained during expeditions to Svalbard in 2014 and 2018. My goal was morphological and molecular processing of the obtained material, which allowed me to confirm the identification of the flukes as *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900. *Aporocotyle simplex* is a common parasite of plaice, occurring mainly in *Hippoglossoides platessoides*, but also in *Limanda limanda* and *Pleuronectes platessa*. The species *A. simplex* is geographically distributed in the Gulf of St. Lawrence in Canada, off the west coast of Sweden, in the Barents Sea and Bering Sea, off the coast of Kamchatka and Greenland. My results showed that the species *A. simplex* is widespread in Svalbard. In the practical part, I dealt with methods that helped me to identify the studied specimens. I observed the trematode tegumental surface with aid of a scanning electron microscope (JEOL JSM-7401F). The trematode internal organs were stained with Mayer-Schuberg carmine, which allowed me to observe and draw the mounted specimens using a light microscope (Olympus BX51) equipped with a drawing attachment. Furthermore, for molecular analysis, the DNA was isolated using the commercial Exgene Tissue SV mini kit (GeneAll). The isolated DNA (the gene for the large ribosomal subunit, 28S rRNA) was amplified by PCR, the obtained PCR products were sequenced on an automated sequencer (ABI Prism 3130xl or 3730xl, by SEQme). The newly acquired sequences (three in total) were aligned in the program Geneious 8.0.5 with sequences available from GenBank (64 sequences). Phylogenetic analysis of the species relationships within the family Aporocotylidae was performed using the Maximum Likelihood method with TPM2u + F + G4 used as the best model. *Aporocotyle simplex* falls into a separate branch together with *A. michaudi*, from which however, it differs substantially by its morphology (distribution of tegumental spines on body and their number in the clusters, number of testes, ratio of esophagus length to body length) and geographical distribution (*A. michaudi* occurs in the South Atlantic Ocean).

### **Key words**

*Aporocotylidae*; flukes; trematode; molecular diagnostics; PCR; plaice; Schistosomatoidea

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Svalbard.....	9
2.1.1	Geografie .....	9
2.1.2	Státní správa.....	9
2.1.3	Klima a podnebí.....	10
2.1.4	Led .....	10
2.1.5	Lidské působení na Svalbardu .....	11
2.1.6	Ochrana životního prostředí.....	11
2.2	Helminti.....	12
2.2.1	Trematoda .....	13
2.2.2	Podtřída Digenea.....	14
2.2.2.1	Vývojová stádia motolic .....	14
2.2.2.1.1	Vajíčko .....	14
2.2.2.1.2	Miracidium .....	14
2.2.2.1.3	Sporocysty .....	15
2.2.2.1.4	Rédie.....	16
2.2.2.1.5	Cerkárie .....	16
2.2.2.1.6	Metacerkárie .....	17
2.2.2.1.7	Mezocerkárie .....	17
2.2.2.2	Životní cykly motolic .....	17
2.3	Schistosomatoidea.....	18
2.3.1	Schistosomatidae .....	18
2.3.2	Aporocotylidae.....	19
2.4	<i>Aporocotyle simplex</i> .....	20
2.5	<i>Hippoglossoides platessoides</i> – platýz drsný.....	22

2.5.1	Parazité platýze <i>H. platessoides</i> .....	23
2.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	25
2.6.1	Princip metody .....	25
2.6.2	DNA polymeráza .....	25
2.6.3	Průběh PCR.....	25
2.6.4	Výhody a nevýhody PCR .....	26
2.6.5	Analýza PCR produktu .....	26
2.6.6	Modifikace PCR .....	27
3	Cíle práce .....	28
4	Materiál a metody .....	28
4.1	Materiál .....	28
4.2	Metody .....	29
5	Výsledky .....	34
5.1	Taxonomický přehled a popis .....	34
5.2	Výsledky SEM .....	38
5.3	Výsledky molekulární analýzy.....	39
6	Diskuse.....	41
7	Závěr .....	43
8	Seznam použitých zdrojů.....	44
9	Seznam zkratk .....	50

## 1 Úvod

*Aporocotyle simplex* je jednou z mála krevních motolic parazitujících v mořských organismech, u které byl zjištěn jako první mezihostitel mnohoštětinatec *Artacama proboscidea* i definitivní hostitel platýz *Hippoglossoides platessoides*. U této motolice byli popsáni nejen dospělci, ale také celý její vývojový cyklus. Přes všechny tyto pokroky a její relativně častý výskyt není dosud známá sekvence jejího genomu.

V této práci jsem se zabývala morfologickým a molekulárním vyšetřením motolice *A. simplex*, parazitujících ve svalbardských platýzech *H. platessoides*. Mezi morfologické metody, které jsem používala, patří studium morfologie na preparátech barvených Mayerovým-Schubergovým karmínem a skenovací elektronová mikroskopie. Molekulárním vyšetřením byla polymerázová řetězová reakce genu pro velkou ribozomální podjednotku (28S rRNA) a zjištění jeho sekvence. Cílem této bakalářské práce bylo potvrdit předběžnou determinaci motolice jako *Aporocotyle simplex* a pomocí sekvence pro velkou ribozomální podjednotku zjistit její fylogenetické vztahy v rámci rodu.



## **2 Teoretická část**

### **2.1 Svalbard**

#### **2.1.1 Geografie**

Svalbard je souostroví ležící v severozápadním cípu Barentsova moře. Pevnina se rozkládá na 61 229 km<sup>2</sup>. Většina souostroví, více než 60 %, se nachází pod ledem a na méně než 10 % se vyskytuje vegetace. Mezi největší ostrovy patří Spitsbergen, Nordaustlandet, Barentsøya, Kong Karls Land, Hopen a Prins Karls Forland. Součástí Svalbardu je také ostrov Bjørnøy, který se nalézá mezi Spitsbergem a Norskem. Je sice malý, ale díky typické fauně, vyskytující se na mořském dně a ptačtvi, které se hojně nalézá nejen na ostrově, ale i v jeho přilehlých vodách, se stal přírodní rezervací (Gulliksen a kol., 2004).

Častým jevem v okolí Svalbardu jsou kontinentální (pevninské) šelfy, a to hlavně v místech, která hraničí s Barentsovým mořem, jelikož jeho hloubka se pohybuje v průměru kolem 230 m (Gulliksen a kol., 2004).

Dalšími zajímavými přírodními úkazy vyskytujícími se nejpočetněji západně a severně podél Svalbardu jsou fjordy. Ty mají různé formy, ať už jsou hluboké, úzké či široce otevřené. V těchto oblastech se vyskytuje velké množství bentických organismů, protože zde dochází k hromadění organického materiálu (Gulliksen a kol., 2004).

#### **2.1.2 Státní správa**

Svalbard byl dlouho zemí, nad níž nikdo neměl suverenitu. To se změnilo po podepsání svalbardské smlouvy, tzv. The Spitsbergen Treaty v Paříži roku 1920, díky čemuž získalo Norské království v roce 1925 suverenitu nad Svalbardem (Statistics Norway, 2014). Svalbard je název norského původu a obvykle znamená "chladné pobřeží". Neměnný počet obyvatel Svalbardu se pohybuje okolo 3000 lidí, a všechny větší osady se nacházejí na západním pobřeží Spitsbergenu. Nejvyšším úředníkem Svalbardu a zároveň nejvyšší zákonnou mocí je guvernér. Longyearbyen se dá považovat za hlavní město, jehož 1500–2000 obyvatel tvoří více než polovinu populace Svalbardu. Mezi jiné větší osady můžeme zařadit Barentsburg a Ny-Ålesund a odnedávna také Svea. Výhodou těchto osad je, že všechny disponují přístavy, ale pouze některé, jako Ny-Ålesund a Svea mají malé přistávací dráhy, hlavní letiště se nalézá v Longyerbyenu (Gulliksen a kol., 2004).

### **2.1.3 *Klima a podnebí***

Podnebí na Svalbardu je oproti místům ve stejné zeměpisné šířce mírnější, jelikož dochází k přítoku teplé vody z Atlantického oceánu, a také kvůli nízkým tlakům (Gulliksen a kol., 2004).

Průměrná roční teplota se v Longyearbyenu pohybuje okolo  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zatímco  $21,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  patří mezi nejvyšší zaznamenanou teplotu, jejím opakem je nejnižší  $-49,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nejvíce běžným projevem léta jsou mlhy, v zimě jsou to silné větry. Minimální množství srážek, stejně jako proměnlivost podnebí je pro Svalbard typická. Tyto výkyvy jsou způsobeny velkým rozdílem teplot mezi arktickými a atlantickými větry (Gulliksen a kol., 2004).

Jedním z dalších typických úkazů je na Svalbardu, stejně jako v dalších arktických oblastech, střídání polárního dne a noci (Gulliksen a kol., 2004). Období polárního dne je pro Longyearbyen od 21. dubna do 21. srpna, naopak polární noc se pohybuje v časovém rozmezí 26. října – 16. února (Elverland, 2009). Dalším typickým jevem je střídající se období léta a zimy. Během léta jsou dny světlé a mírné, zatímco v zimních dnech jsou temné a většinou studené. I když jsou životní podmínky na Svalbardu drsné, zvířata, která se zde vyskytují, jsou na toto klima adaptována, což jim umožňuje žít i v těchto oblastech (Gulliksen a kol., 2004).

### **2.1.4 *Led***

Arktická a atlantická voda je schopna působit na pobřeží a fjordy Svalbardu díky svým rozdílným hodnotám slanosti a teploty. Atlantická voda je poměrně teplá a slaná, na rozdíl od arktické vody, která je chladnější a méně slaná. Moře se může ochladit či dokonce zamrznout, což se začíná dít ve chvíli, kdy jeho teplota klesne na určitou hladinu (asi  $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Institute of Oceanology, 2013), která je nižší než bod mrazu sladké vody. Při vytváření mořského ledu je z vody postupně vylučována sůl, díky čemuž má led slanost sladké vody (Elverland, 2009).

Led pokrývá rozlohu kolem 60 % Svalbardu (Statistics Norway, 2014), která ovšem kolísá a to kvůli tání ledu v letním období. Toto období z větší míry nepřechá led, který je známý jako jednoroční (vytvořený během zimy, který roztaje během prvního letního tání), na rozdíl od víceletého ledu, který je stálý a tvoří přibližně polovinu arktického mořského ledu, ale může docházet ke ztenčování jeho tloušťky. Mořský led může být nejenom součástí pevniny, ale je schopen se pohybovat, a to díky větru, který ho může zanést i do světového oceánu (Gulliksen a kol., 2004).

Svalbard je z větší části roku obklopen ledem, převážně okolo pobřeží a fjordů na severní a východní straně. Tento led je složen především z jednoročního ledu, ale jeho součástí může být i víceletý, na rozdíl od západní strany, která není pokryta ledem po většinu zimy. Ovšem neméně důležité jsou pro fjordy také sladkovodní zdroje, jejichž přísun je nejvyšší v letním období, a to především kvůli ledové ablaci, tání sněhu, letním srážkám a oteplení ledu (Gulliksen a kol., 2004).

### **2.1.5 Lidské působení na Svalbardu**

O objevení Svalbardu a Bjørnøya se zasloužil Willem Barentsz se svojí posádkou v roce 1596. Od té doby se kromě příchodu dalších lidí začaly rozvíjet i jejich hlavní aktivity, které se společně s časem měnily. Mezi tyto činnosti patřil i rybolov a lov, průmyslová těžba uhlí, cestovní ruch a vědecký výzkum (Gulliksen a kol., 2004).

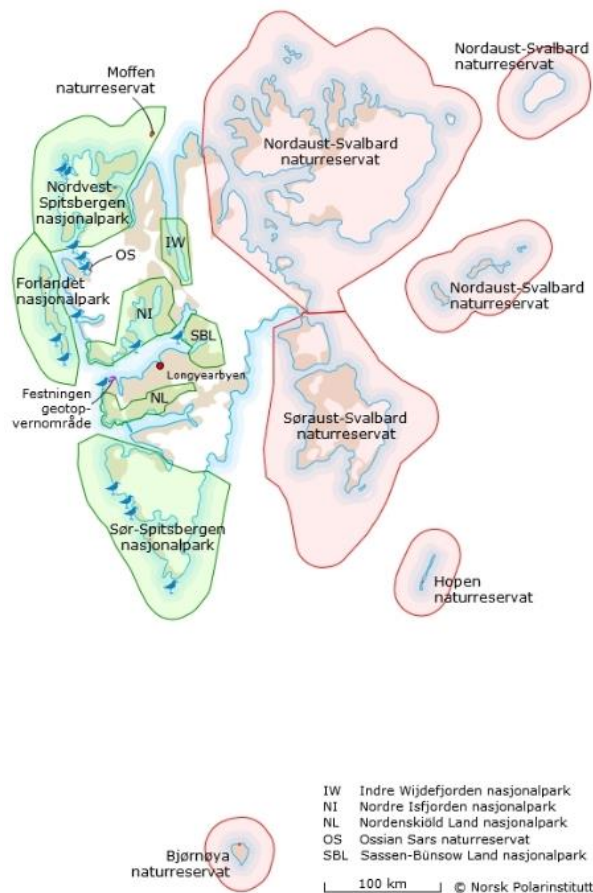
Lov zvířat na Svalbardu začal brzy po jeho objevení, a to více jak před 400 lety. Mezi nejvíce lovenými zvířaty byly velryby grónské (*Balaena mysticetus*), a to především kvůli velrybímu tuku. Dále pak mrož lední (*Odobenus rosmarus*), lední medvědi, sobi a kajka mořská (*Somateria mollissima*). Kvůli častému lovu některých druhů, extrémně poklesla jejich populace, pro velryby grónské to mohlo znamenat dokonce jejich vyhynutí. Naštěstí byla tato zvířata postupem času označena za chráněná, čímž bylo zamezeno jejich zabíjení (Kovacs a kol., 2006). Jedním z živočichů, kteří jsou dnes loveni pro hospodářské účely, jsou krevetky severní (*Pandalus borealis*) (Gulliksen a kol., 2004).

### **2.1.6 Ochrana životního prostředí**

V minulosti, se především kvůli lidské činnosti na souostroví Svalbard a jeho přilehlém okolí některé jak zvířecí, tak rostlinné druhy dostaly na seznam ohrožených druhů. Kvůli ochraně prostředí bylo založeno několik národních parků a dalších chráněných oblastí, díky nim patří Svalbard mezi jedny z nejlépe chráněných oblastí divočiny na světě (Gulliksen a kol., 2004).

Na Svalbardu můžeme nalézt 29 chráněných oblastí (viz obrázek 1), které tvoří 7 národních parků, 6 přírodních rezervací, 15 ptačích rezervací a 1 chráněnou geologickou oblast (Kovacs a kol., 2006), které pokrývají zhruba 65 % území (Gulliksen a kol., 2004). V roce 1973 byly založeny první 3 národní parky (Nordves-Spitsbergen, Forlandet a Sør-Spitsbergen), o 30 let později to byly další 3 (Nordenskiöld Land,

Sassen-Bünsow Land a Nordre Isfjorden). V roce 2005 byl na seznam národních parků přidán park Indre Wijdefjorden (Kovacs a kol., 2006).



Obrázek 1: Mapa Svalbardu s vyznačenými chráněnými rezervacemi. Zdroj <http://www.npolar.no/en/the-arctic/svalbard/areas.html>

## 2.2 Helminti

Helminti jsou skupinou mnohobuněčných organismů, kteří parazitují u obratlovců i bezobratlých. Nespádají pod taxonomické zařazení, jelikož se jedná o soubor odlišných živočichů sdílících parazitický způsob života. Za zástupce helmintů jsou považováni neodermátní platyhelminté (Cestoda, Monogenea, Trematoda), hlístice (Nematoda) a vrtejši (Acanthocephala). S ohledem na ontogenetický vývoj jsou helminti proměnlivou skupinou. Kromě vajíček a dospělých jedinců mohou mít i velký počet morfologicky rozdílných larválních stadií, která parazitují během ontogenetického vývoje i u několika druhů hostitelů. To záleží na typu vývojového cyklu. Pokud se bude jednat o cyklus s jedním (definitivním) hostitelem, jde o přímý cyklus. V případě vícehostitelských cyklů, jako jsou dvouhostitelský, tříhostitelský či čtyřhostitelský, se jedná o nepřímé

cykly, do kterých jsou kromě definitivních hostitelů zapojeni i mezihostitelé. Pod pojmem definitivní hostitel si představíme organismus, ve kterém helminti pohlavně dospívají a jsou sexuálně aktivní. Mezihostitelem rozumíme živočicha, ve kterém probíhá larvální, nepohlavní vývoj helmintů (Volf, Horák a kol., 2007).

### 2.2.1 *Trematoda*

Jde o početnou skupinu zcela parazitických platyhelminthů, která převážně obsahuje endoparazity obratlovců se složitými vývojovými cykly. Až na výjimky jsou prvními mezihostiteli měkkýši. Motolice parazitují téměř ve všech orgánových soustavách, především je nacházíme v trávicím systému, dýchacích cestách, krevním řečišti, nervové soustavě, tělních dutinách a urogenitálním traktu. Menší množství druhů upřednostňuje ektoparazitický život. Některé druhy mohou u svých hostitelů, včetně člověka, vyvolat závažná onemocnění, např. motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), *Opisthorchis felinus* či lékařsky nejvýznamnější zástupci čeledi Schistosomatidae (více viz níže) (Volf, Horák a kol., 2007).

Velikost těla motolic se pohybuje od několika desetin milimetrů do několika centimetrů. Některé motolice mohou nabývat nezvykle velkých rozměrů, a to až kolem 100 mm, mimořádně i několika metrů. Jejich těla jsou dorzoventrálně zploštělá, oválného či kopinatého tvaru a mají jednu (ústní) nebo druhou (břišní) přísavku (acetabulum), které slouží zejména k přichycení na tělo hostitele. U zástupců určitých skupin jsou přísavky nahrazeny jinými strukturami nebo mohou zcela chybět. Motolice se zpravidla řadí mezi hermafrodity. Čeleď Schistosomatidae je výjimkou, jelikož její zástupci jsou gonochoristé, stejně jako někteří zástupci z čeledi Didymozoidae. Na povrchu těla motolic se nachází syncytiální tegument, který splňuje kritéria struktury neodermis. Z tegumentu mohou často vybíhat ostny, které se mohou lišit svou velikostí a jsou kryté cytoplazmatickou membránou syncytia. Povrch kryje rozdílně silný glykokalyx, který u druhů, žijících v agresivním prostředí trávicího traktu zastává zejména ochrannou funkci. Majoritní část motolic má dobře vyvinutý trávicí trakt, který využívá k aktivnímu příjmu a zpracování potravy. Trávicí soustava začíná ústním otvorem, který může být obklopený ústní přísavkou a současně sloužit k vyvrhování. Navazuje předhltan, svalnatý hltan, jícen a samotné střevo. To může mít mnoho podob, ať už jednoduchého vaku, dvou slepě končících větví nebo se větve v zadní části spojí a vytvoří okruh. Naopak může dojít ke spojení větví v přední části, které poté pokračují jako jedna trubice nebo ze střeva vybíhají postranní slepé výběžky, eventuálně mohou střevní větve vyústit ven z těla,

a to v zadní části. Motolice mohou přijímat některé živiny i povrchem těla (Volf, Horák a kol., 2007). Samčí i samičí pohlavní orgány se nacházejí v pohlavní soustavě hermafroditických motolic v jednom jedinci, výjimkou je např. čeled' Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898 (viz níže) (Ryšavý a kol., 1988). Varlata mají zpravidla oválný nebo keříčkovitý tvar a většinou bývají dvě. Některé druhy mohou mít pouze jedno varle, ale jiné i desítky až stovky (Volf, Horák a kol., 2007). Součástí samičí pohlavní soustavy je Laurerův kanál, díky němuž jsou z ootypu vylučovány nadbytečné spermie a žloutkové buňky. Děloha je zakončena metratermem, který napomáhá při kopulaci a vypouštění vajíček (Ryšavý a kol., 1988). Vajíčka motolic jsou různorodého tvaru, bývají oválná s víčkem a občas mají na svém povrchu různé trny nebo filamenty (Volf, Horák a kol., 2007).

### **2.2.2 Podtřída Digenea**

Do podtřídy digenetických (dvourodých) motolic se řadí významní původci parazitárních onemocnění člověka i hospodářských zvířat. Významná část parazituje u ryb a ptáků. Jakuž bylo zmíněno, charakteristickým znakem jsou u motolic přísavky, které se nacházejí na přední a břišní oblasti těla. Motolice zpravidla mají dvě přísavky, ale u některých druhů se může vyskytovat pouze jedna či dokonce žádná (Horák, Scholz, 1998).

Vývojové cykly u této podtřídy bývají složité a obvykle zahrnují dva či dokonce větší počet hostitelů. Larvální stadia se rozmnožují nepohlavně během svého vývoje. Infikují další hostitele, přičemž dochází k výměně generací a hostitelů (Volf, Horák a kol., 2007).

#### **2.2.2.1 Vývojová stádia motolic**

##### **2.2.2.1.1 Vajíčko**

Vajíčka motolic jsou většinou oválného tvaru se silnou stěnou, jejichž zbarvení je světle až tmavě hnědé. Mohou být s víčkem i bez něj (např. schistosomy), ovšem častěji se vyskytují vajíčka s víčkem usnadňující miracidium líhnutí (Horák, Scholz, 1998).

##### **2.2.2.1.2 Miracidium**

Miracidium je první larvální stadium vyvíjející se v oplozeném vajíčku, které se může vyskytovat buď uvnitř těla vespělé motolice, nebo se nachází ve vnějším prostředí (Volf, Horák a kol., 2007).

U miracidíí dochází k opuštění vajíčka poté, co se otevře vaječné víčko, nebo po prasknutí stěny vajíčka. U alimentární nákazy prvního hostitele dochází k tomu, že se miracidium vylihne z vajíčka až v mezihostiteli. Ve vzácných případech se stává, že se z vajíčka vyklube už mateřská sporocysta (Volf, Horák a kol., 2007).

Miracidia jsou, co do velikosti, velmi malé organismy, jejichž povrch je tvořen ciliárními buňkami, které umožňují pohyb. Schopnost miracidia aktivně pátrat po mezihostiteli nejspíše zaručují receptory, ale pouze v časovém rozsahu několika hodin, protože ve vodním prostředí spotřebují všechnu energii bez možnosti jejího doplnění, neboť nejsou schopné přijímat živiny (Volf, Horák a kol., 2007).

Pro miracidia není výběr prvního mezihostitele snadný, protože jednotlivé druhy se mohou vyvíjet pouze v určitém druhu měkkýše. Poté co se přichytí a penetrují do prvního mezihostitele, ztrácejí původní ciliární tegument a jejich novým tělním pokryvem se stává neodermis. Tímto krokem se miracidium změní na mateřskou sporocystu, ale dříve, než se přesune do tkáně, zůstává v místě, ve kterém miracidium proniklo do organismu (Volf, Horák a kol., 2007).

#### 2.2.2.1.3 Sporocysty

Mateřská sporocysta se může vyskytovat ve tvaru jednoduchého oválného nebo protáhlého váčku, ve kterém jsou uloženy zárodečné buňky. Potrava prochází přes povrch tegumentu, který je v kontaktu s tkáněmi a tělními tekutinami měkkýše, protože larvy postrádají střevo. Porodním otvorem, nebo poté, co dojde k prasknutí stěny mateřské sporocysty, ji opouští další generace larev, které vznikají ze zárodečných buněk. Následná generace se podle druhu motolice může vyvinout buď v dceřiné sporocysty nebo rédie (Volf, Horák a kol., 2007).

Dceřiné sporocysty jsou zpravidla oválného, nebo protáhlého až vláskovitého tvaru, ale občas se mohou objevit i rozvětvené. Obvykle je můžeme nalézt v hepatopankreatu měkkýše. Stejně jako u mateřské sporocysty probíhá příjem potravy přes tegument, ale na rozdíl od ní, má tegument dceřiné sporocysty schopnost narušovat okolní tkáň či se bránit proti vnitřnímu prostředí mezihostitele, a to díky látkám, které jsou z něj uvolňovány. Dceřiné sporocysty rovněž obsahují zárodečné buňky, ty dávají vznik nové generaci dceřiných sporocyst, čímž napomáhají k postupnému pronikání parazitů do celého hepatopankreatu, díky jejich rostoucímu počtu. Zdrojem infekce dalšího

hostitele jsou cercárie, které se začínají vytvářet z dceřiných sporocyst v určité fázi jejich vývoje (Volf, Horák a kol., 2007).

#### 2.2.2.1.4 Rédie

Rédie se vyvíjejí u většiny druhů motolic z mateřské sporocysty. Mají schopnost přijímat živiny nejen přes tělní povrch, ale také aktivně pomocí trávicího ústrojí. Jejich tělo jim napomáhá uskutečňovat pohyb, a to nejen díky svému protáhlému tvaru, ale i pomocí párových výrůstků v zadní polovině těla. Embryonální prostor je místem, ve kterém vyzrávají další generace rédií ze zárodečných buněk, které zabírají větší část těla. Rédie tvoří cercárie až jako několikatou generaci. V mezihostiteli může vzniknout asexuálním rozmnožováním nesmírný počet cercárií, odhadovaných u specifických druhů až a desítky tisíc denně. Toto ohromné množství zajišťuje rozšíření parazita do prostředí, jelikož se z jedné cercárie vyvíjí jeden dospělý jedinec (Volf, Horák a kol., 2007).

#### 2.2.2.1.5 Cercárie

Cercárie je dalším vývojovým stádiem motolic. Její rozměry jsou větší než miracidium, ale stále se pohybují okolo desetin milimetru až přes 1 mm. Mají schopnost samy opustit tělo prvního mezihostitele, nebo se nechají vyloučit, čímž umožňují infekci a šíření na jiného hostitele (Volf, Horák a kol., 2007).

Základní části cercárií jsou tělo a ocásek, přičemž tělo je základem dospělé motolice, neboť u ní můžeme najít trny a přísavky a základy dalších orgánů; ocásek je odhazován při pronikání do dalšího hostitele (viz níže). Přijímání živin ve vnějším prostředí není u cercárií možné, protože jejich trávicí ústrojí, i když vyvinuté, toho není schopné. Proto využívají omezené množství energie (ve formě glykogenu) nashromážděné při jejich vývoji. Mezi významné látky, které dokáží cercárie produkovat, patří zejména produkty penetračních žláz, díky kterým jsou schopné se přichytit a narušit povrch těla hostitele, do kterého pronikají. Důležité jsou také cystogenní žlázy, které umožňují vytvoření cysty pro metacercárie nebo opravy tegumentu. Smyslové orgány jsou nedílnou součástí každé cercárie, protože jim napomáhají objevit hostitele, a dokonce určují orientaci cercárie v prostoru. Vyplování a následné šíření cercárií obvykle souvisí s místem nejpravděpodobnějšího výskytu hostitelů. Cercárie je schopna pohybu ve vodě díky ocásku, který může mít různé tvary, u některých druhů, jejichž vývojový cyklus



např. nepokračuje ve vodním prostředí bývá redukován. Ocásek je odhazován během přímé infekce hostitele či při vytváření cysty (Volf, Horák a kol., 2007).

#### 2.2.2.1.6 Metacerkárie

Metacerkárie se nacházejí u většiny motolic, jedná se o latentní stádium vývoje. Jejich vzhled se podobá dospělým motolicím, ale nejsou ještě plně vyvinuté (Horák, Scholz, 1998). Jedná se o stádium, které je schopné dlouhodobě přežít buď ve volném prostředí, nebo v mezihostiteli, a to díky cystě, kterou kolem sebe vytvoří pomocí cystogenních žlázek (Volf, Horák a kol., 2007). Po pozření mezihostitele definitivním hostitelem dochází k excystaci metacerkárie a její následné migraci do tkáně, kde roste a pohlavně dospívá (Horák, Scholz, 1998).

#### 2.2.2.1.7 Mezocerkárie

V životním cyklu dvou čeledí motolic (Strigeidae, Heimuridae) se objevuje další vývojové stádium, tzv. mezocerkárie, která není encystována a podobá se více cercáriím. K pohybu v těle hostitele využívá penetrační žlázy, které jsou dobře vyvinuté. Příležitostně může být mezihostitel pozřen tzv. paratenickým hostitelem, což je hostitel, který umožňuje metacerkárii přežít v těle, aniž by se vyvíjela, hromadí jejich počet, čímž se poté stávají zdrojem silné infekce pro definitivního hostitele (Volf, Horák a kol., 2007).

#### 2.2.2.2 Životní cykly motolic

Mezi jednodušší životní cykly motolic patří dvouhostitelský cyklus. V některých případech dochází přímo k pozření měkkýše definitivním hostitelem, který spolu s ním pozře i metacerkárie, které dospěly do tohoto stádia přeměnou z cercárií neopouštějících sporocysty. Ve většině případů však cercárie opouštějí mezihostitele a aktivně se pohybují v okolním prostoru, kde vyhledávají definitivního hostitele, do kterého aktivně pronikají, a kde dochází k jejich vývoji v dospělou motolici. Jiné druhy spoléhají na vytvoření metacerkárií tak, že se cercárie po odvržení ocásku přichytí na pevný podklad, kde se zapouzdří a pomocí cystogenních žlázek vytvoří cystu (adoleskárii), která je schopna odolat podmínkám okolního prostředí. Vzniklé metacerkárie se vyvíjejí v dospělého jedince po spolknutí definitivním hostitelem (Volf, Horák a kol., 2007).

Cercárie u tříhostitelského cyklu se šíří podobně jako u dvouhostitelského, mohou být spolknuty druhým mezihostitelem nebo do něj dokáží aktivně proniknout. V druhém mezihostiteli se vyvíjejí v metacerkárie, které mohou být uvnitř mezihostitele buď volné

nebo se nacházejí v cystě (encystované). Po pozření druhého meziphostitele definitivním hostitelem dojde k excystaci metacerkárií a k jejich vývoji v dospělého jedince (Volf, Horák a kol., 2007).

U motolice s čtyřhostitelským cyklem se vyskytuje stadium mesocerkárie v druhém meziphostiteli a vývoj metacerkárií probíhá ve třetím meziphostiteli, či dokonce během přemísťování v definitivním hostiteli, ve kterém dochází k vývoji v dospělého jedince. Díky působení exogenních a endogenních faktorů v trávicím ústrojí definitivního hostitele se metacerkárie excystuje. Odlišně dlouhý vývoj v definitivním hostiteli může trvat od několika hodin, až po dobu několika měsíců. Nejdříve vospívají metacerkárie, které prošly určitým vývojem v druhém meziphostiteli, stejně tak jejich základy pohlavních orgánů, které jsou již nápadné. S plně zralým pohlavním ústrojím se z metacerkárie excystují jen specifické druhy motolic, které mají progenetické metacerkárie (Volf, Horák a kol., 2007).

## 2.3 Schistosomatoidea

Schistosomatoidea Stiles & Hassall, 1898 je nadčeleď, do které spadají tři čeledi parazitující v krevním řečišti definitivních hostitelů. Jde o Aporocotyliidae von Graff, 1907, jejichž zástupci parazitují v rybách, dále Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898 parazitující v krokodýlech, ptácích a savcích. Poslední je čeleď Spirorchiidae Stunkard, 1921, jejíž zástupce můžeme nalézt v krevním řečišti želv (Gibson a kol., 2002).

### 2.3.1 Schistosomatidae

Schistosomatidae je čeleď motolic, parazitujících převážně v krevním řečišti savců a vodních ptáků, která je svým vývojovým cyklem vázána na vodu a jejich cercárie (furkocercárie) aktivně pronikají přímo do definitivního hostitele (Jíra, 1998).

Ze zdravotního hlediska se jedná o velmi významnou čeleď motolic. Vyvolávají široce rozšířená onemocnění vyskytující se převážně v Africe, Jižní Americe a Asii. Jejich nejnámějšími zástupci jsou *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *S. japonicum* Katsurada, 1904 a *S. haematobium* (Bilharz, 1892) Weinland, 1858 (Jíra, 1998).

Na rozdíl od většiny motolic jsou schistosomy gonochoristé (jsou odděleného pohlaví) a můžeme u nich pozorovat zřetelnou pohlavní dvoutvárnost (dimorfismus). Povrch těla samiček je hladký, zatímco jeho tvar je válcovitý, jsou tenčí a delší než samečci. Na rozdíl od samiček je povrch tegumentu u samečků tvořen papilami, hrbolky či výběžky. Okraje

těla na ventrální straně se u sameček stáčí v blízkosti přísavky do rýhy, tzv. canalis gynaecophorus, která napomáhá při páření tím, že se v ní samička přichytí. Samičky jsou schopné klást vajíčka v cévách vnitřních orgánů. Zástupci schistosom jsou typičtí tím, že jejich vajíčka jsou oválného tvaru a mohou být opatřena trnem, ale nemají víčko. Průchodu vajíčka z cév, do tkání ulehčují histologické enzymy. Následně pomocí stolice či moči jsou vylučovány z těla ven. Uvnitř vajíčka vyloučeného z hostitele se nachází miracidium (Jíra, 1998). U schistosom jsou vajíčka hlavním patogenním agens. *S. haematobium* může způsobit závažná onemocnění především močového ústrojí. Jejimi typickými příznaky jsou hematurie a dysurie. V nejhrošším případě může ovšem zapříčinit poškození plic, rakovinu močového měchýře či sterilitu. *S. japonicum* je spojována s onemocněním jater, popřípadě střev. Ze začátku se může projevit tzv. Katayamův syndrom, což je pojem shrnující různé méně závažné příznaky jako je horečka, bolest hlavy, kašel, kopřivka a svědění. Dále může způsobit splenomegalii či lymfadenopatii. Vajíčka *S. mansoni* způsobují ulceraci tlustého střeva (Muller, 2002)

Při invazi cercárií do těla člověka může vznikat tzv. cercariální dermatitida, jenž je způsobena motolicemi, které se v člověku dále nevyvíjejí (jsou to druhy vyskytující se u ptáků), při silnější invazi mohou způsobovat zdravotní komplikace (Horák a kol., 2002).

### **2.3.2 Aporocotylidae**

Jde o čeleď s dvouhostitelskými cykly, které jsou vázané na vodu a jejich cercarie aktivně napadají definitivního hostitele (ryby) a pronikají do jeho krevního řečiště (Volf, Horák a kol., 2007). V porovnání s ostatními motolicemi jsou malé až střední velikosti s tělem, které je dorzoventrálně zploštělé. Na povrchu tegumentu můžeme nalézt různé rozmístěné trny, jejichž tvar může být jednoduchý nebo zakřivený (Gibson a kol., 2002).

Na rozdíl od jiných čeledí mají nepatrnou ústní přísavku nebo jim stejně jako ventrální chybí. Jejich trávicí ústrojí začíná ústní dutinou přecházející v úzký a poměrně dlouhý jícen, který je obklopen žlázovými buňkami. Střevní větve mají tvar písmene X, H či obráceného U a dělí se na přední (pokud jsou přítomné) a zadní části končících slepě. Zadní část střevních větví je buď přibližně stejné velikosti či delší (Gibson a kol., 2002).

Zástupci čeledi Aporocotylidae jsou hermafroditi; samčí reprodukční orgány mohou být nepravidelně laločnaté, mají různý tvar, jsou protáhlé, oválné či trubicovité. Jejich počet se pohybuje v rozmezí od 1 varlete po více než 18. Cirrový vak, který nemusí být

přítomný, obsahuje semenný váček, prostatické buňky, ejakulační kanál a cirus. Samičí pohlavní orgán je vaječník, který může být laločnatý, dvoulaločný i vícelaločnatý či trubicovitý. Tyto motolice mohou, či nemusí mít receptaculum seminis, Laurerův kanál či metraterm. Děloha může být stočená nebo naopak rovná a zmenšená. Vajíčka této čeledi jsou tenkostěnná, údajně bez víčka, mohou či nemusejí mít trny, a co se týká jejich počtu, může být jedno nebo mnoho. Tvar vajíčka se mění v závislosti na rodu motolice od oválných, sférických, trojúhelníkových či vřetenovitých (Gibson a kol., 2002).

Aporocotylidae je jednou z čeledí krevních motolic, u nichž jsou vajíčka a dospělci schopni poškodit definitivního hostitele tím, že vyvolají zánětlivou odpověď. Velký počet motolic může snížit průtok krve v cévách nebo mohou zapříčinit smrt hostitele (Eiras a kol., 2008).

#### ***2.4 Aporocotyle simplex***

Taxonomické rozdělení motolic a jednotlivých druhů se může při každém novém objevu změnit, proto je nutno vždy sledovat aktuální stav taxonomického zařazení. Dle <http://www.marinespecies.org/> (WoRMS Editorial Board, 2019) se mnou studovaná motolice *Aporocotyle simplex* řadí do:

říše: Animalia

kmen: Platyhelminthes

podkmen: Rhabditophora

nadtřída: Neodermata

třída: Trematoda

podtřída: Digenea

řád: Diplostomida

podřád: Diplostomata

nadčeleď: Schistosomatoidea

čeleď: Aporocotylidae

rod: *Aporocotyle*

druh: *Aporocotyle simplex*

Prvním, kdo popsal *A. simplex* byl Odhner, 1900. V následujících letech z jeho práce čerpalo velké množství autorů, ale až Thulin (1980) provedl redeskripci druhu na základě vlastního materiálu a muzejního materiálu od Odhnera (1900). U této motolice byl experimentálně potvrzen životní cyklus jako u prvního mořského exempláře (Koie, 1982).

*Aporocotyle simplex* patří mezi endoparazity, kteří parazitují v krevním řečišti hostitele. Obvykle se nachází v srdeční komoře, břišní aortě a žaberních tepnách. V některých případech ji můžeme nalézt i za očnicí (Thulin, 1980). Při vysoké intenzitě nákazy způsobují vajíčka nekrózu v žaberních tepnách a ve srdečním svalu (Thulin, 1991).

Mnohoštětinatec *Artacama proboscidea* Malmgren, 1866 je mezihostitelem *Aporocotyle simplex*, jejíž larvální stádia mohou u mezihostitele vyvolat obranné reakce, které vedou ke sterilitě jedince či ochabnutí svalstva. U takto oslabených jedinců může při těžkém zamoření dojít k prasknutí tělní stěny, což vede ke smrti jednotlivce (Koie, 1982).

Hlavním definitivním hostitelem *A. simplex* je platýz *Hippoglossoides platessoides*. Dalším možným hostitelem je *Limanda limanda*, který byl dříve považován za hlavního definitivního hostitele, či *Pleuronectes platessa* (Thulin, 1980).

Výskyt platýze *H. platessoides* infikovaného *A. simplex* je různý. Byl nalezen v zálivu sv. Vavřince v Kanadě (Marcogliese a kol., 1998; Ronald, 1960), u západního pobřeží Švédska (Thulin, 1980; Thulin, 1991), v Barentsově a Beringově moři, u pobřeží Kamčatky a Grónska (Thulin, 1980).

Vzhled jedinců rodu *Aporocotyle simplex* se liší v závislosti na jejich vývojových stádiích, ale také závisí na velikosti a stáří jedinců. Jedním z příkladů je zbarvení živých mladých jedinců, kteří jsou šedobílí, zatímco starší exempláře bývají tmavě nažloutlé až hnědé (Thulin, 1980).

*Aporocotyle simplex* má dorzoventrálně zploštělé tělo vřetenovitého tvaru. Zadní konec těla je zaoblený. Na těle můžeme nalézt vějířovité shluky trnů, skládajících se z 13-36 trnů, které se rozkládají po okrajích. Tato motolice má vysoký počet varlat, která se nacházejí mezi zadními středními větvemi skoro až k úrovni genitálního póru. Varlata bývají širší než delší, ale jejich tvar se může lišit u jednotlivých druhů (hladké,

hrubé či nepravidelně laločnaté). Samičí reprodukční ústrojí se nachází za genitálním pórem v zadní čtvrtině těla. Vaječník může být hladký i laločnatý. U tohoto druhu se nevyskytuje Laurerův kanál (Thulin, 1980).

## **2.5 *Hippoglossoides platessoides* – platýz drsný**

Taxonomické zařazení platýze *Hippoglossoides platessoides* (viz obrázek 2) je dle [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (Froese, Pauly, 2019) následující:

třída: Actinopterygii

řád: Pleuronectiformes

čeleď: Pleuronectidae

podčeleď: Pleuronectinae

rod: *Hippoglossoides*

druh: *Hippoglossoides platessoides*



Obrázek 2: *Hippoglossoides platessoides* (Platýz drsný)

Zdroj: <http://www.fao.org/fishery/species/3359/en>

Platýz drsný se vyskytuje v okolí Severovýchodního Atlantiku (Terofal, Militz, 1996). Přesněji se nachází v místech od Lamanšského průlivu severně podél západního a severního pobřeží Britských ostrovů. Dále také na Islandu, v Norsku a Spitsbergenu až ke Karskému moři na východě. Pozorovat ho lze i v západním Baltském moři. (Moen, Svensen, 2004).

*Hippoglossoides platessoides* se nachází nejen v mělkých vodách pobřežních oblastí, ale může být spatřen až v hloubce okolo 400 m, často se také objevuje u ústí řek v brakických vodách (Diesener, 2002). Během jara se drží v mělčích vodách a v zimě

se naopak stěhuje do hlubší vody (Debelius, 1997). Žije na písčitém a bahnitém dně, kde se živí různými organismy, a to červy, korýši, měkkýši, malými hadicemi, či drobnými rybkami vyskytujícími se u dna (Diesener, 2002).

Platýzi mají oči na pravé straně dlouhého oválného těla a jejich velká ústa sahají až pod již zmíněné oči. Dosahují délky až 50 cm, přičemž samice bývají větší. Zbarvení na jejich oční (horní) straně je šedohnědé nebo růžovo hnědé s mramorováním a běžnými tečkami, které jsou neuspořádaně rozesety po jeho těle. Slepá (spodní) strana je bílá. Postranní čára je prakticky rovná až na skoro nepostřehnutelné vyklenutí nad první ploutví. Hřbetní ploutev začínající nad jeho horním okem se skládá z 78–98 měkkých ploutevnických paprsků, zatímco jeho řitní ploutev pouze okolo 60–79 měkkých paprsků. Okraj ocasní ploutve je zaoblený. Jeho šupiny jsou drsné se zubatými okraji, díky čemuž získal i své jméno. (Terofal, Miltz, 1996).

Tření platýzů probíhá v závislosti na místě výskytu na jaře nebo na začátku léta. Záleží na tom, jak moc na sever ke tření dochází, pokud dál probíhá tření později (leden až květen v Severním moři, březen až červenec Barentsovo moře). Samotný výtěr probíhá v hloubce 150–200 m a množství jiker (v rozmezí 50 000–300 000), vznášejících se ve vodním sloupci, je přímo závislé na velikosti samice. Larvy o velikosti 2–3 cm jsou součástí planktonu, ale ještě před ukončením vývoje v platýze hledají dno v hloubce okolo 40–100 m. Podstatný je také rozdíl pohlavní dospělosti jedince, v Severním moři ryby dospívají mezi 2. –3. rokem života, zatímco v Barentsově moři až kolem 7.–12. roku (Diesener, 2002).

### **2.5.1 Parazité platýze *H. platessoides***

Platýz je hostitelem mnoha druhů parazitů. V tabulce (viz tabulka 1) jsou uvedeni pouze parazité ze třídy Trematoda. Dosud je z platýze drsného známo 28 druhů motolic náležejících k 13 čeledím (viz tabulka 1), které platýze využívají jako definitivního hostitele (s výjimkou *Otodistomum* spp.) a vyskytují se převážně v trávicím traktu. Výjimkou je čeleď Aporocotylidae, s jediným druhem, *Aporocotyle simplex*, který se nachází v oběhovém systému platýzů.

Tabulka 1: Přehled motolic nalezených v *Hippoglossoides platessoides*

Název motolice	Autoři
<b>Acanthocolpidae Lühe, 1906</b>	
<i>Neophasis burti</i> Bray & Gibson, 1991	Bray a Gibson (1991)
<i>Stephanostomum baccatum</i> (Nicoll, 1907) Manter, 1934 (syn. <i>Stephanochasmus baccatum</i> Nicoll, 1907)	Koie (2000), Marcogliese a kol. (1998), McClelland a Melendy (2007), Morrison a kol. (1986), Nicoll (1915), Ronald (1960), Wolfgang (1954), Wolfgang (1955)
<b>Aporocotylidae Odhner, 1912</b>	
<i>Aporocotyle simplex</i> Odhner, 1900	Marcogliese a kol. (1998), Morrison a kol. (1986), Ronald (1960), Thulin (1991), Zubchenko (1980)
<b>Azygiidae Lühe, 1909</b>	
<i>Otodistomum veliporum</i> (Creplin, 1837) Stafford, 1904	Lile (1998)
<i>Otodistomum</i> sp.	Brinkmann (1988), Koie (2000), McClelland a Melendy (2007)
<b>Bucephalidae Poche, 1907</b>	
<i>Prosorhynchus squamatus</i> Odhner, 1905	Bray (1979), Lile (1998)
<b>Derogenidae Nicoll, 1910</b>	
<i>Derogenes varicus</i> (Müller, 1784) Looss, 1901	Bray (1979), Lile (1998), Marcogliese a kol. (1998), McClelland a Melendy (2007), Nicoll (1915), Ronald (1960), Scott (1975a, b), Sidall (1996), Zubchenko (1980)
<i>Derogenes</i> sp.	Koie (2000)
<i>Progonus muelleri</i> (Levinsen, 1881) Looss, 1899	Bray (1979)
<b>Faustulidae Poche, 1926</b>	
<i>Bacciger</i> sp.	Marcogliese a kol. (1998)
<b>Fellodistomidae Nicoll, 1909</b>	
<i>Fellodistomum</i> sp.	McClelland a Melendy (2007)
<i>Steringophorus furciger</i> (Olsson, 1867) Odhner, 1905 (syn. <i>Fellodistomum furcigerum</i> (Olsson, 1867) Yamaguti, 1953)	Bray (1979), Lile (1998), Marcogliese a kol. (1998), Nicoll (1913), Nicoll (1915), Scott (1975a, b), Sidall (1996), Zubchenko (1980)
<i>Steringotrema ovacutum</i> (Lebour, 1908) Yamaguti, 1954 (syn. <i>Rhodotrema ovacutum</i> (Lebour, 1908) Odhner, 1911)	Bray (1979), Lile (1998), Marcogliese a kol. (1998), Nicoll (1913), Nicoll (1915), Scott (1975a, b), Sidall (1996)
<b>Gonocercidae Skrjabin &amp; Guschanskaja, 1955</b>	
<i>Gonocerca macroformis</i> Wolfgang & Myers, 1954	Wolfgang a Myers (1954)
<i>Gonocerca phycidis</i> Manter, 1925	Bray (1979)
<b>Hemiuridae Looss, 1899</b>	
<i>Brachyphallus crenatus</i> (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905	Zubchenko (1980)
<i>Genolinea laticauda</i> Manter, 1925	Zubchenko (1980)
<i>Hemiurus communis</i> Odhner, 1905	Nicoll (1915)
<i>Hemiurus levinseni</i> Odhner, 1905	Bray (1979), Lile (1998)
<i>Hemiurus</i> sp.	Ronald (1960)
<b>Heterophyidae Leiper, 1909</b>	
<i>Cryptocotyle lingua</i> (Creplin, 1825)	Ronald (1960)
<b>Lecithasteridae Odhner, 1905</b>	
<i>Lecithaster gibbosus</i> (Rudolphi, 1802) Lühe, 1901	Bray (1979), Nicoll (1915), Scott (1975a, b), Zubchenko (1980)
<b>Opecoelidae Ozaki, 1925</b>	
<i>Opecoeloides manteri</i> (Hunninen & Cable, 1940) Hunninen & Cable, 1941 (syn. <i>Anisoporus manteri</i> Hunninen & Cable, 1940)	Hunninen a Cable (1941)
<i>Podocotyle atomon</i> (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905	Bray (1979), Ronald (1960)
<i>Stenakron vetustum</i> Stafford, 1904	Bray (1979), Koie (2000), Marcogliese a kol. (1998), Scott (1975a, b), Zubchenko (1980)
<b>Zoogonidae Odhner, 1902</b>	
<i>Brachyenteron pycnorganum</i> (Rees, 1953) Overstreet & Pritchard, 1977	Marcogliese a kol. (1998)
<i>Pseudozoogonoides subaequiporus</i> (Odhner, 1911) Bray & Gibson, 1986 (syn. <i>Diptherostomum microacetabulum</i> Shulman-Albova, 1952)	Bray (1979), Koie (2000)
<i>Zoogonoides viviparus</i> (Olsson, 1868) Odhner, 1902	Koie (2000), Lile (1998), Nicoll (1913), Nicoll (1915), Scott (1975a, b), Sidall (1996), Zubchenko (1980)



## 2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce, z anglického Polymerase Chain Reaction (PCR), je metoda sloužící k snadnému a rychlému zmnožení vybraného úseku DNA, založena na principu replikace nukleových kyselin (Griffin a Griffin, 1994).

Polymerázová řetězová reakce byla zavedena do praxe v roce 1985, což znamenalo obrovský přínos pro obor molekulární biologie, který byl srovnatelný například s objevem restričních endonukleáz či zahájením sekvenování DNA. O tento objev se zasloužil Kary B. Mullisem (Šmarda a kol., 2005).

### 2.6.1 Princip metody

Principem polymerázové řetězové reakce je replikace nukleových kyselin *in vitro*. Podstatou PCR je cyklicky se opakující selektivní amplifikace studovaných úseků DNA, pomocí DNA polymerázy ve směru 5' → 3'. Vybraný úsek DNA je ohraničený prostřednictvím dvou primerů, které jsou schopné se navázat na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují k sobě. Syntéza nových vláken DNA je zahájena od těchto primerů po přidání nukleotidů a DNA polymerázy, které působí protisměrně (Šmarda a kol., 2005).

### 2.6.2 DNA polymeráza

Funkci replikázy ze začátku vykonávala DNA polymeráza I, která byla izolována z *E. coli*. Naneštěstí se tento enzym během denaturačního kroku PCR inaktivuje působením vysoké teploty. Proto se musel ve třetím kroku během každého cyklu znovu přidávat čerstvý enzym. Zlepšení amplifikace DNA pomocí PCR následovalo s objevem termostabilní DNA polymerázy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza, nazvaná *Taq*-polymeráza, zůstává stabilní v průběhu denaturačního kroku PCR (Snustad a kol., 2009).

### 2.6.3 Průběh PCR

V průběhu PCR dochází ke střídání tří opakujících se kroků, během kterých probíhají tři rozdílné děje založené na různých teplotních nárocích. Polymerázová řetězová reakce je spuštěna počáteční denurací, při které se teplota pohybuje v rozmezí 92-95 °C po dobu asi 30 sekund. V následujícím kroku dochází k nasednutí (navázání) primerů na oddělené řetězce DNA, tzv. annealing. Tato fáze probíhá při teplotách 30-65 °C po dobu zhruba 30 sekund, ale jedná se o velmi individuální děj, neboť záleží na složení použitých primerů.

V posledním kroku dochází pomocí *Taq* polymerázy k syntéze nových řetězců DNA. Teplota ve třetím kroku nabývá hodnot v rozmezí 70-72 °C po dobu 90 sekund (Snustad a kol., 2009).

Reakční směs pro PCR obsahuje DNA sloužící jako templát, dále pufr udržující stabilní pH po celou dobu reakce, termostabilní DNA polymerázu (*Taq* polymerázu) a směs všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP). Reakční směs musí také obsahovat minimálně jeden pár oligonukleotidových primerů komplementárních k 3' koncovým sekvencím určeného úseku na obou vlákních templátové DNA (Čížek a kol., 2014); a v neposlední řadě nesmíme zapomenout na hořečnaté  $Mg^{2+}$  ionty, které slouží jako kofaktory (Šmarda a kol., 2005).

PCR probíhá v přístroji zvaném termocykler, ve kterém se teplota mění automaticky, a to v předem naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním jednotlivých kroků se exponenciálně vytvoří až miliarda kopií vybraného úseku. Výsledná koncentrace PCR produktu proto závisí na množství cyklů (Šmarda a kol., 2005).

#### **2.6.4 Výhody a nevýhody PCR**

Pro využití PCR jsou důležité její následující výhody. Vysoká citlivost umožňující průběh reakce s velmi malým množstvím nukleové kyseliny. Další předností PCR je získání vyšší než miliarda kopií vybraného úseku DNA po opakování v rozmezí 25–35 cyklů. Další výhodou PCR při jejím využití je možnost získat požadovanou a specifickou sekvenci DNA (Šmarda a kol., 2005).

Vysoká citlivost PCR se zprvu může jevit pouze jako výhoda, ale tato vlastnost může být zároveň i nevýhodou. A to především kvůli potenciální kontaminaci vzorku zabraňující pak správnému průběhu PCR. I jediná molekula neznámé DNA může způsobit získání falešně pozitivního výsledku (Šmarda a kol., 2005).

Další z nevýhod PCR je nepatrné, ale přesto významné množství chyb, které se začlení do kopií DNA (Snustad a kol., 2009). Za nevýhodu můžeme považovat nutnost správně navržených primerů, bez kterých PCR neproběhne, neboť primery nasedají na komplementární templátové vlákno (Brown, 2007).

#### **2.6.5 Analýza PCR produktu**

Na PCR navazuje množství experimentů. Ty se zaměřují na studování výsledného produktu PCR, ze kterého se snaží vytěžit informace o původní molekule DNA sloužící jako templát (Brown, 2007).

Velikost úseku a kvalita výsledného PCR produktu se dá ověřit prostřednictvím gelové elektroforézy. Elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších separačních metod v molekulární biologii. Principem této techniky je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli, zatímco hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny. Z tohoto důvodu se nukleové kyseliny pohybují v elektrickém poli ke kladně nabitě anodě (Čítek a kol., 2014).

### **2.6.6 Modifikace PCR**

Existuje mnoho rozdílných modifikací PCR, které se od sebe odlišují. Ať už jde o použití specifických sekvencí primerů, způsob detekce PCR produktů či dokonce, zda s jejich pomocí amplifikujeme templáty z malého počtu kopií a mnohé další (Šmarda a kol., 2005).

### 3 Cíle práce

1. Zpracovat literární rešerši o zadaném tématu
2. Morfologicky a molekulárně charakterizovat motolice z platýzů, upřesnit jejich determinaci.

Metodika:

- Barvení fixovaných motolic karmínem, nákresy jejich anatomie.
- Zpracování části materiálu pro skenovací elektronovou mikroskopii a studium povrchových struktur.
- Molekulární analýza vybraného úseku DNA.

### 4 Materiál a metody

#### 4.1 Materiál

Materiálem, který jsem používala ve své bakalářské práci, jsou motolice, které byly odebrány jako vzorky z různých tkání (nejčastěji žaberní cévy) platýze *Hippoglossoides platessoides* přivezených z expedic na Svalbard (viz obrázek 3), zajištěné Centrem polární biologie v letech 2014 a 2018. Platýzi byli chyceni pomocí tenat položených u dna v zálivech u Longyearbyenu a Petuniabuktu. Následně z nich byli opatrně uvolněni, v soudcích s vodou dopraveni na základnu a uchovávaní živí v plastových nádobách s čerstvou mořskou vodou. Ještě týž den byli humánně usmrceni a pitváni. Vzorky fixované horkým formaldehydem jsem použila k barvení Mayerovým-Schubergovým karmínem a také k přípravě pro skenovací elektronový mikroskop. Ethanolem fixované vzorky byly použity k molekulární analýze vybraných částí DNA, a to pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).



Obrázek 3: Mapa Svalbardu se značenými místy lovu *Hippoglossoides platessoides*.

Zdroj: <https://toposvalbard.npolar.no/>

## 4.2 Metody

### Barvení Mayerovým-Schubergovým karmínem

Jde o přírodní barvivo, které se získává extrakcí ze samiček červce nopálového. Používá se k barvení menších helmintů, pomocí něj můžeme zviditelnit vnitřní orgány, především ty pohlavní.

#### Příprava barviva

Karmín byl připraven smícháním 5 g karmínového prášku s 5 ml 18% HCl. Po hodině bylo přidáno 200 ml 96 % ethanolu, výsledný roztok byl zahříván až k bodu varu s následným mírným varem po dobu 2 hodin. Byl přidán malý kousek železa, a poté, co roztok vychladl, byl zfiltrován.

#### Postup barvení a vytvoření trvalých preparátů

Vzorky fixované v horkém formaldehydu, byly převedeny do 70% ethanolu a obarveny Mayerovým-Schubergovým karmínem. Vypírány byly v 70% ethanolu, odbarveny v kyselém alkoholu s následnou dehydratací pomocí vzestupné ethanolové řady (80%, 96%, 100%, 100%), pokaždé po dobu 15 minut. V hřebíčkovém oleji byly vzorky projasněny, a potom zamontovány do kanadského balzámu.

Mikroskop Olympus BX51 vybavený kreslicím zařízením v Parazitologickém ústavu (Biologické centrum AV ČR) byl použit ke studiu morfologie a ke kresbě barvených fixovaných vzorků při 4x a 20x zvětšení. Díky mikroskopu vybaveném kreslicím zařízením bylo možné plynulou čarou „obtáhnout“ hlavní barvené struktury motolic pomocí obyčejné tužky, tím vznikl základ pro ilustraci, která doprovází popis studovaného materiálu.

### **Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)**

Skenovací neboli také rastrovací či řádkovací elektronový mikroskop slouží k pozorování povrchových struktur různých objektů. K tvorbě obrazu využívá sekundárního signálu (odražených či sekundárních elektronů), díky čemuž se SEM řadí do nepřímých zobrazovacích metod (Nebesářová, 2001).

Skenovací elektronové mikroskopy se dělí do 3 druhů, a to podle množství vody, která smí být obsažena v studovaných vzorcích. U mnou používaného vysokovakuového SEM musí být vzorky úplně vysušené. U nízkovakuového a environmentálního SEM se lze dívat na vzorky, jejichž obsah vody tvoří 70 %, popřípadě až 90 % (Nebesářová, 2001).

### Příprava vzorku pro SEM

Vzorek byl připravený podle protokolu standardně užívaného k přípravě tohoto typu preparátu v Laboratoři elektronové mikroskopie, spadající pod pracoviště Biologického centra AV ČR a Přírodovědecké fakulty JU. Vzorek fixovaný horkým formaldehydem byl čištěn 15 minut pomocí vypíracího roztoku 0,1 M PB + 4% glukóza (3x). Prostřednictvím 2% roztoku OsO<sub>4</sub> byl postfixován, čímž jsem docílila zpevnění povrchu těla a snížení výskytu artefaktů. Dále byl znovu vypírán (3x) a odvodněn vzestupnou acetonovou řadou (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%), každý po dobu 15 minut, díky čemuž došlo k nahrazení vody tímto organickým rozpouštědlem. Vzorky byly fixované metodou kritického bodu. V komoře přístroje CPD, která se opakovaně vypouštěla a dopouštěla jsem dosáhla nahrazení acetonu ve vzorku zkapalněným CO<sub>2</sub>. Po nasycení vzorků došlo v prázdné komoře ke zvyšování tlaku a teploty až do tzv. kritického bodu (bod, ve kterém není rozdíl mezi zkapalněnou a plynnou fází CO<sub>2</sub>). V tomto bodě se zkapalněný CO<sub>2</sub> ve vzorku přemění na plynný, čím se vzorek vysuší a zároveň se zabrání případnému poškození vzorku povrchovým napětím kapaliny. Po vysušení se vzorky lepily na kovové terčiky a zlatily v přístroji BAL-TEC SCD 050. Pozlacení zvyšuje signál,

odvádí elektrický náboj a teplo vznikající na povrchu vzorku. Preparáty byly prohlíženy skenovacím elektronovým mikroskopem SEM JEOL JSM-7401F.

## **Molekulární analýza**

### Izolace DNA

První fází většiny molekulárních metod je izolace DNA od ostatních buněčných složek. Existuje několik odlišných principů izolace nukleových kyselin, ale všechny mají společný základ, kterým je homogenizace vzorku a lýza buněk (Čítek a kol., 2014). Pro tuto část mé práce jsem zvolila izolaci DNA pomocí komerčně vyrobeného kitu.

### Postup izolace:

Fixované vzorky motolic byly zbaveny přebytečného ethanolu jeho odsátím a následně byly vysušeny v koncentrátoru Concentrator plus (Eppendorf). DNA byla izolována kitem Exgene Tissue SV mini (GeneAll). Dále bylo napipetováno 200  $\mu$ l TL pufru, 20  $\mu$ l roztoku proteinázy K a vše důkladně promícháno pomocí vortexu. Poté byly vzorky inkubovány při teplotě 56 °C přibližně 4 hodiny do doby, než byly úplně zlyzovány. Zkumavky byly stočeny v centrifuze, aby se zabránilo uvíznutí vzorku na víčku mikrozukavky. Následně bylo přidáno 400  $\mu$ l TB pufru. Roztok byl přesunut do SV kolonky (vazba DNA na silikátovou membránu uvnitř kolonky) a centrifugován 1 minutu při 6000 g. Sběrná část kolonky byla vyměněna za novou a přidalo se 600  $\mu$ l BW pufru, který byl centrifugován 30 s při 6000 g. Dále bylo přidáno 700  $\mu$ l TW pufru a opětovně se centrifugovalo při 6000 g po dobu 30 s. Následně byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 13000 g (plná rychlost), pro zbavení se zbytků TW pufru, a poté byla kolonka umístěna do nové mikrozukavky (1,5 ml). Bylo přidáno 100  $\mu$ l deionizované vody (zahřátá na 52 °C). Inkubace probíhala 2 minuty při pokojové teplotě a vzorky byly následně centrifugovány při maximální rychlosti. Tento krok byl opakován k získání konečného objemu 200  $\mu$ l (pro větší výtěžek DNA). Izolovaná DNA byla uchována při -20 °C. Získaná DNA byla použita pro amplifikaci genu 28S rRNA.

### Polymerázová řetězová reakce (PCR) pro gen 28S rRNA

Celkový objem reakce pro jeden vzorek byl 25  $\mu$ l a obsahoval 12,5  $\mu$ l PP Master Mixu (obsahující Taq polymerázu), po 1  $\mu$ l jednotlivého PCR primeru (forward a reverse, viz tabulka 2) o koncentraci 5 pmol/ $\mu$ l, 9,5  $\mu$ l deionizované H<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l templátové DNA. Tento roztok reakční směsi byl promíchán prostřednictvím vortexu (Bio Vortex V1) a potom

pipetován do PCR mikrozkušavek (jeden vzorek, jedna mikrozkušavka), které byly před vložením do termocyklieru (T100™ ThermalCycler) umístěny v chladících stojácích, aby se zabránilo předčasnému průběhu reakce. Samotná reakce PCR probíhala v termocyklieru (program viz tabulka 3). Výsledek PCR byl poté zviditelněn na 1% agarózovém gelu (viz níže).

Tabulka 2: PCR primery

Gen	Primer	Směr	Sekvence	Zdroj
28S rRNA	LSU-5	F	TAGGTCGACCCGCTGAAYTTAAGCA	Olson a kol. (2003)
	1500R	R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	Olson a kol. (2003)

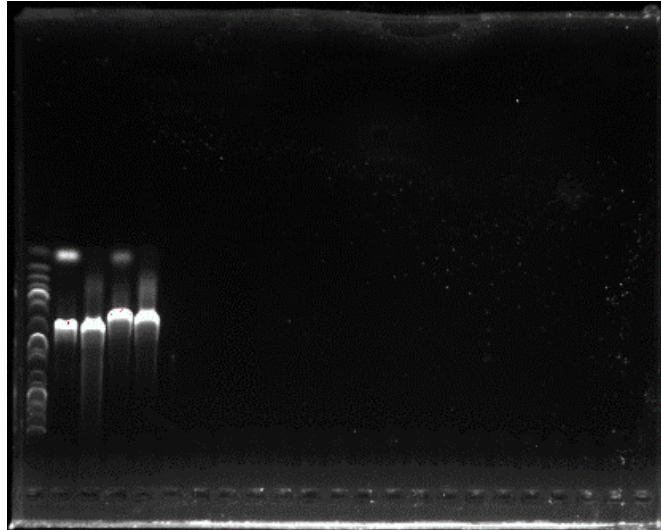
Tabulka 3: Amplifikační program pro PCR

PCR program	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	94 °C	60 sec	1 cyklus
Denaturace	94 °C	15 sec	
Nasedání primerů (Annealing)	58 °C	15 sec	39 cyklů
Syntéza nového řetězce (Extenze)	72 °C	60 sec	
Finální extenze	72 °C	7 min	1 cyklus
Chlazení	4 °C		

### Gelová elektroforéza

Prvním krokem byla příprava 1% agarózového gelu (agaróza a pufr TAE 1x), který byl obarven pomocí fluorescenčního barviva GoodView™ Nucleic Acid Stain. Gel byl nalit do utěsněné formy, ve které se nechal ztuhnout. Poté byl ztuhlý gel vložen do elektroforetické vaničky s pufrem TAE 1x. Do první jamky v gelu byly nanášeny 2 µl DNA Leaderu, který posloužil pro odhad velikosti separovaných DNA fragmentů. Zbylé jamky byly naplněny předem promíchanou směsí 2 µl PCR produktu a malého množství Loading dye (Yellow load), díky němuž došlo k zviditelnění PCR produktu. Následně byla elektroforéza připojena ke zdroji energie a zapnuta na dobu 45 minut při napětí 70 V. Po uplynutí této doby byl gel umístěn do UV Transiluminátoru (NuGenius), ve kterém došlo k zviditelnění výsledku elektroforézy a pořízen snímek gelu (viz obrázek 4).





Obrázek 4: Gelová elektroforéza Byl použit 100 bp DNA Ladder

### Sekvenace

Nezbytnou částí přípravy vzorků na sekvenaci je přečištění nukleových kyselin neboli purifikace. Jde o metodu, která nám pomáhá zbavit se nežádoucích příměsí z PCR reakce a připravit vzorky pro následnou sekvenaci. V mém případě jsem provedla post-PCR enzymatické přečištění vzorků. Reakce obsahovala 2  $\mu$ l FastAP, 0,5  $\mu$ l ExoL a 2,5  $\mu$ l deoizované H<sub>2</sub>O a probíhala v termocykleru na program trvající 15 minut při 37 °C a následně 15 minut při 80 °C.

Vzorky, určené k poslání na sekvenaci bylo nutné předem připravit dle doporučení firmy provádějící sekvenaci (SEQme, sangerovo sekvenování). Pro každý vzorek byly připraveny dvě zkumavky (jedna s forward a druhá s reverse primerem). Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 5  $\mu$ l příslušného primeru (PCR primery) a 5  $\mu$ l PCR produktu v poměru 1:1. Takto připravené vzorky byly poslány na sekvenaci do společnosti SEQme (<https://www.seqme.eu/cs/>).

### Fylogenetická analýza

Nově získané částečné sekvence pro gen 28S rRNA byly alignované se sekvencemi dostupnými z GenBanku (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (viz tabulka 4) v programu Geneious 8.0.5 (<https://www.geneious.com/>). Jako outgroup byl vybrán druh na základě příbuznosti (*Carettacolla hawaiiensis*, čeleď Spirorchordiidae). Molekulární určení nově získaných sekvencí bylo provedeno pomocí metody Maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood), před samotnou analýzou byl vybrán nejvhodnější model (TPM2u+F+G4), obojí v programu

IQ-TREE (Nguyen a kol., 2015). Fylogenetický strom byl rovněž vytvořen v programu IQ-TREE.

Tabulka 4 Nově získané sekvence pro *Aporocotyle simplex* a další sekvence vybrané z databáze GenBank, použité pro fylogenetickou analýzu na základě genu pro velkou ribozomální podjednotku

Název druhu	Hostitel	Sekvence	Zdroj
<i>Aporocotyle simplex</i>	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	*E159, *E160, *E161	Předkládaná práce
<i>Aporocotyle argentinensis</i>	<i>Merluccius hubbsi</i>	JX094803	Hernandez-Orts a kol. (2012)
<i>Aporocotyle argentinensis</i>	Merlucciidae	KY492037–KY492039, KY492000–KY492033,	Oliva a kol. (nepublikovaná data)
<i>Aporocotyle argentinensis</i>	Merlucciidae	KY491741–KY491760	Oliva a kol. (nepublikovaná data)
<i>Aporocotyle mariachristinae</i>	<i>Genypterus blacodes</i>	JX094802	Hernandez-Orts a kol. (2012)
<i>Aporocotyle margolisi</i>	<i>Merluccius productus</i>	MF287916	Hernandez-Orts a kol. (2017)
<i>Aporocotyle margolisi</i>	<i>Merluccius productus</i>	MF287915	Hernandez-Orts a kol. (2017)
<i>Aporocotyle michaudi</i>	<i>Trematomus bernacchii</i>	KR025807	Santoro a kol. (2015)
<i>Aporocotyle spinosicanalis</i>	<i>Merluccius merluccius</i>	AY222177	Olson a kol. (2003)
<i>Aporocotyle spinosicanalis</i>	<i>Merluccius merluccius</i>	AF167094	Snyder, Loker (2000)

\* sekvence nejsou zveřejněny

## 5 Výsledky

Počet pitvaných platýzů a prevalenci v roce 2018 a v předchozích letech nalezneme níže (viz tabulka 5, 6). V roce 2018 byli nakažení platýzi s prevalencí 41,2 % nalezeni pouze v zálivu u Longyerbyen (viz tabulka 5). V předchozích letech byla prevalence *A. simplex* u platýzů nižší, kromě roku 2017, kdy dosahovala 50 % (viz tabulka 6).

### 5.1 Taxonomický přehled a popis

čeleď: Aporocotylidae Odhner, 1912

rod: *Aporocotyle* Odhner, 1900

druh: *Aporocotyle simplex* Odhner

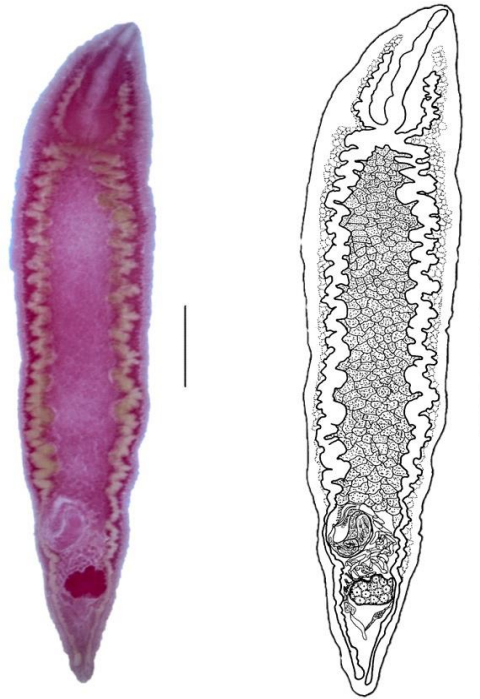
hostitel: *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius)

umístění v hostiteli: žaberní cévy

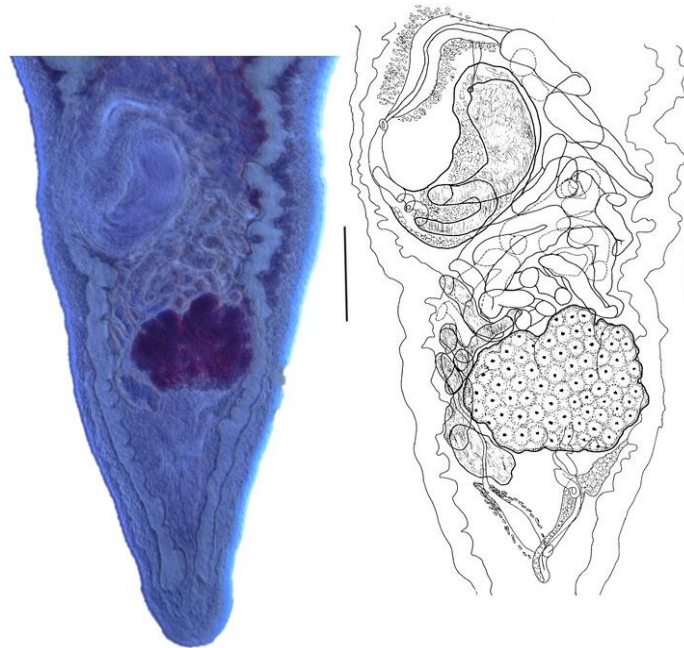
lokality: Svalbard, Longyearbyen: 78.25276°N, 15.48123°E, hloubka: 32–40 m; srpen 2018

### Popis (viz obrázky 5, 6, 7, tabulka 7)

Tělo je protáhlé, dorzo-ventrálně zploštělé, se zašpičatělým předním a zadním koncem, maximální šířka je v první třetině těla. Okraj těla je posetý shluky tegumentálních trnů, které zasahují až do roviny vitelinních folikulů. Ústní otvor je umístěn na přední ventrální straně těla, přechází v ústní dutinu, přísavky nejsou přítomny. Jícen je dlouhý, zahrnuje zhruba 1/7 délky těla, je obklopen žláznatými buňkami. Střevo je ve tvaru písmena H, sestává z párových předních větví, které zasahují k první třetině jícnu, a ze zadních párových střevních větví, které dosahují k zadnímu konci těla. Varlata se nacházejí mezi zadními střevními větvemi, vepředu zasahují k rozvětvení jícnu a dozadu dosahují k děloze. Varlata jsou nerovnoměrného tvaru, zhruba příčně eliptická, ve velkém množství, 110–191, okraji se vzájemně dotýkají. V zadní čtvrtině těla se nachází cirrový vak, který je uložený vlevo, je kyjovitý, protáhlý a zatočený, má svalnatou stěnu, obsahuje vakovitý semenný váček, pars prostatica, ejakulační kanál a vychlípitelný cirus. Samičí soustavu tvoří příčně oválný vaječník s nerovnoměrným povrchem, uložený mediálně. Z vaječníku vystupuje ovidukt (vejcovod), který přechází v trubicovitý ootyp obklopený Mehlisovou žlázou, do ootypu vyúsťuje nápadný vitelinní rezervoár. Laurerův kanál není přítomen. Začátek dělohy je přeměněn v receptaculum seminis, které může zasahovat až před vaječník a přechází v děložní kličky. Děloha tvoří četné kličky v oblasti mezi vaječníkem a varlaty, na konci přechází ve svalnatý metraterm. Vitelinní folikuly tvoří dvě souvislá laterální pole vepředu těla zasahující skoro až k ústní dutině, vzadu v těle zasahující k cirrovému vaku, případně až k vaječníku. Vitelinní rezervoár je nápadný, protáhlý, nachází se za vaječníkem, vyúsťuje do ootypu. Genitální atrium je krátké, vyúsťuje v něj cirrový vak a metraterm. Genitální pór se nachází na začátku poslední čtvrtiny těla. Exkrece měchýř je malý, trubicovitý, od něj vedou hlavní sběrné kanály do přední části těla. Na dorzální straně na konci těla vyúsťuje exkreční pór.

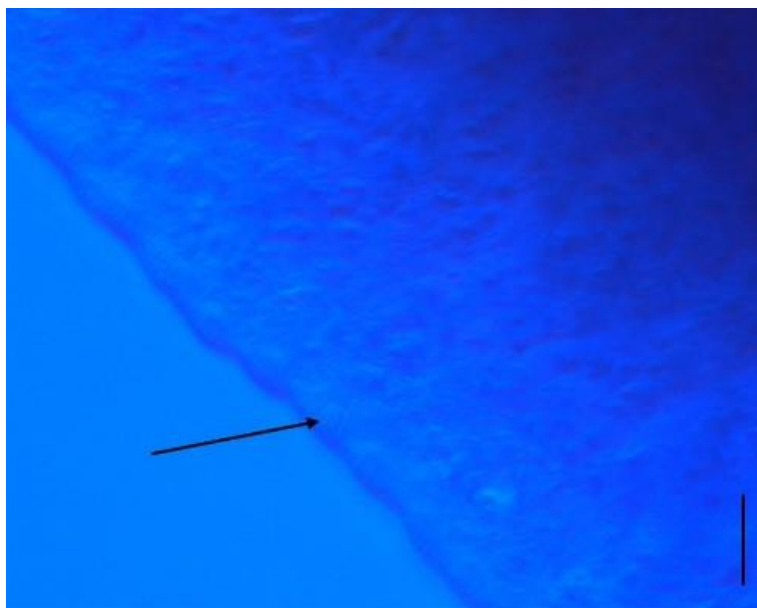


Obrázek 5: Fotografie (vlevo) a perokresba (vpravo) celé motolice *Aporocotyle simplex* z *Hippoglossoides platessoides*. Měřítko u fotografie 500  $\mu\text{m}$ , u perokresby 1000  $\mu\text{m}$ .



9,

Obrázek 6: Detail pohlavních orgánů motolice *Aporocotyle simplex* zaznamenaný na fotografii (vlevo) a perokresbou (vpravo). Měřítko u fotografie a kresby je 200  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 7: Detail shluků tělních trnů v tegumentu. Měřítko 20  $\mu\text{m}$ .

Tabulka 5: Údaje o vyšetřovaném materiálu platýzů *Hippoglossoides platessoides* za rok 2018

Lokalita nálezů 2018	Počet vyšetřených	Počet nakažených	Prevalence v %
Longyearbyen, Svalbard	17	7	41,2
Petuniabukta, Isfjord, Svalbard	13	-	-
Celkem	30	7	23,3

Tabulka 6: Souhrnné údaje o materiálu platýzů *Hippoglossoides platessoides* za jednotlivé předcházející roky

Rok	Počet vyšetřených	Počet nakažených	Prevalence v %
2014	9	1	11,1
2015	14	2	14,3
2016	2	1	50,0
2017	11	2	18,2

Tabulka 7: Rozměry *Aporocotyle simplex* z platýze *H. platessoides* (předkládaná práce) ve srovnání s daty autorů Thulin (1980) a Rolbiecki (2007)

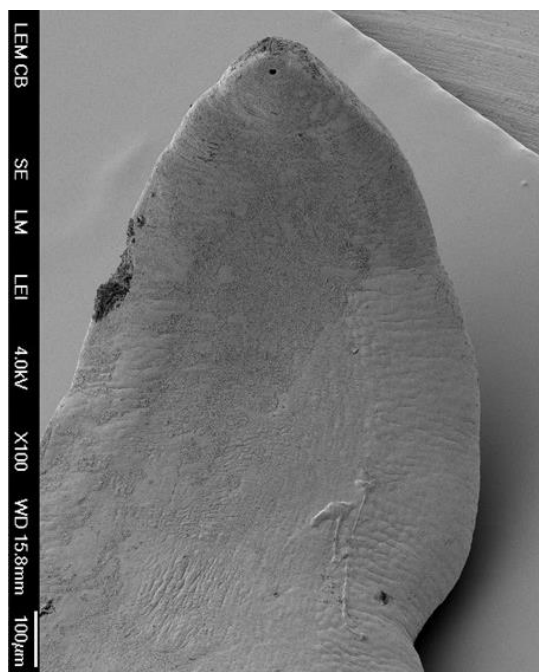
	Předkládaná práce	Thulin (1980)	Rolbiecki (2007)
Počet měřených exemplářů	N=11	N=100	N=1
Hostitel	<i>H. platessoides</i>	<i>H. platessoides</i>	<i>Limanda limanda</i>
Délka těla	4076–7269 (5559)	890–10300 (5595)	2370
Šířka těla	709–1269 (965)	110–1520 (815)	440
Délka jícnu	633–1190 (950)	* 1034	740
Délka ústního otvoru	63–179 (110)	* 146	
Délka přední střevní větve	481–872 (683)	* 876–888 (882)	380
Vzdálenost stř. rozvětvení od počátku těla	494–885 (686)	* 854–899 (876)	
Délka zadní střevní větve	3114–5936 (4392)	* 6449–6697 (6573)	1550
Délka cirového vaku	250–344 (293)	* 326	135
Šířka cirového vaku	101–153 (130)	* 112	109
Délka vaječníku	152–293 (239)	* 202	160
Šířka vaječníku	253–408 (315)	* 315	130
Délka varlete	36–130 (76)	* 56–101 (75)	16–58 (43)
Šířka varlete	51–127 (92)	* 67–135 (105)	25–58 (36)
Počet varlat	110–191 (151)	110–192 (151)	131
Poměr jícnu k délce těla	1:5,3–6,5	ca 1:6	
Poměr přední stř. větve k zadní stř. větvi	1:4,6–7,8	* 1:7,5	
Poměr zadní stř. větve k délce těla	1:1,2–1,3		

\* rozměry byly vypočítány z kresby Thulina (1980)

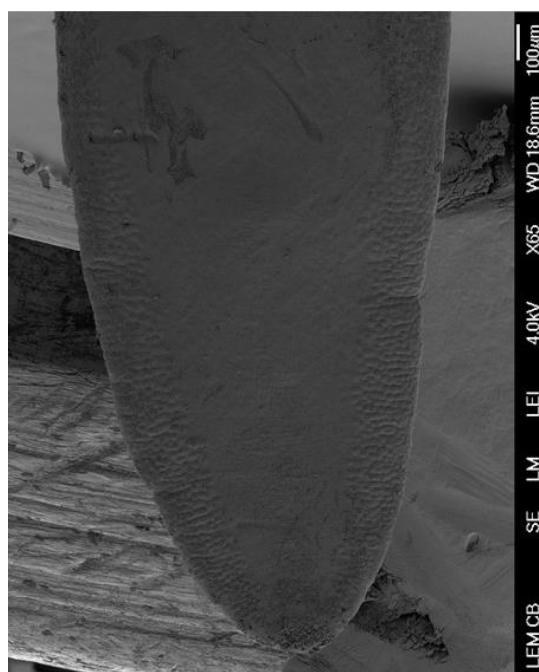
## 5.2 Výsledky SEM

Při pozorování v mikroskopu se mi podařilo prohlédnout celý povrch motolice, kde jsem u jednoho ze tří vzorků objevila otvor, odpovídající ústnímu otvoru, který nebyl u ostatních vzorků dostatečně patrný. Dále jsem pátrala po tegumentálních trnech, které slouží k přichycení motolice.

Výsledkem pozorování vzorku pomocí skenovací elektronové mikroskopie jsou fotografie pořízené na SEM JEOL JSM-7401F (viz obrázky 8 a 9), na nichž by za ideálních podmínek měly být zřetelné tegumentální trny. Ty jsou ve shlucích rozloženy po těle, přičemž se vyskytují pouze po okrajích jak na dorzální, tak ventrální straně. Na fotografiích jsou vidět plochy těla s výskytem ostnů (viz obrázek 9), samotné ostny však vidět nejsou, což mohlo být způsobeno tím, že byly překryty cytoplazmatickou membránou, protože u trvalých preparátů jsou trny patrné.



Obrázek 8: Detail předního konce motolice pozorovaný v SEM. Měřítka 100 µm.

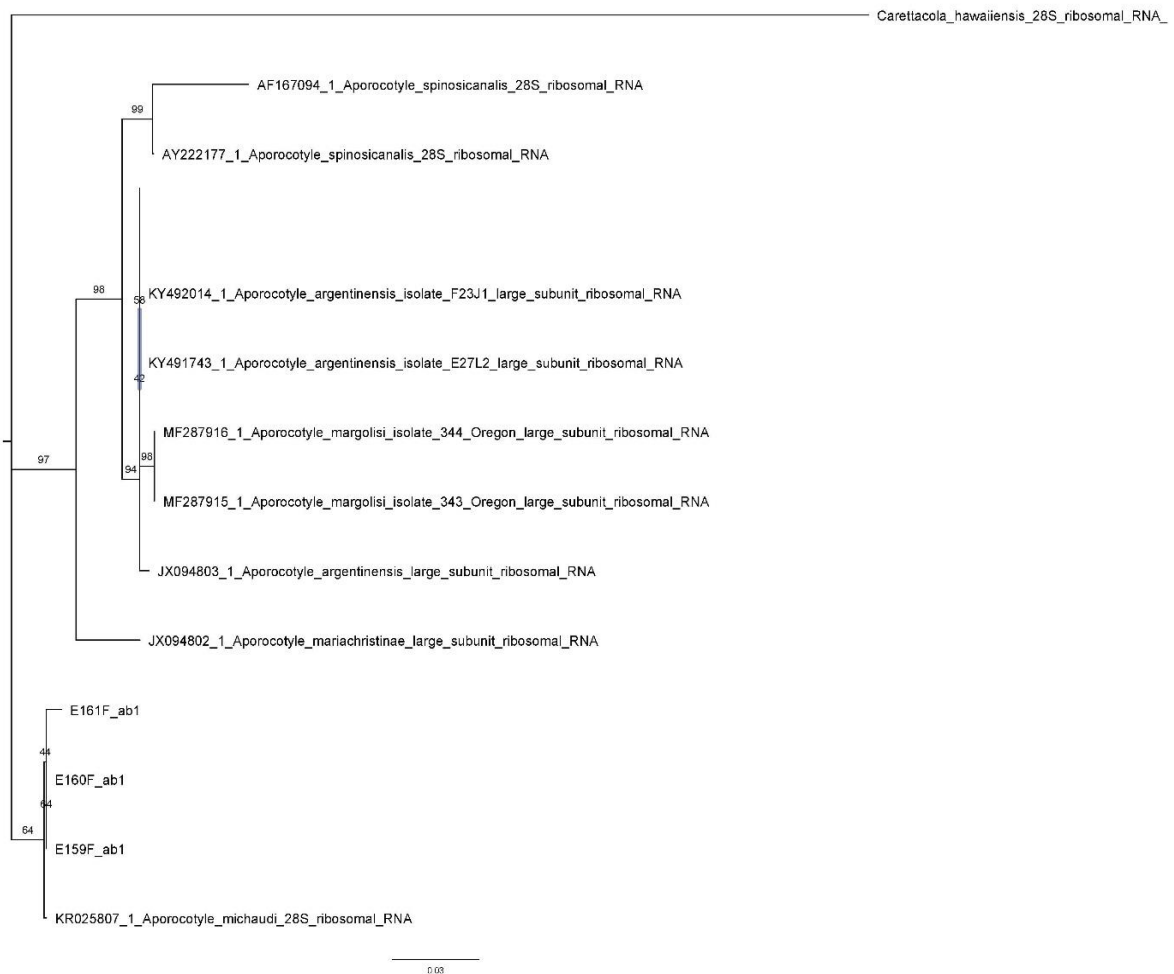


Obrázek 9: Detail zadního konce motolice pozorovaného v SEM. Měřítka 100 µm.

### 5.3 Výsledky molekulární analýzy

K získání výsledků byly použity 3 nově získané sekvence (E159, E160 a E161) dospělých motolic z platýze *H. platessoides* a k porovnání sloužilo 64 sekvencí pěti druhů rodu *Aporocotyle* dostupných z GenBanku (viz tabulka 4).

Výsledkem fylogenetické analýzy (Maximum Likelihood) je fylogenetický strom (viz obrázek 10), ve kterém nové sekvence spadají do jedné samostatné linie (větve), která ovšem není úplně dobře podpořena (bootstrap 64). Nejbližším druhem k *A. simplex* je *A. michaudi* pocházející z Antarktidy, který spadá do stejné linie, avšak liší se výrazně svou morfologií. Z ostatních druhů tvoří samostatné, dobře podpořené linie *A. spinosicanalis* a *A. mariachristinae*. *Aporocotyle margolisi* tvoří linii spadající do druhu *A. argentinensis*.



Obrázek 10: Fylogenetická rekonstrukce vztahů v rámci druhů čeledi Aporocotylidae na základě sekvencí genu 28S rRNA metodou maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood) s užitím modelu TPM2u+F+G4 jako nejlepšího. Přístupová čísla sekvencí (NCBI databáze) jsou uvedena před názvy taxonů. Druh *Carettacola hawaiiensis* (čeleď Spirorchiidae) byl použit jako outgroup. Bootstrapové podpory jsou zobrazeny u jednotlivých uzlů. Větve *Aporocotyle argentinensis* (pro celkem 57 sekvencí) jsou pro přehlednost zkomprimovány. Měřítko udává očekávaný počet substitucí pro pozici.



## 6 Diskuse

V této práci se mi podařilo potvrdit druhové určení motolic nalézáných v platýzech na Svalbardu (záliv Longyerbyen) jako *Aporocotyle simplex*. Druh *A. simplex* je geograficky rozšířen v zálivu sv. Vavřince v Kanadě, u západního pobřeží Švédska, v Barentsově a Beringově moři, u pobřeží Kamčatky a Grónska. Z mých výsledků vyplývá, že je druh *A. simplex* rozšířen i na Svalbardu. Mohu se domnívat, že mnou popsáný nález motolice na Svalbardu je prvním doložitelným zdrojem, vycházím totiž z práce autorů, kteří ve svých článcích toto souostroví nezmiňovali.

*Aporocotyle simplex* je typovým druhem čeledi Aporocotylidae, což znamená, že existence čeledi je definována tímto druhem. Vajíčka mohou svojí patogenitou při vysoké intenzitě nákazy způsobit nekrózu v žaberních tepnách a v srdečním svalu. Dokáží vyvolat obranné reakce, vedoucí k zánětlivé odpovědi a velký počet motolic může snížit průtok krve v cévách nebo dokonce zapříčinit smrt hostitele.

Na základě molekulární analýzy *A. simplex* vychází jako samostatná linie společně s druhem *A. michaudi*, který je však známý jen z Antarktidy, z ryb *Trematomus bernachii* (Nototheniidae) a liší se výrazně morfologicky (viz níže). Ostatní druhy *Aporocotyle*, u kterých jsou známy sekvence pro gen 28S rRNA tvořily samostatné linie (*A. spinosicanalis*, *A. mariachristinae*). Avšak linie s *A. margolisi* spadá do linie *A. argentinensis*, k ověření jejich příbuzenských vztahů je nutná důkladnější molekulární a morfologická analýza.

Na základě morfologického studia (SEM, pozorování pod světelným mikroskopem) se mi podařilo jednoznačně potvrdit, že *A. simplex* patří do čeledi Aporocotylidae. Motolice odpovídají diagnóze rodu (viz Smith, 2002) v přítomnosti dorzoventrálně zploštělého těla bez ústní či břišní přísavky, v přítomnosti tělního otrnění, střeva ve tvaru H, cirrového vaku obsahujícím semenný váček, většího počtu varlat a jediného vaječníku a folikulárního vitellária.

Prvním, kdo popsal *A. simplex* byl Odhner v roce 1900, jeho popis je ovšem velmi krátký. V následujících letech z jeho práce čerpalo velké množství autorů, ale až Thulin (1980) provedl redeskripci druhu na základě vlastního materiálu a materiálu od Odhnera (1900). Ve své práci ovšem neposkytl příliš mnoho relevantních rozměrů vnitřních orgánů. Mnou zpracovaný materiál *A. simplex* se s jeho popisem shoduje ve velikosti těla a všech orgánů, ale také jejich umístěním, stejně tak počtem varlat, rozmístěním tegumentálních trnů a poměrem délky jícnu k délce těla (viz tabulka 7).

Podle molekulární analýzy nejbližší druh *Aporocotyle michaudi* je na rozdíl od *A. simplex* menší a povrch jeho tegumentu je pokrytý jednotlivými kuželovitými ostny. Počet varlat je také menší, přibližně 108 (73–173). Poměr jícnu k celkové délce těla je ve stejné poměru jako u *A. simplex* (Santoro et al., 2015).

## 7 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání literární rešerše zahrnující charakteristiku zkoumané oblasti, tak i charakteristiku čeledi zkoumaných motolic (Trematoda, Digenea, čeleď Aporocotylidae) a přehled motolic u platýze, *Hippoglossoides platessoides*.

Na základě kombinace morfologických a molekulárních metod (analýza částečných sekvencí genu 28S rRNA) se mi podařilo potvrdit, že nalezené motolice v platýzech náležejí k druhu *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900. Protože tento druh nebyl zatím fylogeneticky analyzován pomocí molekulárních metod, je zjištění sekvence části podjednotky RNA prvním výsledkem, umožňujícím zjistit pozici tohoto druhu v rámci rodu. Tvoří samostatnou větev spolu s antarktickým *A. michaudi*.

V rámci praktické části jsem si osvojila dvě morfologické metody, barvení Mayerovým-Schubergovým karmínem a přípravu a pozorování preparátu ve skenovacím elektronovém mikroskopu. Dále jsem si osvojila molekulární metody, což byla izolace DNA, amplifikace pomocí PCR, elektroforéza a purifikace DNA a její příprava k odeslání na sekvenování a identifikace materiálu pomocí fylogenetické analýzy (Maximum Likelihood).

## 8 Seznam použitých zdrojů

1. BRAY, R. A., 1979. Digenea in marine fishes from the eastern seaboard of Canada. *Journal of Natural History*, 13, 399–431, doi: 10.1080/00222937900770331
2. BRAY, R. A., GIBSON, D. I., 1991. The Acanthocolpidae (Digenea) of fishes from the north-east Atlantic: the status of *Neophasis* Stafford, 1904 (Digenea) and a study of North Atlantic forms. *Systematic Parasitology*, 19, 95–117, 9 figs, 3 tabs.
3. BRINKMANN JR, 1988. Presence of *Otodistomum* sp. metacercariae in Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 73, 79–82. Bergen. ISSN 0036-4827.
4. BROWN, T. A., 2007. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-1719-6.
5. ČÍTEK, J., HANUSOVÁ, L., MÍKOVÁ, A., TOTHOVÁ, L., VERNEROVÁ, K., HOSNEDLOVÁ, B., 2014. *Vybrané návody k laboratorním cvičením z molekulární biologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-443-8.
6. DEBELIUS, H., 1997. *Atlas ryb Středomoří a Atlantiku: přes 800 fotografií mořských ryb pořízených v jejich přirozeném prostředí*. Frankfurt: IKAN-Unterwasserarchiv.
7. DIESENER, G., 2002. *Ryby*. Praha: Knižní klub. Zoologická encyklopedie. ISBN 80-242-0828-8.
8. EIRAS, J. C., SEGNER, H., WAHLI, T., KAPOOR, B. G., 2008. *Fish Diseases: Volume 2*. Enfield, NH: Science Publishers. ISBN 978-1-57808-528-6.
9. ELVERLAND, E., 2009. *The Arctic system: International Polar Year 2007/2008*. Tromsø, Norway: Norwegian Polar Institut. ISBN 978-827-6662-511.
10. FROESE, R., PAULY, D., 2019. FishBase. *World Wide Web electronic publication*. <http://www.fishbase.org>, version (02/2019)
11. GIBSON, D., I., JONES, A., BRAY, R. A., 2002. *Keys to the Trematoda*. New York, NY, USA: CABI Publishing and the Natural History Museum. ISBN 08-519-9547-0.
12. GRIFFIN, H. G., GRIFFIN, A. M., 1994. *PCR technology: current innovations*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 08-493-8674-8.

13. GULLIKSEN, B., SVENSEN, E., 2004. *Svalbard and life in polar oceans*. Kristiansund: Kom forlag. ISBN 82-92496-03-3.
14. HERNANDEZ-ORTS, J. S., ALAMA-BERMEJO, G., CARRILLO, J. M., GARCIA, N. A., CRESPO, E. A., RAGA, J. A., MONTERO, F. E., 2012. *Aporocotyle mariachristinae* n. sp., and *A. ymakara* Villalba & Fernandez, 1986 (Digenea: Aporocotylidae) of the pink cusk-eel, *Genypterus blacodes* (Ophidiiformes: Ophidiidae) from Patagonia, Argentina. *Parasite*, 19, 319–330
15. HERNANDEZ-ORTS, J. S., HERNANDEZ-MENA, D. I., ALAMA-BERMEJO, G., KUCHTA, R., JACOBSON, K. C., 2017. Morphological and molecular characterisation of *Aporocotyle margolisi* Smith, 1967 (Digenea: Aporocotylidae) from the North Pacific hake *Merluccius productus* (Ayres) (Gadiformes: Merlucciidae) off Oregon, USA. *Systematic Parasitology*, 94, 819–829
16. HORÁK, P., SCHOLZ, T., 1998. *Biologie helmintů*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-782-8.
17. HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L., ADEMA, C. M., 2002. Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology*, 52, 155–233.
18. HUNNINEN, A. V., CABLE, R. M., 1941. Studies on the life history of *Anisoporus manteri* Hunninen and Cable, 1940 (Trematoda: Allocreadiidae). *The Biological Bulletin*, 80, 415–428. <https://doi.org/10.2307/1537726>
19. INSTITUTE OF OCEANOLOGY, 2013. *European Arctic – sea users guide*. Polish academy of sciences, Sopot. ISBN 978-83-928355-5-4.
20. JÍRA, J., 1998. *Lékařská helmintologie: helmintoparazitární nemoci*. Praha: Galén. ISBN 80-85824-82-5.
21. KOIE, M., 1982. The redia, cercaria and early stages of *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Sanguinicolidae) – a digenetic trematode which has a polychaete annelid as the only intermediate host. *Ophelia*, 21, 115–145.
22. KOIE, M., 2000. Metazoan parasites of teleost fishes from Atlantic waters off the Faroe Islands. *Ophelia*, 52, 25–44

23. KOVACS, K. M., LYDERSEN, Ch., 2006. *Birds and mammals of Svalbard [Rev. ed.]*. Troms: Norwegian Polar Institute. Polarhåndbok. ISBN 978-82-7666-231-3
24. LILE, N., 1998. Alimentary tract helminths of four pleuronectid flatfish in relation to host phylogeny and ecology. *Journal of Fish Biology*, 53, 945–953, 5 tabs.
25. MARCOGLIESE, D. J., NAGLER, J. J., CYR, D. G., 1998. Effects of exposure to contaminated sediments on the parasite fauna of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 88–95.
26. MCCLELLAND, G., MELENDY, J., 2007. Use of endoparasitic helminths as tags in delineating stocks of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) from the southern Gulf of St. Lawrence and Cape Breton Shelf. *Fishery Bulletin*, 105, 180–188.
27. MOEN, F. E., SVENSEN, E., 2004. *Marine fish & invertebrates: of Northern Europe. Southend on Sea: Aqua Press*. ISBN 09-544-0602-8.
28. MORRISON, C. M., MCCLELLAND, G., CORNICK, J., MARCOGLIESE, D., 1986. Parasites and diseases of some marine finfish off Nova Scotia. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1424, 36 pp., 11 tabs.
29. MULLER, R., 2002. *Worms and Human Disease. 2nd ed.* Wallingford: CABI Publishing. ISBN 0-85199-516-0
30. NEBESÁŘOVÁ, J., 2001. Skenovací elektronový mikroskop. *Elektronová mikroskopie pro biology*. <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/>
31. NGUYEN, L.-T., SCHMIDT, H. A., VON HAESLER, A., MINH, B. Q., 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 268–274. (<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msu300>)
32. NICOLL, W., 1913. Trematode parasites from food-fishes of the North Sea. *Parasitology*, 6, 1–88, doi:10.1017/s0031182000003024
33. NICOLL, W., 1915. A list of the trematode parasites of British marine fishes. *Parasitology*, 7, 339–378.

34. ODHNER T., 1900. *Aporocotyle simplex* n. g., n. sp., ein neuer Typus von ektoparasitischen Trematoden. *Zentralblatt fuer Bakteriologie und Parasitenkunde, Abteilung I*, 27, 62–66.
35. OLIVA, M., CARDENAS, L., VALDIVIA, I. M., BRUNING, P., AROS, V. Molecular analysis demonstrated that hakes (Pisces: Merluccidae) of South America are host for one species of *Aporocotyle* and not three: implications for the biogeography of South American hakes. (nepublikovaná data)
36. OLIVA, M., CARDENAS, L., VALDIVIA, I. M., BRUNING, P., AROS, V., NASCIMENTO, G. M. Molecular analysis demonstrated that hakes (Pisces: Merluccidae) of South America are host for one species of *Aporocotyle* and not three: implications for the biogeography of South American hakes. (nepublikovaná data)
37. OLSON, P. D., CRIBB, T. H., TKACH, V. V., BRAY, R. A., LITTLEWOOD, D.T. J., 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33, 733–755
38. ROLBIECKI, L., 2007. First record of a fish parasite *Aporocotyle simplex* (Digenea) from the Polish Exclusive Economic Zone of the Baltic Sea. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37, 95–97
39. RONALD, K., 1960. The metazoan parasites of the Heterosomata of the Gulf of St. Lawrence. VI. Digenea. *Canadian Journal of Zoology*, 38, 923–937.
40. RYŠAVÝ, B., ČERNÁ, Ž., CHALUPSKÝ, J., ORSZÁGH, I., VOJTEK, J., 1989. *Základy parazitologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Učebnice pro vysoké školy. ISBN 80-042-0864-9.
41. SANTORO, M., CIPRIANI, P., PANKOV, P., LAWTON, S. P., 2015. *Aporocotyle michaudi* n. sp. (Digenea: Aporocotylidae) from the emerald rock cod, *Trematomus bernacchii* (Teleostei: Perciformes) in Antarctica. *Parasitology International*, 64, 324–329
42. SCOTT, J. S., 1975a. Incidence of trematode parasites of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) of the Scotian Shelf and Gulf of St. Lawrence in relation to fish length and food. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32, 479–483.

43. SCOTT, J. S., 1975b. Geographic variation in incidence of trematode parasites of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) in the Northwest Atlantic <http://journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=0015-296X> *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32, 547-550.
44. SIDALL, R., PIKE, A. W., MCVICAR, A. H., 1994. Parasites of flatfish in relation to sewage sludge dumping. *Journal of Fish Biology*, 45, 193-209, 5 tabs, 4 figs.
45. SMITH, J. W., 2002. *Family Sanguinicolidae von Graff, 1907*. Gibson, D. I., Jones, A., Bray, R. A. (editoři): *Keys to the Trematoda. Volume 1*. CABI Publishing, Natural History Museum London, Wallingford pp. 433-522.
46. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., ed., 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.
47. SNYDER, S. D., LOKER, E. S., 2000. Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*. *Journal of Parasitology*, 86, 283-288
48. STATISTICS NORWAY, 2014. *This is Svalbard 2014. What the figures say*. ISBN 978-82-537-9037-4.
49. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
50. TEROFAL, F., MILITZ, C., 1996. *Mořské ryby v evropských vodách*. Praha: Ikar. Průvodce přírodou (Ikar). ISBN 80-720-2009-9.
51. THULIN, J., 1980. A redescription of the fish blood-fluke *Aporocotyle simplex* ODHNER, 1900 (Digenea, Sanguinicolidae) with comments on its biology. *Sarsia*, 65, 35-48. Bergen. ISSN 0036-4827.
52. THULIN, J., 1991. *Aporocotyle simplex*, a blood fluke in flatfish. *ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish*. Copenhagen. No. 49: 5pp., 3 figs..
53. VOLF, P., HORÁK, P. a kol., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-008-9.



54. WOLFGANG, R. W., 1954. Studies of the trematode *Stephanostomum baccatum* (Nicoll, 1907). I. The distribution of the metacercaria in eastern Canadian flounders. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 11: 954–962.
55. WOLFGANG, R. W.; MYERS, B. J., 1954. *Gonocerca macroformis* sp. nov. (Derogenetinae: Hemiuridae) from the ovary of the cod. *Canadian Journal of Zoology*, 32, 25–29.
56. WOLFGANG, R. W., 1955. Studies of the trematode *Stephanostomum baccatum* (Nicoll, 1907): III. Its life cycle. *Canadian Journal of Zoology*, 33, 113–128, doi:10.1139/z55-007
57. WoRMS Editorial Board (2019). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2019-04-14. doi:10.14284/170
58. ZUBCHENKO, A. V., 1980. Parasitic fauna of Anarhichadidae and Pleuronectidae families of fish in the Northwest Atlantic. *International Commission for Northwest Atlantic Fisheries. Selected papers*, 6, 41–46.

## 9 Seznam zkratk

BW pufr	promývací pufr
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CPD	Critical Point Drying
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
HCl	kyselina chlorovodíková
OsO <sub>4</sub>	oxid osmičelý
PB	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TB pufr	vázací pufr
TL pufr	lyzační pufr
TW pufr	promývací pufr