



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Motolice čeledi Gymnophallidae na Svalbardu

Bakalářská práce

Studijní program:

Zdravotní laborant

Autor: Charlotte Čuhajová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Tomáš Týmł

České Budějovice 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice,2016

Charlotte Čuhajová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za zadání vhodného tématu bakalářské práce. Chtěla bych poděkovat za odborné vedení a velkou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat mému školiteli RNDr. Tomáši Tymlovi za pomoc s molekulárními metodami a cenné rady pro praktickou část mé bakalářské práce. Oběma děkuji za poskytnutí materiálů k teoretické části a praktické části

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá molekulárně biologickým potvrzením předpokládaného životního cyklu motolice čeledi *Gymnophallidae*. Mezihostiteli jsou mlži *Mya truncata*, *Hiatella arctica* a definitivním hostitelem je kajka mořská *Somateria mollissima*. Fixované vzorky motolic byly přivezeny ze Svalbardu, kde byly izolovány z tkání mlžů a kajky. K identifikaci motolic byly použity molekulární metody.

Na Svalbardu jsou mlži *Mya truncata* parazitováni s vysokou prevalencí metacerkáriemi čeledi *Gymnophallidae*, s menší prevalencí i mlži *Hiatella arctica*. Oba druhy jsou významnou složkou potravy kajek *Somateria mollissima*. Je tedy pravděpodobné, že kajka je definitivním hostitelem této motolice. Úkolem této práce je hypotézu potvrdit ztotožněním DNA metacerkárií z mlžů a motolice z kajky.

Posledním cílem bylo vypracovat literární rešerši o motolicích čeledi *Gymnophallidae*.

Provedla jsem izolaci DNA jednotlivě z jedinců motolic pomocí tří různých postupů. První izolace byla provedena fenol-chloroformem z materiálu uloženého v pufru TNES. Dále s využitím kitu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), a to s pomocí tekutého dusíku k rozmělnění tkáně a bez tekutého dusíku. Následujícím krokem byla polymerázová řetězová reakce (PCR) amplifikace vnitřních prepisovaných mezerníků (ITS rDNA) a oblasti genu cytochrom oxidasy - podjednotky I (COI) mitochondriální DNA (mtDNA). Získané PCR produkty jsem vizualizovala pomocí elektroforézy a fragmenty o hledané velikosti jsem izolovala pomocí kitů QIAquick Spin (Qiagen) a Gene All Expin Combo (GeneAll). Přečištěné PCR produkty jsem odeslala firmě Seqme, která z nich připravila sekvence.

Totožnost s metacerkáriemi *Hiatella arctica* nebyla prokázána, pravděpodobně z důvodu špatné amplifikace DNA metacerkárie z *Hiatella arctica* nebo nedostatku získané templátové DNA v PCR. Následné klonování DNA metacerkárie z *Hiatella arctica* se nezdařilo.

Juvenilní motolice čeledi *Gymnophallidae* izolovaná ze střeva kajky je totožným druhem s metacerkáriemi z *Mya truncata*.

Abstract

This thesis deals with the molecular biological confirmation of anticipated life cycle of gymnophallid trematode. Specific intermediate hosts are bivalves *Mya truncata*, *Hiatella arctica* and final host is eider *Somateria mollissima*. Fixed samples of trematodes were brought from Svalbard, where they were isolated from tissues of molluscs and eider. Molecular methods were used to identify trematode species.

On Svalbard the bivalves *Mya truncata* are parasitized with a high prevalence with metacercariae of family Gymnophallidae, and *Hiatella arctica* with less prevalence. Both species are an important food component of eider *Somateria mollissima*. Therefore the eider is probably the definitive host of this trematode. The task of this work is to confirm this hypothesis by identifying DNA from metacercariae and the trematode from eider.

The additional task was to prepare literature search about Gymnophallidae family.

The trematode DNA isolation was performed by using three methods. First isolation was performed using phenol-chloroform TNES buffer, followed by liquid nitrogen and without liquid nitrogen with the kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). The next step was a PCR amplification and sequence using ITS and COI. Then, electrophoresis was carried out and the resulting DNA fragments were further isolated and forwarded to Seqme company which carried out the parasite DNA sequencing.

Identity with metacercaria from *Hiatella arctica* has not been clearly demonstrated, because of bad amplification of DNA from trematode from *Hiatella arctica*. Subsequent cloning DNA trematode from *Hiatella arctica* failed.

Gymnophallid trematode isolated from the eider gut is the identical species as metacercaria from *Mya truncata*.

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1 Svalbard.....	7
2. Helminti.....	12
2.1. Třída Trematoda (motolice).....	12
2.2. Podtřída Digenea.....	15
2.3. Gymnophallidae.....	18
2.4. Hostitelé.....	23
3. Molekulární diagnostika.....	26
4. Hypotézy.....	33
5. Materiál a metody.....	34
5.1. Materiál.....	34
5.2. Metodika.....	34
6. Výsledky.....	49
6.1. Metody PCR a ELFO.....	49
6.2. Sekvence.....	52
6.3. Klonování.....	53
6.4. Fylogenetická analýza.....	57
7. Diskuse.....	59
8. Závěry.....	63
9. Literatura.....	64
10. Klíčová slova.....	68

1. Úvod

1.1 Svalbard

Poloha, velikost a správa

Svalbard je souostroví v Severním ledovém oceánu, severně od evropské pevniny. Nachází se severozápadně od Barentsova moře. Svalbard se rozkládá na území 61 299 km². 60% země tvoří ledová plocha a 10% vegetace. Největším ostrovem jsou Spicberky. Další ostrovy Nordaustlandet, Barentsøya, Kong Karls Land, Hopen, Prins Karls Forland. Bjørnøya je část Svalbardu, je to střední ostrov mezi Spicberky a Norskem. Bjørnøya a okolní vody jsou bohaté na ptáky. Bjørnøya je také bohatý na faunu. Ostrov se stal nedávno přírodní rezervací.

Norská správa

Svalbard se někdy nazývá ledová krajina. Cesta na sever Svalbardu trvá přes 1 den. Většina zvířecího života na Svalbardu je v moři, dynamika ledovcového okraje je velmi důležitá pro produkci organického materiálu v polární oblasti. Populace na Svalbardu

se pohybuje okolo 300 000 lidí. Tito lidé žijí na západní části ostrova Spicberky. Z toho 1500-200 obyvatel žije na hranici ve správním středisku Longyearbyen (Gulliksen, Svensen 2004).

Klima a sezónní variace

Klima na Svalbardu je mírnější než v jiných zeměpisných šířkách a to je způsobeno nízkými tlaky a teplým proudem z Atlantického oceánu. Průměrná roční teplota na Longyearbyen se pohybuje okolo -4 °C. Nejvyšší zaznamenaná teplota na Svalbardu

je 21,3 °C a nejnižší je -49,2 °C. V zimě zde vane silný vítr a v létě je zde typický výskyt mlhy. Na Špicberkách je velmi málo vodních srážek. V Longyearbyenu je méně srážek, než v suchých oblastech na norské pevnině. Většina srážek na Svalbardu, pochází z polárních východních větrů z Barentsova moře. Třikrát více srážek je na jižní části Svalbardu ve srovnání s Longyearbyenem se západní části Špicberky. Velké kolísání povětrnostních podmínek je typické pro Svalbard, speciálně během zimy je způsobeno velkými teplotními rozdíly, vzduchovými proudy Arktidy a Atlantského oceánu. Například během zimy jsou týdny s teplotami okolo -15 °C do -30 °C, převážně v oblastech, které jsou ovlivněny arktickým vzduchem. Teplotní změna je otázkou hodiny, když na Svalbard zavane arktický vzduch. V Longyearbyenu je půlnoční slunce od 20 dubna do 23 srpna. Polární noc je v Longyearbyenu od 26 října do 15 února. V zimě jsou dny na Svalbardu tmavé a chladné. V létě jsou dny na Svalbardu naopak světlé a teplé. Většina polárních organismů se přizpůsobila sezonním podmínkám. Organismy se na zimu připravují během léta přijímáním potravy a následně ukládáním energie z potravy. Hodně polárních organismů ukládá tuto energii ve svém tuku (Gulliksen, Svensen 2004).

Oceánografie

Pobřeží a fjordy jsou na Svalbardu ovlivněny arktickými a atlantickými vodami. Atlantické vody přináší proudy k západním Špicberkům. Atlantické vody jsou převážně teplé, slané a převážně mají teplotu vyšší než 3 °C. Na západě je voda chladnější než vody Atlantické. Zimní ledová voda, je proces kdy moře chladne a zamrzá. Během zimy se vytváří ledovce. Moře má v tomto období kolem -1,8 °C. Proudění atlantické vody na Svalbardu se mění z roku na rok a to má důsledky pro živé organismy (Gulliksen, Svensen 2004).

Led

Mořský led se rozkládá v Arktidě na rozloze 14x10 km² a toto je varianta v letní sezoně, kdy ledy tají. Asi polovina mořského ledu v létě roztaje a zbývající část je tak

zvaná ledová zóna. Ledová plocha na arktickém kontinentu má dvě třetiny ledu z celkového ledu na světě. Mořský led na Arktidě je v neustálém pohybu a je poháněn větrem. Fjordy a pobřežní část severu Svalbardu je pokryta ledem 8-9 měsíců, kdežto fjordy na západní straně Svalbardu mohou mít volnou vodu po celou zimu.

Z biologického pohledu, led ukrývá bohatou floru a faunu. Rozsah arktického mořského ledu se zmenšil od roku 1970. Tloušťka víceletých mořských ledů se snížila průměrně o 3,1 m. Tento jev může být důsledkem přirozené variace, ale může být také známkou globálního antropogenního oteplování s obrovskými ekologické důsledky (Gulliksen, Svensen 2004).

Od roku 1596, kdy byl Svalbard objeven, se zde začalo s lovem, rybařením, ale také těžbou uhlí a začal se zde rozvíjet cestovní ruch. Začaly se ve velkém lovit grónské velryby, které málem zcela vymizely, ale od roku 1980 byl lov velryb zakázán. Odborníci se domnívali, že velryby na Svalbardu již vyhynuly, ale v poslední době byly spatřeny ve vodách u Nordaustlandet, Země Františka Josefa. Dále byli loveni mroži, ale ti jsou již od roku 1952 chráněni a jejich výskyt se na Svalbardu se kontroluje. Do roku 1973 byl lední medvěd na Svalbardu loven pro svou kožešinu, ale od roku 1973 je již chráněn (Gulliksen, Svensen 2004).

Těžba uhlí: dnes se již těží uhlí na Svalbardu pouze na třech místech v Barentsburgu. V blízkosti Longyearbyenu a zejména u Svea (Gulliksen, Svensen 2004).

Turistický ruch se rozběhl až v poslední době, kdy se o Svalbardu píše hodně na internetu a také se mluví o něm v televizi. Provádí se zde mnoho výzkumů už víc jak 200 let, velký význam mají polární expedice, kterých se účastní studenti z vysokých škol (Gulliksen, Svensen 2004).

Zachování a ochrana životního prostředí

Svalbard má 28 chráněných přírodních rezervací - tedy 65 % území. Mezi největší chráněnou oblast patří Nordaustlandet, Kvitpya and Kong Karls Land. Nejmenší chráněným územím je Baretsoy a Edgeoya. Moffen je národní park v severozápadní části Spicberky, zde žije mrož a mnoho druhů ptáků. Většina savců a ptáků je zákonem chráněna. Jsou také chráněny všechny rostliny. Od roku 2003 je Bjørnøya také přírodní rezervací. Skalní útesy a nížinné mokřiny jsou útočištěm racků a dalších mořských ptáků (Gulliksen, Svensen 2004).

Na Svalbardu roste i přes drsné podmínky velké množství rostlin, které musí v létě stihnout odkvést. Roste zde i malé množství polárních bříz. Je zde hnízdiště několika druhů mořských ptáků a jeden druh pěvce, kteří sem migrují a v létě hnízdí. Na Svalbardu najdeme i suchozemské savce: lišku polární a soba špicberského. Žije zde 15 až 20 druhů mořských savců, včetně delfínů, velryb, medvědů ledních, tuleňů a mrožů. Také život na mořském dně je relativně bohatý, najdeme zde měkkýše, nohoštětinatce, ostnokožce, koryše, také ryby.
(<http://www.svalbard.cz/guide/bio.html#00>)



Obr. 1: Mapa Svalbardu bez ostrova Bjørnøya (Medvědí ostrov), který se nachází 120 námořních mil jižně od Sørkapp na Špicberkách. (Zdroj: webové stránky Norského polárního ústavu).

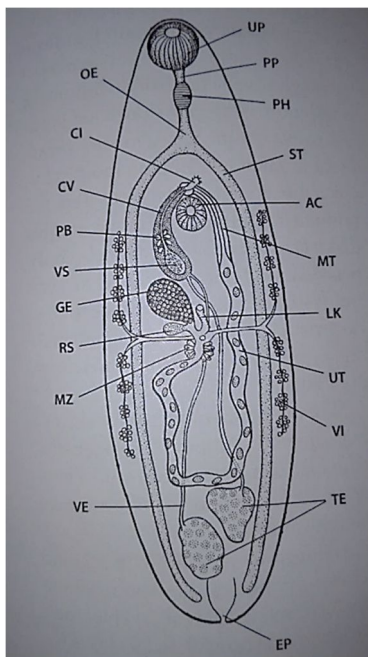
2. Helmiti

Helmiti jsou mnohobuněčné organismy, které parazitují u obratlovců i bezobratlých. Mezi helminty patří vzájemně nepříbuzní živočichové, společným znakem je, že jde o oboustranně souměrné protostomní živočichy. Mezi helminty patří zástupci neodermátních platyhelmitů (Trematoda, Cestoda, Monogenea), hlístice (Nematoda) a vrtějši (Acanthocephala). Dále sem patří také parazitické ploštěnky, vířníci, strunovci, pásnice či pijavky. Z pohledu ontogenetického vývoje jsou helminti velmi proměnlivou skupinou. Kromě dospělců a vajíček mohou mít i poměrně rozsáhlý počet morfologicky odlišných larválních stádií. Larvální stadia parazitují během ontogenetického vývoje i u meziphostitelů. Můžeme se setkat s cykly s jedním hostitelem, ale také s dvouhostitelskými nebo tříhostitelskými cykly. Definitivním hostitelem je organismus, ve kterém helminti pohlavně dospívají a jsou sexuálně aktivní. Meziphostitelem se rozumí živočich, ve kterém probíhá larvální vývoj helmintů (Volf, Horák a kol. 2007).

2.1. Třída Trematoda (motolice)

Jde o početnou skupinu, výhradně parazitických platyhelmitů. Zahrnuje až na výjimky endoparazity obratlovců se složitými vývojovými cykly, většinou s měkkýši jako prvními meziphostiteli. Parazitují ve všech orgánech, hlavně v trávicím systému, dále pak v dýchacích cestách, krevním řečišti, nervové soustavě, urogenitálním traktu, tělních dutinách atd. Menší množství druhů žije ektoparaziticky. Určité druhy mohou vyvolat závažná onemocnění hostitelů. Převážně jde o helminty s velikostí od několika desetin milimetru do několika centimetrů, některé motolice však dosahují délky až kolem 100 mm. Tělo je dorzoventrálně zploštělé, oválného či kopinatého tvaru a, obsahuje minimálně jednu (ústní) přísavkou, často i druhou (břišní) přísavku. Přísavky plní funkci přichycovací. U některých skupin přísavky chybějí nebo jsou nahrazeny jinými strukturami. Motolice jsou obvykle hermafroditi; výjimku tvoří gonochoristická čeleď Schistosomatidae a zástupci čeledi Didymozoidae. Na povrchu těla motolic

je syncytiální tegment, který v základní charakteristice je stejné struktury jako neodermis celé skupiny Neodermata. Ze syncytiálního tegmentu často vystupují na povrch různě veliké ostny, které jsou svrchu kryty vnější cytoplazmatickou membránou syncytia. Povrch kryje různě silný glykokalyx, nejvíce u druhů vyskytujících se v agresivním prostředí trávicího traktu, kde zastává především ochrannou funkci. Trávicí soustava je u většiny motolic dobře vyvinuta. Slouží k příjmu a zpracování potravy. Začíná ústním otvorem, obklopeným ústní přísavkou, který má také funkci vyvrhovací. Navazuje předhltan, svalnatý hltan, jícen a samotné střevo. To má většinou podobu jednoduchého vaku, končí dvěma slepými větvemi nebo se větve v zadní části spojují a vytvoří tak okruh. V některých případech se větve v přední části spojí a vytvoří jednu trubici nebo ze střeva mohou vybíhat postranní slepé výběžky, případně střední větve vyúsťují v zadní části těla ven. Určitou část živin přijímají motolice prostřednictvím povrchu těla a to i v případě, že mají dobře vyvinutý trávicí systém.



Obr. 2: Základní anatomie dospělé motolice (Volf, Horák a kol. 2007). EP - exkretční pór, TE – testes, VI – vitelária, UT – uterus, LK – Laurerův kanál, MT – metraterm, AC – acetabulum, ST – střevo, PH – larynx, UP – ústní přísavka, PP – prefarynx, OE – esofagus, CI – cirrus, CV – cirrový váček, PB – prostatické buňky, VS – vesicula seminalis, GE – germarium, RS – receptaculum seminis, MZ – Mehlisova žláza, VE – vas efferens

Pohlavní soustava u hermafroditických motolic obsahuje jak samčí, tak i samičí pohlavní orgány v jednom jedinci. Základní stavba odpovídá skupině neodermat. Varlata mají oválný nebo keříčkovitý tvaru. Obvykle jsou varlata po dvou, u některých druhů je pouze jedno, jiné druhy mají i desítky až stovky varlat. Samičí reprodukční soustava obsahuje Laurerův kanál. Ten také slouží k vyprázdnění přebytečného materiálu z ooypu do vnějšího prostředí. Děloha je zakončena tzv. metratermem, který slouží ke kopulaci. Vajíčka motolic mají různé tvary, většinou jsou oválná s víčkem, někdy obsahují na povrchu různé trny nebo filamenty. Uvedená charakteristika je společná pro obě podtřídy – *Aspidogastrea* a *Digenea*. Podtřída *Aspidogastrea* má jednoduché cykly, zatím co *Digenea* mají vždy komplexní cykly, zahrnující střídání generací a rozmnožování ve fázích larválního vývoje (Volf, Horák a kol. 2007).

2.2. Podtřída Digenea

Tato velká skupina zahrnuje motolice, které patří mezi medicínsky významné původce chorob člověka i zvířat. Mnoho druhů parazituje u ryb. Charakteristické je u nich umístění přísavky v přední a ventrální části těla. Digenetické motolice mají své vývojové cykly velmi komplikované, často využívají dva nebo více hostitelů. Larvální stádia se nepohlavně rozmnožují během ontogeneze. Následně infikují další hostitele a tím dochází ke střídání generací a hostitelů.

Ve vnějším prostředí nebo již v děloze dospělé motolice se vyvíjí první larva, tzv. miracidium v oplozeném vajíčku. V určitých případech, kdy dochází k nákaze prvního hostitele pomocí požití nakaženého hostitele, miracidium opouští vajíčko až v mezihostiteli; výjimečně se objevuje ve vajíčku již embryo mateřské sporocysty.

Miracidium má velikost zhruba 0,01-0,35 mm a podobá se nálevníkoví. Miracidium, které se uvolní z vajíčka ve vodě, aktivně vyhledává mezihostitele. Nepřijímá potravu a během několika hodin spotřebuje své energetické zásoby. Aby se dobře orientovalo v prostředí, tak využívá různé receptory, kterými rozpoznává molekuly vylučované plžem, světlo a směr gravitačního pole. Chování a výskyt miracidii tak často vzájemně souvisí s výskytem mezihostitelů v prostředí a zvyšuje se tím pravděpodobnost kontaktu. Mezi první mezihostitele patří měkkýši, ve většině plži, méně mlži. Většinou je jeden druh motolic schopen vyvíjet se pouze v jednom či několika málo příbuzných druzích měkkýšů.

Mateřská sporocysta má podobu jednoduchého oválného či protáhlého váčku, který obsahuje zárodečné buňky. Tyto larvy přijímají živiny pomocí povrchového tegment, který je v těsném kontaktu s tkáněmi a tělními tekutinami. Příjem potravy je zajištěn tegmentem, protože sporocysty nemají střevo. Další generace larev, se vyvíjejí ze zárodečných buněk. Larvy se uvolní po prasknutí stěny mateřské sporocysty nebo porodním otvorem. Touto generací podle druhu je dceřiná sporocysta nebo redie.

Dceřiné sporocysty mají většinou oválný, protáhlý až vláskovitý tvar, obvykle jsou i rozvětvené. Většinou se nachází v hepatopankreatu. Tyto sporocysty obsahují zárodečné buňky, z těchto buněk vznikají další generace dceřiných sporocyst. Dochází k rozmnožení parazita, ten pak postupně proniká do tkání celého hepatopankreatu. V určité fázi začínají dceřiné sporocysty produkovat larvy tak zvané cercárie. Cercárie se stávají zdrojem infekce pro dalšího hostitele.

Některé motolice mají na místo dceřiných sporocyst redie. Na rozdíl od dceřiných sporocyst obsahují trávicí soustavu s vakovitým střevem a živí se tkáněmi mezihostitele, popř. vývojovými stadii jiných druhů motolic. Živí se nejen pomocí trávicí soustavy, ale také povrchem těla. Obvykle následuje vývoj několika generací redií a poté dochází k vývoji cercárií. Výsledkem asexuálního

rozmnožování uvnitř mezihostitele je nakonec velké množství cercarií u určitých druhů až desítek tisíc denně. Z každé cercárie může potenciálně vytvořit jeden dospělý jedinec, motolice.

Cercárie mají velikost od několika desetin milimetru až přes 1 mm. Většinou opouštějí tělo prvního mezihostitele, jsou vylučovány, buď aktivně, nebo pasivně a následně infikují dalšího hostitele. Cercárie se skládá z těla a ocásku a má již vyvinutou trávicí soustavu, ale ta není funkční. Cercárie obsahují penetrační žlázy obsahující především látky, které mají funkci přichycovací a narušují povrch těla hostitele, do kterého následně migrují. Cercárie vyhledávají hostitele pomocí smyslových orgánů a pomocí těch se také orientují v prostředí. Sezónní distribuce a denní vrchol výskytu cercarií je často ve vzájemném vztahu s aktivitou dalších hostitelů v průběhu dne a jejich lokalizaci v prostředí. Cercárie se pohybují ve vodním prostředí pomocí ocásku. U druhů, které mají suchozemské cykly, bývá ocásek redukován. Při encystaci nebo při přímé infekci hostitele je ocásek odhazován.

Další osud cercarií závisí na skupině motolic, na životním cyklu a způsobu přenosu na dalšího hostitele. U nejjednoduššího dvouhostitelského cyklu zůstávají cercárie uvnitř sporocysty a dále se vyvíjejí do stadia metacercárie; následně je metacercárie uvnitř měkkýše pozřena spolu s ním, definitivním hostitelem. Častěji jsou cercárie uvolňovány do vnějšího prostředí. Některé druhy poté přímo pronikají do definitivního hostitele, kde se z nich vyvíjejí dospělí jedinci. Cercárie některých druhů, obvykle s dvouhostitelskými cykly přisedají na pevný podklad, odpadá ocásek a pomocí cystotogenních žlázek utvoří kolem sebe pouzdro neboli cystu, která je odolná vůči vlivům vnějšího prostředí. Vzniká tzv. metacercárie. Metacercárii pozře definitivní hostitel, ve kterém se vyvíjí v dospělou motolici.

Motolice některých druhů s tříhostitelskými cykly, tvoří cercárie, které aktivně pronikají do druhého mezihostitele, jiné jsou pozřeny. V mezihostiteli se

mění v metacerkárie, ty se buď zapouzdří, nebo zůstávají volné. Druhého mezihostitele pozře definitivní hostitel, ve kterém se z metacerkárie vyvíjí dospělá motolice. Metacerkárie se může vyvíjet v dospělého jedince, zvětšením plaménkových buněk, vývojem pohlavních orgánů a dalšími morfogenetickými procesy. Cysty metacerkárií mají povrchové vrstvy a ty jsou polysacharidové a skleroproteinové povahy, jejich stěna je odolná a metacerkárie pomocí těchto povrchových vrstev mají schopnosti přežívat v prostředí nebo v mezihostiteli dlouhou dobu.

U některých motolic se v cyklu vyskytují stádia mezocerkárie, ty se podobají cercariím. Mají silně vyvinuté penetrační žlázy, ty využívají k migraci tělem hostitele. Mezocerkárie se mohou hromadit v paratenických hostitelích, kteří se živí mezihostitelskými organismy. Ti se pak stávají zdrojem silné infekce pro dalšího hostitele.

U motolic se čtyřhostitelskými cykly se metacerkárie vyvíjejí ve třetím mezihostiteli a v definitivním hostiteli pak vzniká dospělec. Metacerkárie se vyskytují v trávicím traktu definitivních hostitelů na základě působení exogenních a endogenních faktorů. Vývoj v definitivním hostiteli je různě dlouhý, např. několik hodin až několik měsíců. Nejrychleji se vyvíjí motolice těch druhů, jejichž metacerkárie se výrazně vyvinuli v druhém mezihostiteli a mají již zřetelně vyvinuté základy pohlavních orgánů. U některých motolic se vyvíjejí progenetické metacerkárie, kterým plně dozrávají pohlavní orgány jen v druhém mezihostiteli (Volf, Horák a kol. 2007).

2.3. Gymnophallidae

Jde o malou skupinu motolic vyskytujících se ve střevě, žlučníku a tkáních úzkého spektra mořských ptáků řádů Charadriiformes a Anseriformes. Dva druhy z čeledi Gymnophallidae, *Gymnophalloides sei* Lee, Chai a Hong, 1993 a *G. heardi* Ching,

1995, byly popsány ze savců (Scholz 2002). Většina druhů čeledi Gymnophallidae neinfikuje člověka kromě *Gymnophalloides seoi* a *G. tokiensis*. Byly pozorovány epigastrické potíže u pacientů, kteří konzumovali syrové ústřice. Pacienti vylučovali dospělé motolice *Gymnophalloides seoi* (Yanagida a kol. 2009).

Motolice čeledi Gymnophallidae mají prvního mezihostitele mlže, vyskytujícího se na mořském pobřeží. Jejich metacerkárie mohou způsobovat různá onemocnění. Produkty parazita negativně ovlivňují metabolismus hostitele. Příslušníci čeledi Gymnophallidae mohou měnit chování hostitele, například v orientaci infikovaného mlže nebo zpomalením jeho pohybu. Tyto změny v chování mohou zvýšit dostupnost mlžů pro predátory, kteří jsou definitivními hostiteli. Jsou však dostupnější i pro jiné predátory, kteří významně snižují jejich počty (Addino a kol. 2009).

Motolice čeledi Gymnophallidae jsou malé až miniaturní motolice. Tělo je oválné až hruškovité. Tegument, je pokryt s ostrými, jednoduchými nebo širokými pilovitými ostny, které pokrývají většinu z povrchu těla, výjimkou je břišní přísavky a genitálního póry. Ústní přísavka je subterminálně uložená. Ventrální přísavka se nachází v polovině délky nebo v zadní třetině těla. Hltan může zcela chybět. Jícen u některých druhů Gymnophallidae chybí nebo je krátký. Střevo je krátké, ukončeno je slepě. Varlata jsou dvě, symetrické nebo lehce šikmé. Semenné vajíčky jsou přítomny, dělené nebo nerozdělené. Obsahují cirrový váček, ten může chybět. Obsahují krátkou ejakulační trubici, genitální atrium. Otvory mohou být obklopeny svalovými vlákny. Vaječník se obvykle nachází vpředu před varlaty. Laureův kanál, je přítomen. Vitellarium je párové nebo jednoduché. Děloha tvoří smyčky. Vajíčka jsou malá. Vylučovací kanálky jsou do tvaru V- nebo ve tvaru Y. Vylučovací sběrný kanálek je krátký. Vylučovací otvory jsou terminálně uloženy (Scholz 2002).

Délka těla a maximální šířka 196 až 339 × 148-198. Ústní přísavka s bočními výstupky 62 až 84 × 72-88. Břišní přísavka 29-43 × 33 až 41 na 1/3 až 1/4 délky těla od zadního konec. Poměr délky a šířky je 1: 2,1-2,2. Břišní prohlubeň. Genitální pór je relativně široká štěrbin, vpředu od břišní přísavky. Dvě varlata, oválná, 43-78 × 40

až 83, u zadní břišní přísavky. Vaječníky jsou okolo 35 až do 81× 33-48, jedno varle je posunuto mírně dopředu. Vitellaria jsou kompaktní a mírně laločnatá, měří 25-46 × 20 až 43, v blízkosti břišní přísavky. Děloha zabírá zadní polovinu nebo 2/3 celého těla. Vajíčka 20-27 × 11 - 22. Močový měchýř je ve tvaru V (Yanagida a kol. 2009).

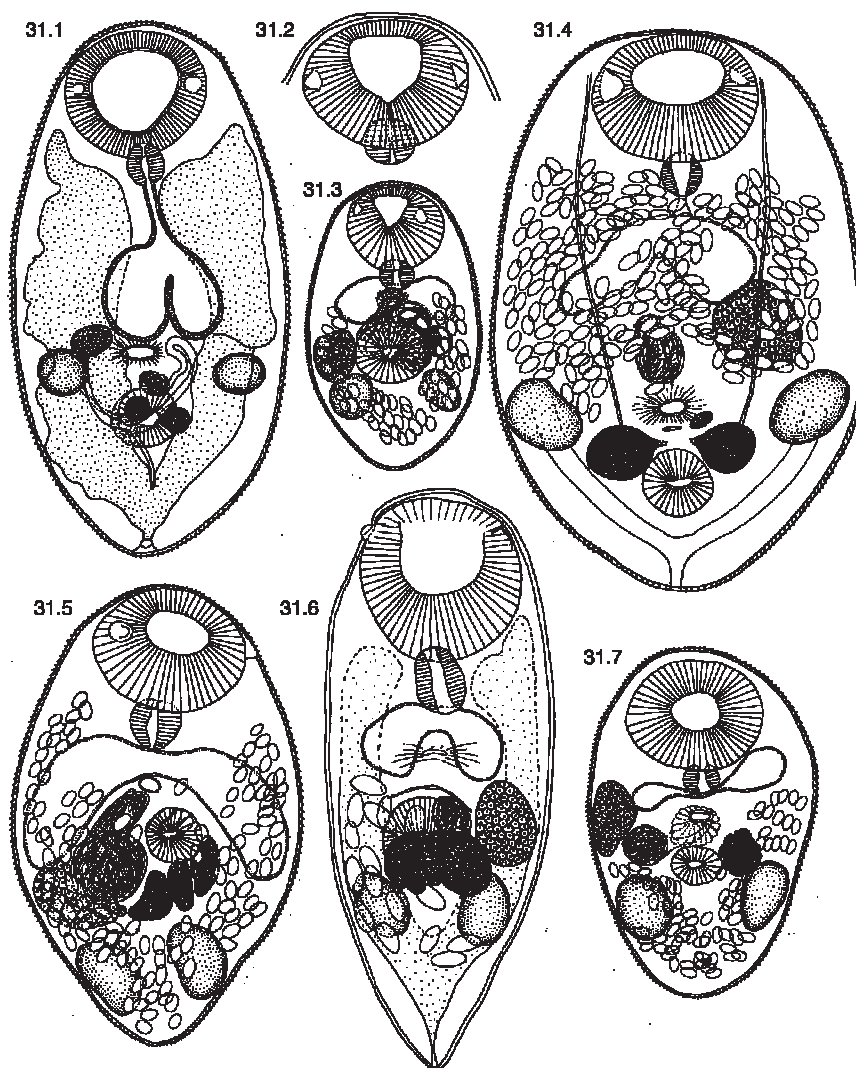
Součástí prvního stupně životního cyklu gymnophalidních motolic je cercárie. Ta infikuje měkkýše. Metacercárie gymnophalidních motolic jsou ve druhém mezihostiteli, kterými mohou být mlži, mnohoštětinatci, výjimečně plži či ramenonožci (Scholz 2002). Druhý mezihostitel má širokou škálu genotypů a hromadí se v něm geneticky různé metacercárie (Leung a kol. 2008). Metacercárie neencystují. Metacercárie v mlži se dále rozmnožují a vytvářejí se dceřiné metacercárie. Konečným mezihostitelem je vodní pták, například kajka (Scholz 2002).

Larvy Gymnophallidae vyvolávají imunitní reakci u hostitelů pomocí destrukce haemocytů, což spustí zánětlivou reakci. Gymnophallidae napadají různé tkáně. Pokud se rozvíjejí v gonádách, způsobují u hostitele kastraci, čímž brání normální gametogenezi a reprodukci (da Silva a kol. 2009).

Jeden z nejsložitějších životních cyklů mezi motolicemi má *Parmotrema margaritense* (Gymnophallidae), která má partenogenetické metacercárie. Experimenty s přirozeně infikovanými plži *Margarites helycinus* prokázaly, že cercárie uvolněné z plžů napadli mlže, aby se vytvořily metacercárie.

Dvě generace (M1 a M2) těchto partenogenetických metacercárií byly vytvořeny v extrapallialních dutinách mlžů a ty na oplátku daly vzniknout třetí generaci (M3), které pak infikovaly mořské kachny, jako je kajka (*Somateria mollissima*). Začlenění partenogenetické metacercárie v životním cyklu je zvláště významné. Umožňuje každé cercárii, která infikuje *Margarites helycinus*, dát vzniknout více než 2000 invazivním metacercáriím. Partenogenetické metacercárie žijí komenzálně v pallialních dutinách hostitele. V současné době je známo několik druhů gymnophallidů, které mají v životním cyklu partenogenetické metacercárie. Mezi ně patří *Parvatrema homoeo-tecnum* James, 1964, *P. margaritenese*, *Cercaria*

quadriramis Chubrik, 1966 a *Gymnophallus australis* Szidat, 1962. Partenogenetické metacerkárie jsou dodatečnými stádii životního cyklu umožňující klonální množení dalších infekčních stádii. Tohle je zvláště důležité pro druhy, které infikují malé pobřežní plže jako prvního mezihostitele. Ve srovnání s jinými motolicemi, Gymnophallidae učinili významný evoluční pokrok od prostého kolonizování a množení ve druhém mezihostiteli. Gymnophallidní motolice jsou ve stádiu metacerkárie schopny využít svých ústních přísavek a slepého střeva, aby aktivně přijímaly potravu a požíraly hostitelské tkáně. Tím se liší od většiny metacerkárií digeneí, které jsou závislé na svých hostitelských měkkýších, jejichž metabolity získávají pouze pomocí tegumentu. Doba, po kterou gymnophallidní metacerkárie mohou požírat tkáně hostitele, není nijak omezena a to by mohlo být důvodem, proč upřednostili partenogenetickou reprodukci (Galaktionov a kol. 2006).



Obr. 3: motolice čeledi Gymnophallidae (zdroj: Scholz 2002). **31.1.** *Gymnophalloides tokaiensis* Fujita 1925. Hřbetní pohled. (neotyp; USNPC 60899); **31.2, 31.3.** *Gymnophalloides heardi* Ching, 1995. **31.2.** Ústní přísavka s bočními výstupky. (Paratyp; USNPC 83872); **31.3.** Ventrální pohled. (Paratyp; USNPC 83872); **31.4.** *Gymnophalloides seoi* Lee, Chai a Hong 1993. Ventrální strana (Paratyp; USNPC 82478); **31.5.** *Gymnophalloides macomae* (Lebour, 1908) Hřbetní pohled. (Paratyp; USNPC 72252); **31.6.** *Parvatrema borealis* Stunkard & Uzmann 1958. Ventrální strana. ("typ nebo cotype" (vzorek není určen); USNPC 56235); **31.7.** *Parvatrema borinquenae* Cable 1953. Ventrální pohled. (Holotyp; USNPC 47875).

2.4. Hostitelé

Mya truncata

Mya truncata má robustní lasturu. Zadní část lastury není zaoblená jako u jiných příbuzných druhů, ale tuto část má zkrácenou. Okraje lastury jsou mírně rozevřené. Vnitřní vaz je tvořen chondrophorem. Vyskytuje se v severní části severní polokoule, v Evropě od Biskajského zálivu až po Arktidu. Dále ji také najdeme na Britských ostrovech. Celý svůj život žije v hloubce do 30 m zahrabaná do sedimentu. Jednotlivci dosahují věku kolem 10-12 let (Moen 2004).



Obr. 4: *Mya truncata* (zdroj: Moen 2004)

Hiatella arctica

Tento měkkýš má také rozevřenou lasturu, nepravidelně obdélníkového tvaru a bílé barvy. Část měkkých tkání, vyčnívá ven z lastury. Délka lastury je kolem 10 mm. Hřbetní část je výrazně zešikmená. Vyskytuje se v Evropě, od Středomoří až po Arktidu. Dále se nachází na Britských ostrovech. Vyskytuje se v mělkých vodách. Mlže *Hiatella arctica* najdeme v severních evropských vodách v hloubce 20-150 m, většinou zaklíněné ve skalních štěrbinách, mezi kameny nebo mezi řasami (Moen 2004).



Obr. 5: *Hiatella arctica* (Moen 2004).

Kajka mořská (*Somateria mollissima*)

Kajka *Somateria mollissima* se vyskytuje v arktických částech severní polokoule. Najdeme ji v severní Americe, podél severního pobřeží Kanady a po celém pobřeží Aljašky a Aleutských ostrovech. V Evropě se vyskytuje v Pobaltí, Británii, Nizozemsku, severní Francii a Grónsku. Najdeme ji také v severovýchodní Asii (Anker-Nilssen a kol. 2000).

Populace *Somateria mollissima* se odhaduje na 2-3 miliony. *Somateria mollissima* často hnízdí v koloniích, převážně na malých pobřežních ostrůvcích. Snáší kolem 3-6 vajec. *Somateria mollissima* se živí mlži, pro které se potápí v hejnech do hloubky 10 m, ale může se potopit do hloubky až 40 m (Anker-Nilssen a kol. 2000).

Somateria mollissima hnízdí většinou na pobřeží Barentsova moře, Bílého moře, na Svalbardu, včetně Bjørnøya na souostroví Nová Země. Podél norského pobřeží *Somateria mollissima* hnízdí, dále také v blízkosti rybářských vesnic a jiných osídlení, často v umělých úkrytech. Na Svalbardu hnízdí a vyvádí mladé, hnízdí zde okolo 120 000 a 150 000 párů (Anker-Nilssen a kol. 2000).

Somateria mollissima je všežravec, živí se měkkými, ostnokožci, mnohoštětinatci a koryši. Stravu si vybírají podle obsahu energie. Výběr potravy dále ovlivňuje také fyzická kondice, ale také zimní či jarní období (Anker-Nilssen a kol. 2000).

Kajky *Somateria mollissima* ohrožuje racek napadáním jejich hnízd a predací vajec. Dále je ohrožují lidé, kteří je loví. Dále také těžba ropy je velmi ohrožuje a to prostřednictvím mlžů, kteří jsou zasaženi ropou. Kajky sní dně kolem 2 kg mlžů. Na Svalbardu a na souostroví Nová Země, Vajgač a Yugorski poloostrově jsou ohroženy především šedivými racky, polárními liškami a ledními medvědy, kteří jsou účinnými predátory především pro hnízda kajek. Dále draví ptáci, jako je orel mořský *Haliaetus albidilla* často zabíjejí kajky na norském pobřeží. Ze zavlečených dravců to je norek *Mustella*, který je hrozbou pro hnízda *Somateria kajek* na pobřeží Norska a zbytku Scandinávskeho poloostrova (Anker-Nilssen a kol. 2000).



Obr. 6: Kajka mořská (*Somateria mollissima*) (zdroj: Anker-Nilssen a kol. 2000)

3. Molekulární diagnostika

Fixace a extrakce DNA

Dříve se uchovávala DNA parazita v suchém ledu. Ten se později ukázal jako nevhodný, protože ho nelze použít v tropických pásmech a při dlouhé přepravě sublimuje. Proto se začal používat TNES močovinový pufr, jak pro konzervaci, tak také pro extrakci DNA. Vzorky v tomto pufru vydrží nepoškozené měsíc až 3 roky, při pokojové teplotě (Asahida a kol. 1996).

Taxonomie parazitů a patogenů je u některých druhů známá velice dobře. Lze je identifikovat pomocí morfologie. Ale ve většině případů, například u jednobuněčných parazitů to nelze, a proto je potřeba využít molekulární metody.

Volba metody je velmi důležitá. Nejjednodušší metodu použijeme, když chceme získat takzvaný otisk genetického materiálu. A tento otisk můžeme poté porovnat s údaji jiných organismů. Tyto metody jsou levné a umožňují matematicky zjistit podobnost organismů. Dnes se již nepoužívají z důvodu jejich malé výpovědní hodnotě, dále špatný odhad vztahu mezi organismy a neurčují zcela přesně taxonomickou určitost (Janko 2013).

Purifikace nukleových kyselin

Kvalita izolovaného materiálu často rozhoduje o úspěšnosti celé metody. Cílem purifikačních procesů je získat velké množství čisté nukleové kyseliny v nativní formě. Správný výběr purifikační metody DNA nebo RNA záleží na další analýze. DNA, která bude určena k hybridizaci nesmí obsahovat glykogen, proteiny, ionty kovů, z toho důvodu, že mohou bránit vzniku dvouvláknové DNA komplementárním spojením dvou jednořetězcových DNA. Záleží také na množství nukleové kyseliny. Větší množství materiálu je potřeba pro genetickou analýzu.

Zdrojem DNA jsou např. rostlinná pletiva, bakteriální kultury, eukaryotické buňky, virové částice, buněčné organely. Hlavním úkolem je uvolnit vnitřní obsah buněk a to se provádí pomocí lyzi buněčné stěny. Stěny bakteriálních buněk se většinou rozrušují lysozymem a mechanickou dezintegrací. U buněk, které nemají buněčnou stěnu, se používají jemnější metody např. slabé neiontové detergenty. Po zničení buněčné stěny a plazmatické membrány, se v roztoku objeví nitrobuněčné složky buňky. Aby se zachovala izolovaná DNA, musí se použít co nejjemnější lyze buněk a musí se udržovat lyzační směs v pufovaném médiu a chladu. Přečištění DNA se dělá pomocí enzymu, pomocí enzymu ribonukleázy se odstraní RNA.

DNA se může extrahovat pomocí fenol-chloroformu, který odstraní proteiny z buněčného lyzátu. Srážení nukleových kyselin alkoholem je další postup po extrakci DNA pomocí fenol-chloroformu. Máme roztok nukleových kyselin bez proteinů, ale tento roztok je příliš naředěn a obsahuje stopy fenolu. Z tohoto důvodu se vysráží nukleové kyseliny alkoholem např. isopropanolem.

Alkalická denaturace – tato metoda se používá pro oddělení plazmidu od chromozomové DNA v extraktu bakteriálních buněk. Zvýšením pH se přeruší vodíkové vazby mezi nukleotidami a oddělují se lineární řetězce neboli dochází k denaturaci DNA.

Dále můžeme použít: Purifikaci nukleových kyselin pomocí chromatografie. Pokud máme purifikovanou DNA dostatečně čistou, tak měříme její koncentraci pomocí spektrofotometru. Pokud DNA není dostatečně čistá tak přítomnost fenolu a proteinů bude vychylovat správnou koncentraci DNA. (Šmarda a kol. 2005)

Metoda multilokus DNA fingerprinting

Mezi tyto metody řadíme multilokus DNA fingerprinting. Tato metoda je založena na fragmentaci celé genomické DNA, jedním či více restrikčními enzymy. Zjištěný restrikční profil pomocí různě dlouhých fragmentů DNA je charakteristický pro daný taxon nebo jedince. Tato metoda je obtížná z toho důvodu, že výsledkem jsou miliony fragmentů DNA. Z toho důvodu se dále využívají další metody, které vizualizují jen některé fragmenty, a z těch pak identifikujeme, o jaký jde taxon.

Nejzákladnější metodou je elektroforéza, která rozdělí jednotlivé fragmenty podle délky. Dále se na tyto fragmenty přidávají DNA sondy (fluorescenční nebo radioaktivní), které mají určitou sekvenci. Tím se sníží počet DNA fragmentů na ty, které se přichytila sonda (Janko 2013).

Metoda Random-amplified polymorphic DNA-RAPD

Mezi další metodu patří Random-amplified polymorphic DNA-RAPD. Tato metoda je založená na principu získat fingerprint daného taxonu RAPD metodou, která je založena na PCR. Používá se krátký primer o délce 10ti nukleotidů. Studovaný genom obsahuje sekvence, které jsou v dostatečné blízkosti k našim primerům. Poté co nasedá na toto místo náš primer, tak se spouští PCR reakce. Výsledky z proběhlé PCR se použijí na určení určitého taxonu (Janko 2013).

Metoda amplifikace fragment Length Polymorphism – AFLP

Metoda amplifikace fragment Length Polymorphism – AFLP, je využívána především v botanice. Nejprve se nefragmentuje studovaná genomická DNA, pak jsou všechny fragmenty ligovány syntetickým oligonuklidem o známé sekvenci. Používané primery při této metodě mají na svém konci o jeden, dva nebo tři báze více. Tímto lze pak získat druhové specifické taxony.

Výsledky těchto metod se hodnotí pomocí podobnosti získaných profilů UPGMA, Neighbor Joining a další. Výhodou těchto metod je, že jsou získané multilokusová informace a porovnává se celý genom. Nevýhoda je, pokud se vyskytne nějaký rozdíl, tak nevíme, o jaký lokus jde a co způsobilo tento rozdíl (Janko 2013).

Sekvenční metoda

Lepší metoda, která se používá k dopátrání druhové příslušnosti, je sekvenční metoda. Využívá se zde Sangerova sekvenování, buď se využívá klonování nebo lokusové specifikace PCR pomocí, kterého se izoloval určitý úsek DNA. Tento úsek

se poté osekvenoval. Do PCR reakce se přidaly fluorescenční mediátory, které značily konec určitého úseku DNA. Amplifikované fragmenty DNA se pak pustili na elektroforézu, kde se rozdělili podle délky. A tím se určily jednotlivé báze v určitém úseku DNA. Tímto postupem získáme detailní sekvenci určitého genu, který se poté srovnává se, se světovou databází sekvencí (Janko 2013).

Milióny životních etap a transformací, dělají sekvenování těžší. Řešení této rozmanitosti se našlo v cytochrom oxidaze c 1 (COI). Sekvence tohoto mitochondriálního genu umožňuje určit jednotlivé organismy (Hebert a kol. 2003).

Barcoding

Barcoding zavedl Herbert spolu se spolupracovníky z University of Guelph v Kanadě v roce 2003 (Trivedy a kol. 2016). Barcoding patří do projektu „barcoding of life“. Tento projekt využívá klasické sekvenování s mitochondriálními lokusy a to zejména s Cytochrom oxidázou I (CoxI) a 12sRNA geny. Touto sekvencí poté máme velkou možnost identifikovat čeleď, rod, či druh a srovnat ho s databází (Janko 2013). Tato sekvence se vyskytuje u ptáků, krevet, ryb, želv, ústřic, savců, pavouků, komárů, klíšťat atd. Barcoding se také používá pro určení druhů okvětních lístků, které opilovávají určitý druh včel (Maclvor 2016). Dále pomocí barcodingu můžeme určit mutaci DNA nebo určitého genu (Stählberg a kol. 2016).

DNA barcoding se může použít pro zjišťování biologické rozmanitosti moří a ochraně ekosystému a moří (Trivedy a kol. 2016). Nejznámější použité čárové kódy DNA jsou ITS a ITS2. ITS byla navržena jako DNA čárového kódu, protože se vyvíjí 3-4 krát rychleji než v plastidových oblastech, a to bylo úspěšně použito v mnoha fylogenetických studiích. Krátká jaderná oblast (300 bp) z ITS2 byla navržena jako nový DNA čárový kód. ITS2 je upřednostňován jako čárový kód, protože může být zesílen pomocí univerzálního primeru a snadno se poté sekvenuje DNA parazita (Liu a kol. 2016).

Bohužel nevýhoda této metody je taková, že je zaměřena na jeden či pár lokusů. Při hybridizaci parazitů pak nemusíme určit správnou DNA. Proto se začíná sekvenovat více lokusů pro větší přesnost. Tímto je tato metoda cenově náročnější (Janko 2013). Barcoding byl nově použit pro pozorování jednotlivých buněk, které tvoří tělo jedince. Čárový kód se přenesse na buňky a nové vyvíjející se buňky z mateřské obsahují také určitý čárový kód, který byl přidělen mateřské buňce. Podle této metody můžeme pozorovat buňky v různých tkáních a v určité časové období pomocí sekvence přiděleného čárového kódu (Beltman a kol. 2016).

Deseti násobek rozdílných sekvencí mezi průměrnými mezidruhovými a vnitrodruhovými rozdíly byly navrženy jako standardní COI práh pro identifikaci živočišného druhu (Hebert a kol. 2003). Mezidruhové a vnitrodruhové odlišnosti se určují podle vzdálenosti K2P (Kimurův 2-parametrový model) a p-vzdálenosti (podíl rozdílných nukleotidů) (Shen a kol. 2016).

Next-Generatrion-Sequencing (NGS)

Nejnovější metoda sekvenování, která dokáže osekvenovat celý genom, ale také určité části genů u více vzorků (Janko 2013). Tato metoda se používá k mapování celého genomu jedince. Každá báze v genomu určitého jedince se sekvenuje víckrát, poskytuje velmi přesné údaje a poskytuje náhled do různých DNA variací. NGS může být použita pro celé genomy nebo omezena na konkrétní oblasti v genomu. Dále se také může použít pro celou škálu genů daného jedince. Tato metoda se dá využít ke stanovení malého počtu jednotlivých genů. (Behjaty a kol. 2013) Tato metoda je schopná za jediný den získat více než tisíckrát větší počet párů bazí než nejvýkonější sekvenátory. (Macholán 2014)

Molekulární markery

Vnitřní přepisované mezerníky (Internal Transcribed Spacer, ITS) jsou součástí genové ribozomální DNA (rDNA), která je důležitá pro všechny živé organismy a

představuje jeden z nejpoužívanějších molekulárních markerů ve fylogenetických analýzách. Díky variabilitě na úrovni sekvence DNA je vhodná k rozlišení blízké příbuzných druhů nebo dokonce poddruhů. Cytochrom oxidáza I (COI) je mitochondriální gen který slouží pro identifikaci živých organismů.

Fylogenetický analýza

Základem fylogenetické analýzy je datový soubor, který je nazývá jako data. Tento soubor obsahuje informace o jednotlivých objektech, např.: virové kmeny, druhy, vyšší taxonomické jednotky (rody, kmeny, řády atd.). V případě molekulárních dat se jedná o soubor, který obsahuje seřazené sekvence DNA. Sekvence znázorňují jednotlivé úseky a konkrétní báze. Molekulární data mohou představovat nukleotidy, aminokyseliny. Fylogenetická analýza se vyznačuje prostřednictvím fylogenetického stromu. Fylogenetický strom se skládá z uzlů a jednotlivých větví. Větve představují délky a váhy (čas, počet změn). Tento strom dále obsahuje také kmen, který znázorňuje společného předka pro všechny objekty (taxony). U fylogenetické analýzy máme data ve formě vzdáleností, které nám udávají podobnost. Nejčastějšími daty pro sestavení fylogenetického stromu jsou nukleotidové a proteinové sekvence. Výsledné fragmenty DNA jsou osekvenovány a sestaveny do výsledné sekvence. Pro sekvenci celého genu se proto používá fylogenetická analýza (Macholán 2014). Fylogenetická analýza se skládá pomocí databází nukleotidových sekvencí. Např. GenBank, EMBL, DDBJ (Macholán 2014).

Klonování DNA

Klonování DNA je jednou z nejdůležitějších metod molekulární biologie. Klonování je proces, kdy se vytváří molekulární klony. Klon je soubor stejných buněk, které vznikly z jedné buňky, která vznikla u eukaryot při mitóze a u prokaryot při prostém dělení. Klonování DNA je tvorba klonů fragmentů DNA namnožením v hostitelské buňce. Dále se dají klony DNA vytvořit také pomocí PCR reakcí. Rekombinantní molekulou DNA se nazývá taková molekula, která byla vytvořena za

pomoci cizí DNA. Klonovací vektor je molekula DNA, která přijme cizorodou DNA a dále se replikuje v hostiteli. Hlavní oblasti využití klonování: izolace, studium, struktura a funkce genů. Studium regulačních oblastí, které mají za úkol řídit expresi genů. Klonování je také velmi významné pro genové inženýrství, které má za úkol vytvářet nové geny a zavádět je do genomu organismům a tím jim pomáhat doplnit svojí genetickou výbavu. Tím by se stali rostliny odolné vůči škůdcům a herbicidům. Klonování zahrnuje 3 základní kroky: připravit rekombinantní molekulu DNA, dále jí přenést do hostitelské buňky a následně selekci klonů, které budou obsahovat rekombinantní DNA. (Šmarda a kol. 2005)

4. Hypotézy

H1: Metacerkárie z mlžů *Mya truncata* a *Hiatella arctica* jsou též druh.

Neprokázáno.

H2: Metacerkárie z mlžů *Hiatella arctica* jsou totožné s motolicemi čeledi Gymnophallide ze střeva kajky *Somateria mollissima*. **Neprokázáno.**

H3: Metacerkárie z mlžů *Mya truncata* jsou totožné s motolicemi čeledi *Gymnophallidea* ze střeva kajky *Somateria mollissima*. **Prokázáno.**

5. Materiál a metody

5.1. Materiál

Vzorky motolic, které jsem ve své práci zpracovala, byly odebrány během expedice Centra polární ekologie PřF JU v letech 2010 a 2014. Všechny vzorky motolic byly již izolované z tkáně mlžů *Mya truncata*, *Hiatella arctica* a kajky mořské (*Somateria mollissima*). Vzorky motolic pro následné zpracování molekulárně taxonomickými metodami byly uloženy v etanolu a byly zpracovány postupně (Tab. 1, Tab. 2) různými metodami extrakce DNA.

5.2. Metodika

Izolace jedné motolice

V etanolu fixované motolice jsem nejprve pročistila od hostitelské tkáně postupnou výměnou etanolu za nový. Pracovala jsem za pomoci Pasteurovy pipety a veškerou práci kontrolovala stereomikroskopem. Pro další postup jsem motolice rozdělila do jednotlivých mikrozkušavek (většinou bylo ke každému jedinci hostitele k dispozici

2–6 jedinců motolic fixovaných v etanolu). Převážnou část etanolu jsem následně pomocí automatické pipety odsála. Zbytek etanolu jsem nechala odpařit v suché lázni (při 37 °C) nebo vakuovém koncentrátoru Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Německo) s nastavením vacufuge při 45 °C.

Tab. 1: První sada vzorků metacerkárií z *Mya truncata* a *Hiatella arctica*

Kód DNA	Kód hostitele	Hostitel
CS 1	A524	<i>Mya truncata</i>
CS 2	A333	<i>Mya truncata</i>
CS 3	A265	<i>Hiatella arctica</i>
CS 4	A456	<i>Mya truncata</i>
CS 5	A470	<i>Mya truncata</i>
CS 6	A453	<i>Mya truncata</i>
CS 7	A265	<i>Hiatella arctica</i>
CS 8	A456	<i>Mya truncata</i>
CS 9	A333	<i>Mya truncata</i>
CS 10	A744	<i>Hiatella arctica</i>
CS 11	A872	<i>Mya truncata</i>
CS 12	A453	<i>Mya truncata</i>
CS 13	A257	<i>Mya truncata</i>
CS 14	A333	<i>Mya truncata</i>
CS 15	A883	<i>Hiatella arcica</i>
CS 16	A749	<i>Hiatella arctica</i>
CS 17	A524	<i>Mya truncata</i>
CS 18	A523	<i>Mya truncata</i>

Tab. 2: Druhá sada vzorků metacerkárií z *Mya truncata* a *Hiatella arctica* a juvenilní motolice z *Somateria mollissima*

Kód DNA	Kód hostitele	Hostitel
S1	A333/1	<i>Mya truncata</i>
S2	A333/2 (CS2)	<i>Mya truncata</i>
S3	A333/3 (CS14)	<i>Mya truncata</i>
S4	A333/4 (CS9)	<i>Mya truncata</i>
S5	A524/1 (CS1)	<i>Mya truncata</i>
S6	A524/2 (CS17)	<i>Mya truncata</i>
S7	A456/1	<i>Mya truncata</i>
S8	A456/2 (CS4)	<i>Mya truncata</i>
S9	A456/3 (CS8)	<i>Mya truncata</i>
S10	A470/1	<i>Mya truncata</i>
S11	A470/2	<i>Mya truncata</i>
S12	A470/3	<i>Mya truncata</i>
S13	A470/4	<i>Mya truncata</i>
S14	A470/5 (CS5)	<i>Mya truncata</i>
S15	A453/1 (CS6)	<i>Mya truncata</i>
S16	A453/2 (CS12)	<i>Mya truncata</i>
S17	A872/1	<i>Mya truncata</i>
S18	A872/2	<i>Mya truncata</i>
S19	A872/3	<i>Mya truncata</i>
S20	A872/4	<i>Mya truncata</i>
S21	A872/5 (CS11)	<i>Mya truncata</i>
S22	A257/1 (CS13)	<i>Mya truncata</i>
S23	A523/1 (CS18)	<i>Mya truncata</i>
S24	A265/1	<i>Hiatella arctica</i>
S25	A265/2	<i>Hiatella arctica</i>
S26	A265/3	<i>Hiatella arctica</i>

Tab. 2: pokračování

Kód DNA	Kód hostitele	Hostitel
S27	A265/4	<i>Hiatella arctica</i>
S28	A265/5	<i>Hiatella arctica</i>
S29	A265/6 (CS7)	<i>Hiatella arctica</i>
S30	A265/7 (CS3)	<i>Hiatella arctica</i>
S31	A744/1 (CS10)	<i>Hiatella arctica</i>
S32	A883/1 (CS15)	<i>Hiatella arctica</i>
S33	A749/1 (CS16)	<i>Hiatella arctica</i>
S34	F279/1	<i>Somateria mollissima</i>
S35	F279/2	<i>Somateria mollissima</i>
S36	F279/3	<i>Somateria mollissima</i>
S37	F279/4	<i>Somateria mollissima</i>

Izolace DNA

Izolaci DNA jsem prováděla pomocí tří různých protokolů. První protokol vycházel z klasické fenol-chloroformové izolace, ve zbylých dvou jsem využila komerční sady k izolaci DNA s dvěma různými způsoby rozmělnění tkáně.

Fenol-chloroformová izolace DNA pomocí pufru TNES

Ke každému vzorku (1 vysušený jedinec motolice v mikrozkuhavce) jsem přidala 200 μ l TNES pufru (Asahida kol. 1996). Následující den jsem přidala 2 μ l proteinázy (10 mg/ml) a inkubovala 30 min v suché lázni při 55 °C. Ke směsi jsem následně přidala 200 μ l fenolu a rázně promíchala. V dalším kroku jsem přidala 200 μ l chloroformu a opět promíchala. Poté jsem vzorky centrifugovala 5 min při 12570 rpm ve stolní centrifuze 320R (Hettich, Tuttlingen, Německo) s nastavením teploty na 4 °C. Svrchní vrstvu vodní fáze obsahující DNA jsem přenesla do nových mikrozkuhacek a přidala jsem 580 μ l 92 % etanolu vychlazeného na -20 °C. Opět

jsem vzorky centrifugovala na 20 min při 12570 rpm a se stejným nastavením jako v předchozím případě. Slila jsem etanol a přidala jsem dalších 100 μ l 70 % etanolu (opět vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ke vzorku a opět centrifugovala (5 min při 12750 rpm). Slila jsem etanol a zbytek nechala odpařit při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v suché lázni nebo vakuovém koncentrátoru), poté jsem přidala 50 μ l pufru TE a vzorky jsem uložila do lednice, kde jsem je ponechala přes noc a následující den přemístila do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolace DNA pomocí kitu

Zbytek vzorků jsem izolovala pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Venlo, Nizozemsko). Část vzorků jsem před zahájením izolace rozmělnila pomocí vymražení v kapalném dusíku a jejich následného rozmělnění tyčinkou. Přidala jsem 180 μ l pufru ATL, pak 20 μ l proteinázy K, promíchala jsem vzorky na vortexu. Inkubovala jsem vzorky při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ do úplného rozpuštění vzorku. Promíchala jsem vzorky pomocí vortexu, přidala jsem 200 μ l pufru AL. Opět promíchala na vortexu a inkubovala při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 10 min. Přidala jsem 200 μ l absolutního etanolu a důkladně jsem vzorky promíchala na vortexu. Přenesla jsem směs do kolonky s matrix zachycující DNA. Stočila jsem vzorky při 8000 rpm na 1 min na stolní centrifuze MiniSpin Eppendorf (Hamburg, Německo). Vyřadila jsem sběrnou zkumavku a kolonku jsem přenesla do nové sběrné zkumavky. Přidala jsem 500 μ l pufru AW1 a stočila jsem vzorky při 8000 rpm na 1 min na centrifuze MiniSpin, opět jsem vyřadila sběrnou zkumavku a kolonku přenesla do nové sběrné zkumavky. Přidala jsem 500 μ l pufru AW2 a stočila jsem vzorky při 1400 rpm na 3 min na centrifuze MiniSpin, opět jsem vyřadila sběrnou zkumavku a kolonku nasadila do nové popsané mikrozukavky. Na membránu na dně kolonky jsem přidala 50 μ l pufru AE. Inkubovala jsem vzorky 1 min při pokojové teplotě a následně získala roztok obsahující DNA stočením celé sady při 8000 rpm 1 min na centrifuze MiniSpin.

Amplifikace DNA

PCR směs byla připravena smícháním chemikálií v množství uvedeném v tab. 3. Stejný postup byl použit pro vzorky metacerkárií z *Mya truncata* a *Hiatella arctica*.

Tab. 3: Obsah reakční směsi pro amplifikaci COI

Příprava PCR reakční směsi	
10x Taq Buffer	2,5 µl
dNTP	2 µl
LCO forward primer	1 µl
HCO reverse primer	1 µl
Taq polymeráza	1 µl
PCR voda (redestilovaná voda)	16,5 µl

Tab. 4: Ředění složek PCR

dNTP	20 µl koncentrovaného DTP + 120 µl d. H ₂ O
primery	20 µl koncent. Primeru + 60 µl d. H ₂ O

Připravila jsem si reakční směs podle postupu výše, do 24 0,2 ml mikrozkušavek jsem si pomocí automatické pipety přenesla 24 µl reakční směsi a přidala jsem 1 µl templátové DNA. Vše jsem neustále udržovala na ledu (při 0 °C) kvůli polymeráze. Vzorky jsem vložila do cykleru a pustila jsem následující program specifikovaný v tab. 5.

Tab. 5: PCR protokol pro amplifikaci COI

Nastavení cyklieru		
95°C	3 min	
95°C	1 min	Opakování 35 x
40°C	1 min	
72°C	1 min 30 s	
72°C	7 min	
4°C	nekonečno	

Při amplifikaci ITS oblasti jsem postupovala podle Grutter a kol. (2000). Vzorokly metacerkárií z *Mya truncata* a *Hiatella arctica*, motolice z *Somateria mollissima*.

Tab. 6: Obsah reakční směsi pro amplifikaci ITS oblasti

Příprava PCR reakční směsi	
10x Taq Buffer complete	100 µl
dNTP	80 µl
3S primer	40 µl
ITS2.2 primer	40 µl
Taq-purple DNA polymeráza	40 µl
PCR voda (destilovaná voda)	620 µl

ITS2.2 = CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC **T_m** = 61,9°C

3S = GGTACCGGTGGATCACGTGGCTAGTG **T_m** = 68,4°C

Připravila jsem si reakční směs podle postupu výše, do 37 0,2 ml mikrozkumavek jsem si pomocí automatické pipety přenesla 23 µl reakční směsi a přidala jsem 2 µl templátové DNA nebo 2 µl redestilované H₂O (negativní kontrola). Do 38. pozice ve stripu jsem si přenesla negativní kontrolu. Vše jsem pořád udržovala na ledu kvůli

polymeráze. Vzorke jsem vložila do cykléru a spustila jsem následující program specifikovaný v tab. 8

Tab. 8: PCR protokol pro amplifikaci ITS oblasti podle Grutter a kol. (2000)

Nastavení cykléru		
95°C	3 min	
45°C	2 min	1 x opakování
72°C	90 s	
95°C	45 s	
50°C	45 s	4 x opakování
72°C	90 s	
95°C	20 s	
52°C	20 s	25 x opakování
72°C	90 s	
72°C	15 min	
4°C	nekonečno	

Při amplifikaci úseku genu pro COI jsem postupovala podle Leung a kol. (2009). Tento postup byl použit pro vzorky metacerkárií z *Mya truncata* a *Hiatella arctica* a juvenilní motolice z kajky *Somateria mollissima*.

Tab. 9: Obsah reakční směsi pro amplifikaci COI

Příprava PCR reakční směsi	
10x Taq Buffer complete	100 µl
dNTP	80 µl
JB3 primer (forward)	40 µl
COR primer (revers)	40 µl
Taq-purple DNA polymeráza	40 µl
PCR voda (destilovaná voda)	620 µl

JB3 = TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTAT **T_m** = 58,6°C

COR = AATCATGGATGCAAAAGGTA **T_m** = 52,8°C

Připravila jsem si reakční směs podle postupu výše, do 37 0,2 ml mikrozkušavek jsem si pomocí automatické pipety přenesla 23 µl reakční směsi a přidala jsem 2 µl templátové DNA. Do 38 pozice ve stripu jsem si napipetovala negativní kontrolu. Vše jsem pořád udržovala na ledu kvůli polymeráze. Vzorčky jsem vložila do cykléru a pustila jsem následující program specifikovaný v tab. 11.

Tab. 11: PCR protokol pro amplifikaci COI podle Leung a kol. (2009)

Nastavení cykléru		
95°C	2 min	40 x opakování
95°C	30 s	
48°C	40 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	nekonečno	

Vizualizace PCR produktu pomocí agarózové elektroforézy

Pomocí mikrovlnné trouby jsem rozpustila agarózu v TBE pufru. Výsledná koncentrace agarózy byla 1%. Agarózový roztok jsem zchladila pod tekoucí vodou. Nalila jsem roztok do formy a vložila jsem tam hřebínky a nechala jsem agar ztuhnout (přibližně 20 min).

Agarózová elektroforéza – postup, dokumentace

1) První postup: Vzala jsem si barvičku GoodView, kterou jsem promíchala se vzorky. Vzorčky, negativní a pozitivní kontrolu jsem napipetovala do gelu v elektroforéze. Do první jamky jsem napipetovala 4 µl 100 bp DNA velikostního standardu GeneRuler DNA Ladder ready-to-use (Thermo

Scientific, USA). Elektroforéza probíhala při 110V 5 min, po snížení napětí na 90V 30 min. Pozitivní proužky jsem pozorovala v UV transilluminátoru.

2) Druhý postup: Barvičku GoodView jsem přidala do gelu při jeho přípravě. Do první jamky jsem napipetovala 4 μ l ladder 100 b. Vzorky, negativní a pozitivní kontrolu jsem napipetovala do gelu v elektroforéze. Do poslední jamky jsem napipetovala 4 μ l 1 Kb ladder. Elektroforéza probíhala při 110 V 5 min, po snížení napětí na 90 V 30 min. Pozitivní proužky jsem pozorovala v UV transilluminátoru.

3) Třetí postup: Barvičku GoodView jsem přidala do gelu při jeho přípravě. Do první jamky jsem napipetovala 4 μ l ladder 100 b. Vzorky, negativní a pozitivní kontrolu jsem napipetovala do gelu v elektroforéze. Elektroforéza probíhala při 110 V 5 min, po snížení napětí na 90 V 30 min. Pozitivní proužky jsem pozorovala v UV transilluminátoru.

Čištění DNA

Prováděla jsem čištění DNA pomocí tří různých protokolů. K čištění DNA jsem využila komerční sady QIAquick Spin (Qiagen, Venlo, Nizozemsko) a Gene All Expin Combo (Soul, Jižní Korea).

Izolace PCR produktu

Izolace PCR produktu jsem prováděla pomocí kitu QIAquick Spin (Qiagen, Venlo, Nizozemsko). Izolaci PCR produktu jsem prováděla po získání výsledků z elektroforézy. Přidala jsem ke vzorku 200 μ l PB bufferu. Přenesla jsem směs do kolonky s matrix zachycující DNA a napipetovala jsem do ní 200 μ l reakční směsi. Stočila jsem vzorky 30-60 s při nejvyšších otáčkách. Poté jsem odstranila odpad ze sběrné zkumavky. Přidala jsem 75 μ l pufr PE s etanolem a stočila jsem vzorky 30-60 s při nejvyšších otáčkách. Vyřadila sběrnou zkumavku a kolonku nasadila do nové popsané mikrozukavky. Na membránu na dně kolonky jsem přidala 20 μ l d.H₂O a

následně získala roztok obsahující DNA stočením celé sady při 8000 rpm 1 min.

Izolace PCR produktu

Izolace PCR produktu jsem prováděla podle kitu Gene All Expin Combo. Izolaci PCR produktu jsem prováděla po získání výsledků z elektroforézy. Z gelu jsem vyřízla PCR produkt o předpokládané velikosti a přenesla jej do připravené mikrozkušavky. K vzorku jsem přidala 300 μ l pufru GB. Inkubovala jsem vzorky při 56 °C 5-10 min. do úplného rozpuštění vzorku. Přidala jsem 100 μ l isopropanolu a promíchala jsem vzorky na vortexu. Přenesla jsem směs do kolonky s matrix zachycující DNA. Stočila jsem vzorky při 12000 rpm na 1 min. Odstranila jsem odpad ze sběrné zkumavky. Přidala jsem 700 μ l buffer NW a stočila jsem vzorky při 12000 rpm na 30 s. Opět jsem odstranila odpad ze sběrné zkumavky. Stočila jsem vzorky při 12000 rpm na 30s. Vyřadila jsem sběrnou zkumavku a kolonku nasadila do nové popsané mikrozkušavky. Na membránu na dně kolonky jsem přidala 30 μ l d.H₂O a následně získala roztok obsahující DNA stočením celé sady při 12000 rpm 1 min.

Příprava vzorků na sekvenaci

1) Připravila jsem si 0,2 ml mikrozkušavky, do, kterých jsem si napipetovala předpřipravené primery HCO a předpřipravené primery LCO po 1 μ l a přidala jsem k nim 9 μ l PCR produktu. Polovinu vzorku jsem odeslala s primer LCO, druhou s HCO.

2) Naředila jsem si primery. 3S a ITS2.2 napipetovala jsem si 7,5 μ l primerů a přidala jsem k nim 52,5 μ l d.H₂O. Totéž jsem provedla s primery JB3 a COR. 2 μ l a přidala jsem k nim 14 μ l d.H₂O. Vzorky, které jsem si připravila pomocí čištění DNA podle Kitu Gene All Expin Combo jsem a přidala jsem k nim 2 μ l naředěných primerů. Do mini endorfek jsem si napipetovala 7 μ l redestilované H₂O a přidala jsem 3 μ l vzorku.

Vzorky jsem poté poslala na sekvenci firmě SEQME. Odesílají vzorky ve formě PCR produktu a výsledky přijdou elektronicky.

Klonování

Připravila jsem si ligační směs: do ependorfký jsem si napipetovala 4 μ l čistého PCR produktu. Přidala jsem 1 μ l Salt Solution (Invitrogen, LifeTechnologies, Thermofisher Scientific, Carlsbad, USA) a 1 μ l pCR 2.1 (Invitrogen, LifeTechnologies, Thermofisher Scientific, Carlsbad, USA) Dala jsem mikrozkušavku inkubovat, na 5 min při pokojové teplotě (22-23 °C). Dále jsem reakci nechala na ledu. Na další postup jsem použila plotny s LB agarem (Applichem, Darmstadt, Německo) a ampicilinem (50 μ g/ml; Biotika, Slovenská Lupča, Slovencko). Předehřála jsem si vodní lázeň na 42 °C, zahřála jsem si SOC médium na pokojovou teplotu, kompetentní buňky jsem vyndala z hlumokomrazícího boxu (-80 °C) a nechala jsem je samovolně rozmrazit v ledové tříšti. Ke kompetentním buňkám jsem přidala 2 μ l ligační směsi a šetrně jsem směs promíchala. Následně jsem ponechala vzorky 10 min inkubovat v ledové tříšti. Po 10 min jsem mikrozkušavky s ligační směsí přenesla do vodní lázně (42 °C), kde jsem je ponechala 30 s umístěné v plováčku. Způsobila jsem tedy buňkám teplotní šok. Poté jsem okamžitě přenesla mikrozkušavky na ledovou tříšť a nechala jsem je tam 2 min a přidala jsem do mikrozkušavek 250 μ l SOC média ohřátého na pokojovou teplotu. Mikrozkušavky jsem uložila v horizontální poloze do inkubované třepačky (nastavené na 37 °C, 210 rpm) a ponechala třepat po dobu 1 h. Agarové LB plotny jsem vyndala z lednice a nechala jsem je ohřát na pokojovou teplotu. Z připravené směsi jsem přenesla 100 μ l a 200 μ l na dvě plotny s LB agarem a ampicilinem pečlivě rozetřela pomocí sterilní mikrobiologické hokejky. Plotny jsem nechala inkubovat do druhého dne při 37 °C. Jednotlivé narostlé kolonie jsem přenesla do 30 μ l redestilované H₂O a umístila do inkubované třepačky (37 °C, 10 min, 210 rpm).

Tab. 12: Příprava mastermixu

Příprava mastermix	
10x Taq Buffer complete	45 µl
dNTP	36 µl
Forward primer	18 µl
Reverse primer	18 µl
Polymeráza	18 µl
PCR voda (redestilovaná voda)	261 µl

Následně jsem přenesla do stripu 11 µl mastermixu (Tab. 12) a přidala jsem 2 µl vody s modifikovanými bakteriemi. Pak jsem vzorky dala do cyklu. Cyklus jsem spustila s nastavením SCREEN (tab. 13). Výsledky PCR a tedy i celého klonování

Tab. 13: PCR protokol pro kontrolní amplifikaci

program SCREEN		
95°C	15 min	
95°C	30 s	20x opakování
54°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	nekonečno	

Kontrola a úprava sekvencí

Získané sekvence jsem zkontrolovala pomocí programu BLAST, tj. vyhledáním nejpodobnějších sekvencí v databázi GenBank. Sekvence, které vyhledávání v programu BLAST označilo za podobné sekvencím motolic, jsem následně nechala dosekvenovat z opačné strany (pomocí primeru ITS2.2 v případě ITS oblasti a pomocí primeru COR v případě úseku COI). Získané sekvence jsem spojila dohromady

pomocí programu Geneious 8.1.8 (Biomatters Ltd., Nový Zéland) a ověřila jejich správnou orientaci (ve směru 5' -3').

Fylogenetická analýza

Pro obě skupiny sekvencí (tj. ITS oblast, úsek COI) jsem připravila dataset zahrnující také nejpodobnější sekvence nalezené programem BLAST. V případě datasetu ITS se jednalo o sekvence pod přístupovými čísly:

JN381028 *Gymnophallus australis* (metacerkárie z mlže *Perumytilus purpuratus*)
Portugalsko

JN381029 *Gymnophallus choledochus* (metacerkárie z mlže *Cerastoderma edule*)
Portugalsko

JN381027 *Bartolius pierrei* (metacerkárie z mlže *Darina solenoides*)
Argentina

KM246859 *Gymnophalloides macomae* (metacerkárie z mlže *Macoma balthica*)
Finsko

JN381024 *Gymnophalloides seoi* (metacerkárie z mlže *Crassostrea gigas*)
Jižní Korea

KF575168 *Gymnophalloides nacellae* (sporocysta z mlže *Gaimardia trapesina*)
Argentina

JN381026 *Parvatrema* sp. (metacerkárie z mlže *Tagelus plebeius*)
Argentina

JN381030 *Meiogymnophallus minutus* (metacerkárie z mlže *Cerastoderma edule*)
Portugalsko

Dataset úseku COI byl obohacen následujícími sekvencemi:

FJ765469 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765470 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765468 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765471 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765467 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

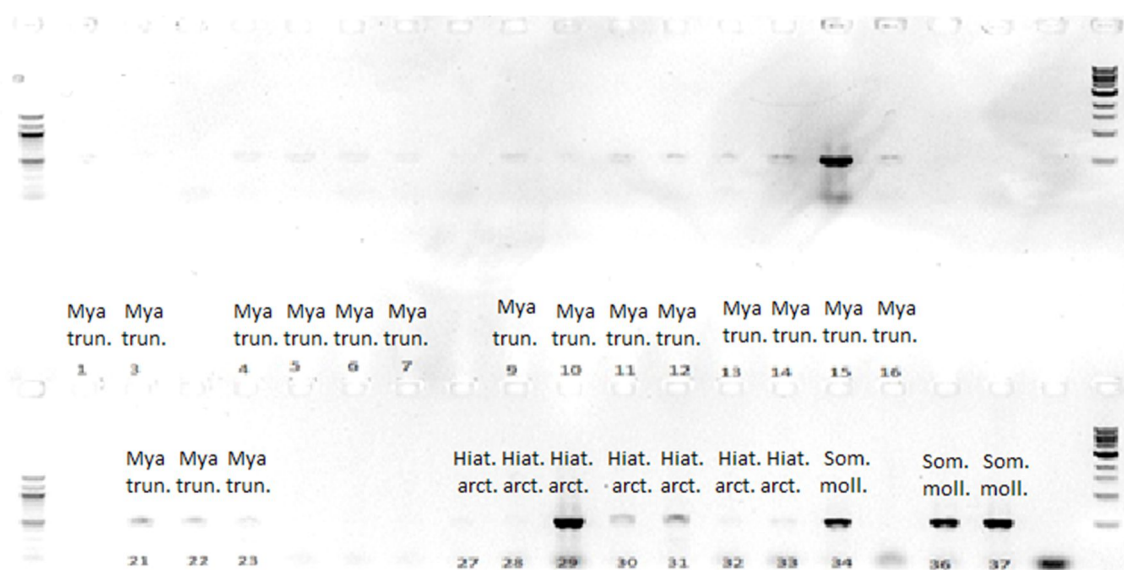
Nový Zéland

Sekvence byly seřazeny pomocí programu MAFFT v7.017 (Katoh a kol. 2002) a následně byla provedena analýza metodou maximální pravděpodobnosti pomocí programu RAxML (Stamatakis 2006) za použití obecného časově-reverzibilního modelu (general time-reversible model - GTR) s gamma (Γ) rozložením a bootstrapem s 500 násobným opakováním.

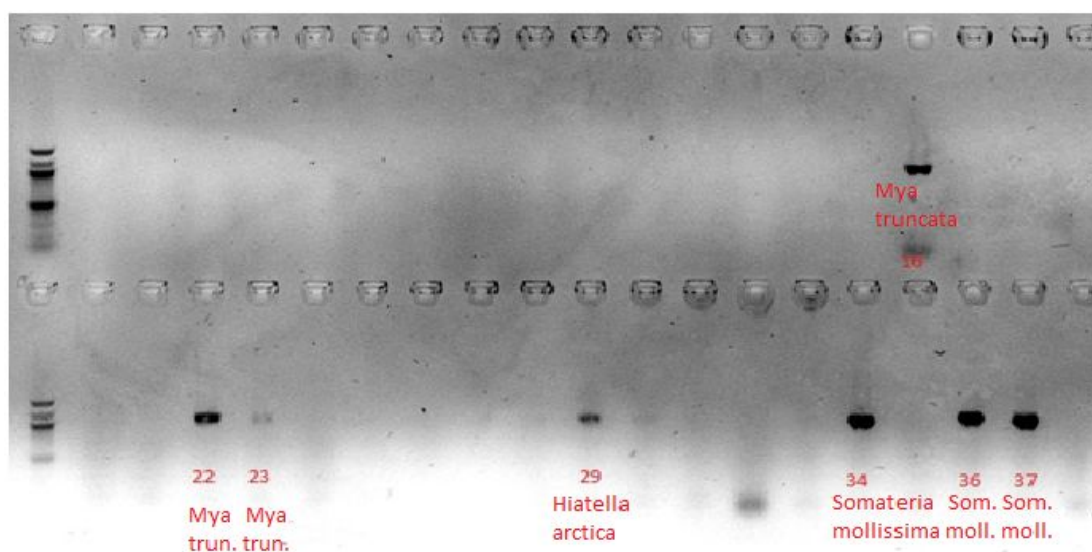
6. Výsledky

6.1. Metody PCR a ELFO

Výsledky první elektroforézy nejsou zaznamenány z důvodu nefunkčnosti UV transiluminátoru. Výsledky druhé elektroforézy, pro které byla použita druhá sada vzorků DNA (Tab. 2), jsou zobrazeny na obr. 7. (ITS oblast) a obr. 8 (úsek COI).



Obr. 7: Vizualizace velikosti fragmentů amplifikované oblasti ITS pomocí primerů 3S a ITS2.2 Jako velikostní standard byl použit 100 bp DNA GeneRuler DNA Ladder ready-to-use.



Obr. 8: Vizualizace velikosti amplifikovaného úseku COI pomocí primerů JB3 a COR ze vzorků DNA izolované z metacerkárií z mlžů *Mya truncata* a *Hiatella arctica* a juveliní motolice z kajky *Somateria mollissima*. Jako velikostní standard byl použit 100 bp DNA GeneRuler DNA Ladder ready-to-use.

Tab. 13: Izolované PCR produktu odeslané na osekvenování (oblast ITS)

PCR produkt	Kód hostitele	Hostitel
1	A333/1	<i>Mya truncata</i>
2	A333/2 (CS2)	<i>Mya truncata</i>
4	A333/4 (CS9)	<i>Mya truncata</i>
5	A524/1 (CS1)	<i>Mya truncata</i>
6	A524/2 (CS17)	<i>Mya truncata</i>
7	A456/1	<i>Mya truncata</i>
9	A456/3 (CS8)	<i>Mya truncata</i>
10	A470/1	<i>Mya truncata</i>
11	A470/2	<i>Mya truncata</i>
12	A470/3	<i>Mya truncata</i>
13	A470/4	<i>Mya truncata</i>
14	A470/5 (CS5)	<i>Mya truncata</i>
15	A453/1 (CS6)	<i>Mya truncata</i>
16	A453/2 (CS12)	<i>Mya truncata</i>
21	A872/5 (CS11)	<i>Mya truncata</i>
22	A257/1 (CS13)	<i>Mya truncata</i>
23	A523/1 (CS18)	<i>Mya truncata</i>
27	A265/4	<i>Hiatella arctica</i>
28	A265/5	<i>Hiatella arctica</i>
29	A265/6 (CS7)	<i>Hiatella arctica</i>
30	A265/7 (CS3)	<i>Hiatella arctica</i>
31	A744/1 (CS10)	<i>Hiatella arctica</i>
32	A883/1 (CS15)	<i>Hiatella arctica</i>
33	A749/1 (CS16)	<i>Hiatella arctica</i>
34	F279/1	<i>Somateria mollissima</i>
36	F279/3	<i>Somateria mollissima</i>
37	F279/4	<i>Somateria mollissima</i>

Tab. 14: Izolované PCR produktu odeslané na osekvenování (úsek COI)

Kód DNA	Kód hostitele	Hostitel
S 16	A453/2 (CS12)	<i>Mya truncata</i>
S 22	A257/1 (CS13)	<i>Mya truncata</i>
S 23	A523/1 (CS18)	<i>Mya truncata</i>
S 29	A265/6 (CS7)	<i>Hiatella arctica</i>
S 34	F279/1	<i>Somateria mollissima</i>
S 36	F279/3	<i>Somateria mollissima</i>
S 37	F279/4	<i>Somateria mollissima</i>

6.2. Sekvence

Oblast ITS

Získala jsem 7 sekvencí, 3x z motolice z kajky, 4x z metacerkárie z *Mya* (3 různé jedinci *Mya truncata*). Délka sekvencí je od 479 – 503 nukleových bází. Databáze GenBank obsahuje větší zastoupení sekvencí zástupců čeledi *Gymnophallidae* pro oblast ITS než v případě úseku COI.

Úsek COI

Získala jsem pouze 3 sekvence (1x kajka mořská *Somateria mollissima*, 2x *Mya truncata*). Tato sekvence je zkrácená na úsek 792 bází dlouhý úsek (793-795. stop kodon podle alternativního genetického kódu (Trematoda Mitochondrial transl_table 21). V GenBank jsem našla pouze 5 dalších sekvencí pro gen COI. Sekvence uložené v databázi GenBank s nejvyšší shodou k sekvencím úseku COI *Gymnophallus* sp. ze Svalbardu (A257_1; A453_2; F279_1) vyhledané pomocí programu BLAST.

Hiatella arctica

Bohužel žádnou sekvenci ze vzorků DNA metacerkárií z hostitele *Hiatella arctica* se nepovedlo získat.

6.3. Klonování

Jediný pokus o molekulární klonování byl neúspěšný. Při kontrole modifikovaných kompetních buněk se nepodařilo potvrdit v plasmidu přítomnost úseku DNA o správné velikosti.

Tab. 15: Procentuální míra shody mezi sekvencemi úseku genu pro COI.

	A257_1	A453_2	F279_1	FJ765467	FJ765468	FJ765469	FJ765470	FJ765471
A257_1		99,9%	99,6%	77,2%	76,5%	76,4%	76,5%	76,3%
A453_2	99,9%		99,7%	77,2%	76,5%	76,4%	76,5%	76,3%
F279_1	99,6%	99,7%		77,3%	76,6%	76,5%	76,6%	76,4%
FJ765467	77,2%	77,2%	77,3%		99,9%	100%	99,9%	99,9%
FJ765468	76,5%	76,5%	76,6%	99,9%		99,9%	100%	99,7%
FJ765469	76,4%	76,4%	76,5%	100%	99,9%		99,9%	99,9%
FJ765470	76,5%	76,5%	76,6%	99,9%	100%	99,9%		99,7%
FJ765471	76,3%	76,3%	76,4%	99,9%	99,7%	99,9%	99,7%	

Tab. 16: Počet odlišných nukleotidových pozic mezi sekvencemi úseku genu pro COI.

	A257_1	A453_2	F279_1	FJ765467	FJ765468	FJ765469	FJ765470	FJ765471
A257_1		1	4	171	186	187	186	188
A453_2	1		3	171	186	187	186	188
F279_1	4	3		171	186	187	186	188
FJ765467	171	171	171		1	0	1	1
FJ765468	186	186	186	1		1	0	2
FJ765469	187	187	187	0	1		1	1
FJ765470	186	186	186	1	0	1		2
FJ765471	188	188	188	1	2	1	2	

Vysvětlivky ke kódům sekvencí obsažených v tabulkách 15 a 16:

A257/1 Gymnophallidae (metacerkárie z mlže *Mya truncata*)

Svalbard

A453/2 Gymnophallidae (metacerkárie z mlže *Mya truncata*)

Svalbard

F279/1 Gymnophallidae (juvenilní motolice z kajky *Somateria mollissima*)

Svalbard

FJ765469 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765470 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765468 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765471 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

FJ765467 *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*)

Nový Zéland

Vysvětlivky ke kódům sekvencí obsažených v tabulkách 17 a 18:

A257/1 Gymnophallidae (metacerkárie z mlže *Mya truncata*) Svalbard

A523/1 Gymnophallidae (metacerkárie z mlže *Mya truncata*) Svalbard

A524/1 Gymnophallidae (metacerkárie z mlže *Mya truncata*) Svalbard

A524/2 Gymnophallidae (metacerkárie z mlže *Mya truncata*) Svalbard

F279/1 Gymnophallidae (motolice z kajky *Somateria mollissima*) Svalbard

F279/3 Gymnophallidae (motolice z kajky *Somateria mollissima*) Svalbard

F279/4 Gymnophallidae (motolice z kajky *Somateria mollissima*) Svalbard

JN381028 *Gymnophallus australis* (metacerkárie z mlže *Perumytilus purpuratus*)

Portugalsko

JN381029 *Gymnophallus choledochus* (metacerkárie z mlže *Cerastoderma edule*)

Portugalsko

JN381027 *Bartolius pierrei* (metacerkárie z mlže *Darina solenoides*)

Argentina

KM246859 *Gymnophalloides macomae* (metacerkárie z mlže *Macoma balthica*)

Finsko

JN381024 *Gymnophalloides seoi* (metacerkárie z mlže *Crassostrea gigas*)

Jižní Korea

KF575168 *Gymnophalloides nacellae* (sporocysta z mlže *Gaimardia trapesina*)

Argentina

JN381026 *Parvatrema* sp. (metacerkárie z mlže *Tagelus plebeius*)

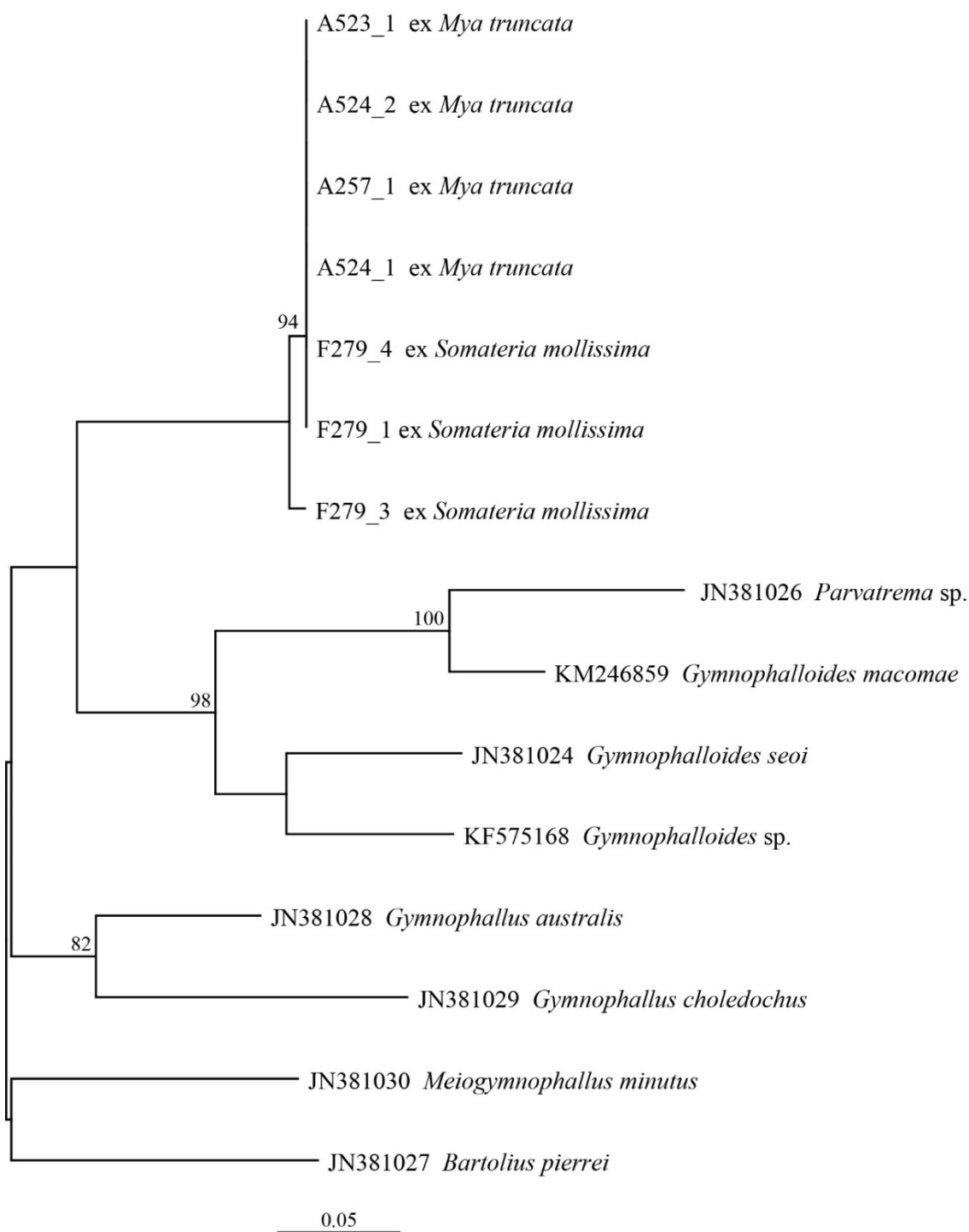
Argentina

JN381030 *Meiogymnophallus minutus* (metacerkárie z mlže *Cerastoderma edule*)

Portugalsko

6.4. Fylogenetická analýza

Získané sekvence vytvořily ve fylogenetické analýze monofyletickou skupinu s vysokou bootstrapovou podporou (96 %). Sekvence F279_3 získaná z kajky mořské (*Somateria mollissima*) je na bázi všech ostatních sekvencí. Sesterskou skupinu k mnou získaným sekvencím vytvořily sekvence *Gymnophalloides* spp. a *Parvatrema* sp., nicméně s nízkou bootstrapovou podporou (37 %).



Obr. 10: Fylogenetická rekonstrukce vztahů v rámci čeledi Gymnophallidae na základě sekvencí úseku ITS1-5.8S-ITS2 metodou maximální věrohodnosti. Přístupová čísla sekvencí (NCBI databáze) jsou uvedena před názvy taxonů. Sekvence JN381030 (*Meiogymnophallus minutus*) a JN381027 (*Bartolius pierrei*) slouží jako outgroup. Bootstrapové podpory jsou zobrazeny u jednotlivých uzlů, pokud byly vyšší než 70 %.

7. Diskuse

Použití třech způsobů izolace DNA z motolic mělo určit jaký typ izolace je pro tento typ materiálu nejvhodnější. Použila jsem izolaci fenol-chloroformovou ze vzorků uložených v TNES pufru. Dále jsem DNA izolovala kitem DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) a vzorky před izolací rozmělnila tekutým dusíkem a také jsem vyzkoušela izolaci s totožným kitem, ale bez použití tekutého dusíku k rozmělnění tkáně. Ukázalo se, že první izolace vzorků z metacerkárií izolovaných z mlžů *Mya truncata* a *Hiatella arctica* pomocí těchto třech typů izolace DNA nebyla tak úspěšná, soudě dle toho, že se nám nepodařilo získat jejich sekvence. Pomocí použitých primerů se podařilo amplifikovat pouze hostitelskou DNA, kterou použitá izolace neodstranila. U druhého pokusu se vzorky z metacerkárií izolovaných z mlžů *Mya truncata* a *Hiatella arctica* a juvenilní motolice izolované z kajky mořské (*Somateria mollissima*), jsem použila izolaci DNA pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) a bez předchozího rozmělnění pomocí tekutého dusíku. Amplifikace DNA byla úspěšná se vzorky z metacerkárií izolovaných z mlžů *Mya truncata* a také z juvenilní motolice z kajky mořské (*Somateria mollissima*). Množství templátové DNA v PCR je pravděpodobně jednou z hlavních příčin částečného neúspěchu při získávání sekvencí. Vyzkoušení dalších dostupných metod izolace DNA byla ale limitována omezeným množstvím DNA. Pokud by se v budoucnu podařilo získat dostatek materiálu, tak by DNA měla být izolována pomocí kitů určených k izolaci DNA z velmi malého množství materiálu, např. QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Venlo, Nizozemsko). Další možností by bylo použití přímé PCR, tj. bez předchozí izolace DNA (Mercier a kol. 1990). Velkou nevýhodou takového postupu by bylo, že z jednoho jedince by bylo možné získat sekvence dvou a více molekulárních markerů jen velmi obtížně.

Použité primery pro oba molekulární markery nejsou bohužel specifické a zejména v případě metacerkárií amplifikovaly hostitelskou (měkkýši) DNA. V některých případech amplifikovaly DNA motolic a i hostitelskou a výsledkem byla sekvence s nejasným (zdvojeným) signálem. V případě metacerkárií z mlže *Hiatella arctica* je tato skutečnost dalším důvodem v neúspěchu. Jedním z možných řešení je

pečlivější pročištění vzorků (metacerkárií) od hostitelské tkáně. Pročištění vzorků od hostitelské tkáně je možné během pitvy přímo na lokalitě, tj. živých jedinců ještě před jejich nafxováním. Další možností je přečištění vzorků později v laboratoři, kde budou již nafxováni v čistém ethanolu. Uložení vzorků do pufru TNES jejich pozdější pročištění neumožňuje, protože tento pufr výrazně tkáň/buňky osmoticky narušuje. Situaci by také vyřešilo navržení nových specifických primerů, které by problémy s kontaminací hostilskou DNA vyloučily a zároveň umožnily opětovné využití již izolované DNA získané během předchozích expedic.

Pro druhovou determinaci zástupců čeledi Gymnophallidae se dosud používá morfologická charakteristika založená zejména na uspořádání pohlavních orgánů. Protože jsme měli k dispozici pouze juvenilní jedince z definitivního hostitele, nebylo podle nich možné druh determinovat. Podle fylogenetické analýzy sedmi získaných sekvencí oblasti ITS je námi studovaná motolice příbuzná příslušníkům rodu *Gymnophalloides*, ovšem bootstrapová podpora je malá, jen 37 %. Není vyloučeno, že jde o nový, dosud nepopsaný druh tohoto rodu nebo jiného rodu z téže čeledi. Konečnou determinaci rozřeší až studium dospělé motolice tohoto druhu, na které bude uspořádání pohlavních orgánů patrné.

Fylogenetická analýza zařadila sekvence motolic nejbližší k *Parvatrema* sp. (metacerkárie z mlže *Tagelus plebeius*, Argentina), *Gymnophalloides macome* (metacerkárie z mlže *Macoma balthica*, Finsko), *Gymnophalloides seoi* (metacerkárie z mlže *Crassostrea gigas*, Jižní Korea) a na základě úseku genu pro COI k *Gymnophallus* sp. (metacerkárie z mlže *Austrovenus stutchburyi*, Nový Zéland). Výsledky fylogenetické analýzy jsem mohla porovnat se studií Cremonte a kol. (2015), kteří získali podobné uspořádání větví.

V databázi GeneBank není z čeledi Gymnophallidae dostatek sekvencí, které by umožňovaly přesnější determinaci a detailnější analýzu fylogenetických vztahů uvnitř čeledi. Tento nedostatek je jistě do značné míry způsoben skutečností, že typickým definitivním hostitelem jsou vodní ptáci, nejčastěji vrubozobí nebo bahňáci (Scholz

2002) a možnost jejich odchytu a pitvy je tak často velmi omezená zákony na ochranu volně žijících zvířat.

Ačkoliv se amplifikace DNA z metacerkárii z *Hiatella arctica* nezdařila, domnívám se, že jde o tentýž druh, protože je z téže lokality jako *Mya truncata* a metacerkárie má velmi podobnou morfologii jako metacerkári z *Mya truncata*. Dalším argumentem může být omezený počet definitivních hostitelů vyskytujících se na lokalitě.

Z ptáků (nejen vrubozobích a bahňáků) vyskytujících se na Svalbardu připadá kromě kajky mořské (*Somateria mollissima*) v úvahu pouze kajka královská (*Somateria spectabilis*). Ta se sice na Svalbardu vyskytuje (Kovacs, Lyndersen 2006), je ale mimořádně vzácná a v oblasti Billefjordenu ji zatím účastníci expedice PřF JU nepozorovali.

Na Svalbardu zatím nebyly nalezeny motolice čeledi Gymnophallidae, v Arktidě zaznamenány již ale byly, například ze západního Grónska (Petersen 1984). Bishop a Threfall (1974) našli v kajce mořské (*Somateria mollissima*) na šesti lokalitách na severovýchodním pobřeží Severní Ameriky tři druhy rodu *Gymnophallus*: *G. bursicola*, *G. choleduchus* a *G. minor*. Další druh, *Gymnophallus somateriae* (Levinsen, 1881), zaznamela Ching (1973) na západním pobřeží Severní Ameriky v okolí Vancouveru. V tomto případě je znám i mezihostitel – mlž *Macoma inconspicua*. Z Evropy je znám například *Gymnophallus gibberosus* Loos-Frank, 1971, jehož hostitelem je *Macoma baltica*, *Cerastoderma edule*, *Cerastoderma lamarcki* a pravděpodobně i *Mytilus edulis* (Lauckner 1971). Určování nedospělých jedinců je nicméně složité a přinejmenším v některých případech i nemožné, což dokazuje například práce Pekkarinen a Ching (1994), které po detailním morfologickém studiu synonymizovaly *Gymnophallus gibberosus* Loos-Frank, 1971 s *Gymnophallus somateriae* (Levinsen, 1881).

Při porovnávání metacerkárie z *Mya truncata* s motolicí z kajky mořské (*Somateria mollissima*), musím zohlednit to, že kajky hnízdí na Svalbardu, ale

přezimují na Islandu a na severu Norsku. Na zimovišti se mohou infikovat dalšími druhy motolic, které ale nemají na Svalbardu své hostitele a jejich životní cyklus se uzavírá až později na zimovišti.

8. Závěry

1. Analýza DNA prokázala, že metacerkárie z mlže *Mya truncata* jsou totožné s juvenilní motolicí čeledi Gymnophallidae z kajky *Somateria mollissima* z téže lokality. Tento druh tedy ve svém životním cyklu používá mlže *Mya truncata* jako mezihostitele a kajku *Somateria mollissima* jako definitivního hostitele.

2. Fylogenetické analýza sekvencí ITS řadí tento druh k příslušníkům rodu *Gymnophaloides*, popřípadě *Gymnophallus*.

3. Sekvence DNA metacerkárií parazitujících v *Hiatella arctica* se nepodařilo získat.

4. Práce přinesla poznatky o metodice, vhodné pro molekulární analýzy motolic z tohoto materiálu:

- pro izolaci DNA se nejlépe osvědčil kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)
- amplifikace primery pro ITS oblast byla úspěšnější, než s primery pro úsek COI, které amplifikovaly částečně i hostitelskou tkáň (v případě metacerkárií izolovaných z mlžů)

9. Literatura

- Addino, M., Lomovasky, B.J., Cremonte, F. and Iribarne, O., 2010. Infection by gymnophallid metacercariae enhances predation mortality of SW Atlantic stout razor clam *Tagelus plebeius*. *Journal of Sea Research*, 63(2), 102-107
- Al-Kandari, W.Y, Alnaqeeb, M.A., Issac, A.M., Al-Bustan, S.A., 2015. Molecular characterization of *Stictodora tridactyla* (Trematoda: Heterophyidae) from Kuwait Bay using rDNA ITS and mtCO1. *Parasitology Research*, 114(11), 4259-4266.
- Anker-Nilssen, T., Bakken, V., Strom, H., Golovkin, A.N., Bianki, V.V., Tatarinkova, I.R., 2000. The status of marine birds breeding in the barents sea region. *Norway: Norsk Polarinstitut*, 3-12
- Aquino, A.M., Ceccarelli, F.S., Eguiarte, L.E., Domínguez, E.V., Ponce de León, G.P., 2014. Do the Historical Biogeography and Evolutionary History of the Digenean *Margotrema* spp. across Central Mexico Mirror Those of Their Freshwater Fish Hosts (Goodeinae)?. *PLoS One*, 9(7), doi: 10.1371/journal.pone.0101700.
- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., Nakayama, I., 1996. Tissue Preservation and Total DNA Extraction from Fish Stored at Ambient Temperature Using Buffers Containing High Concentration of Urea. *Fisheries Scienc.*, 62(5), 727-730
- Behjati, S., Tarpey, P.S., 2013. What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, 98(6), 236-238
- Beltman, J.B., Urbanus, J., Velds, A., van Rooij, N., Rohr, J.C., Naik, S.H., Schumacher, T.N., 2016. Reproducibility of Illumina platform deep sequencing errors allows accurate determination of DNA barcodes in cells. *BMC Bioinformatics*. 17, doi: 10.1186/s12859-016-0999-4
- Bishop, C.A., Threlfal, W., 1974. Helminth Parasites of the Common Eider Duck, *Somateria mollissima* (L.), in Newfoundland and Labrador1. *Of Washington*, 41(1), 25-35.
- Bray, R.A., 2002. Superfamily Gymnophallidae Odner, 1905. *CAB International and the Natural History Museum, London, U.K.*, 243-244

- Cremonte, F., 2001. *Bartolius pierrei* n. g., n. sp. (Digenea: Gymnophallidae) from the Península Valdés, Argentina. *Syst Parasitol*, 49(2), 139-147
- Cremonte, F., Gilardoni, C., Pina, S., Rodrigues, P., Ituarte, C., 2015. Revision of the family Gymnophallidae Odhner, 1905 (Digenea) based on morphological and molecular data. *Parasitology International*, 64, 202-210.
- Cremonte, F., Vázquez, N., Ituarte, C., 2008. The development of *Gymnophallus australis* Szidat, 1962 (Digenea: Gymnophallidae) from the Patagonian coast (Argentina) from metacercaria to adult, with an amended diagnosis of *Gymnophallus* Odhner, 1905. *Syst Parasitol*, 69, 23-31
- Fermer, J., Culloty, S.C., Kelly, T.C., O'Riordan, R.M., 2010. Temporal variation of *Meiogymnophallus minutus* infections in the first and second intermediate host. *Journal of Helminthology*, 84(4), 362-368
- Galaktionov, K.V., 2007. A description of the parthenogenetic metacercaria and cercaria of *Cercaria falsicingulae* I larva nov. (Digenea: Gymnophallidae) from the snails *Falsicingula* spp. (Gastropoda), with speculation on an unusual life-cycle. *Syst Parasitol*, 68, 137-146
- Galaktionov, K.V., Irwin, S.W.B., Saville, D.H., 2008. One of the most complex life-cycles among trematodes: a description of *Parvatrema margaritense* (Ching, 1982) n. comb. (Gymnophallidae) possessing parthenogenetic metacercariae. *Journals Cambridge*, 733-746.
- Gibson, D. I., Jones, Arlene, Bray, R. A., *Keys to the Trematode*, vol.1. London: Oxon, 2005. ISBN 0 85199 547 0
- Grutter, A.S., Morgan, J.A.T. and Adlard, R.D., 2000. Characterising parasitic gnathiid isopod species and matching life stages with ribosomal DNA ITS2 sequences. *Marine Biology*, 136(2), 201-205
- Gulliksen, B., E. Svensen. Svalbard and Life in Polar Ocean. Kristiansund N: Kom forlag a/s, 2004. ISBN 82 92496 03 3
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J., R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society*, 270, S96-S99
- Ching, H.L., 1973. Description of *Gymnophallus somateriae* (Levensen, 1881) from *Macoma inconspicua* and diving ducks from Vancouver, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 51(8), 801-806

- Ching, H.L., Pekkarinen, M., 1994. Comparisons of Gymnophallid digeneans from north Pacific and Baltic clams, *Macoma balthica* (Bivalvia). *Journal Parasitol*, 80(4), 630-636.
- Ishida, K., Varrecchia, M., Knudsen, G.M., Jolly, E.R., 2014. Immunolocalization of Anti-Hsf1 to the Acetabular Glands of Infectious Schistosomes Suggests a Non-Transcriptional Function for This Transcriptional Activator. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8(7), doi: 10.1371/journal.pntd.0003051.
- Janko, K., *Molekulární diagnostika v parazitologii: sborník referátů z odborného semináře*. Lékařský dům ČSL JEP, Sokolská 31, Praha 2, 2013, s. 2-5. ISBN
- Kovacs, K.M., Lydersen, C., 2006. Birds and mammals of Svalbard. Norwegian Polar Institute, pp. 203
- Kudlai, O., Cutmore, S.C., Cribb, T.H., 2015. Morphological and molecular data for three species of the Microphallidae (Trematoda: Digenea) in Australia, including the first descriptions of the cercariae of *Maritrema brevisacciferum* Shimazu et Pearson, 1991 and *Microphallus minutus* Johnston, 1948. *Folia Parasitologica*, 62, doi: 10.14411/fp.2015.053
- Leung, T.L., Poulin, R. and Keeney, D.B., 2009. Accumulation of diverse parasite genotypes within the bivalve second intermediate host of the digenean *Gymnophallus* sp. *International journal for parasitology*, 39(3), 327-331.
- Liu, J., Yan, H., Ge, X., 2016. The Use of DNA Barcoding on Recently Diverged Species in the Genus *Gentiana* (Gentianaceae) in China. *PLOS/ONE*, 11(4), doi:10.1371/journal.pone.0153008.
- Lomovasky, B.J., Gutiérrez, J.L., Iribarne, O.O., 2005. Identifying repaired shell damage and abnormal calcification in the stout razor clam *Tagelus plebeius* as a tool to investigate its ecological interactions. *Journal of Sea Research*, 54, 163-175.
- Macholán, M., 2014. *Základy fylogenetické analýzy*. Muni press, pp. 289.
- Maclvor, J.S., 2016. DNA barcoding to identify leaf preference of leafcutting bees. *The Royal Society*, 3(3), doi: 10.1098/rsos.150623.
- Mercier, B., Gaucher, C., Feugeas, O., Mazurier, C., 1990. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic acids research*, 18, 5908.
- Moen, F.E., *Marine fish & invertebrates of Northern Europe*. Norway: KOM, 2004, ISBN 82-92496-084

- Peterson, G.H., 1984. Parasitism in bivalves from an Arctic ecosystem. *Helgoländer Meeresunters*, 37, 201-205.
- Sanpool, O., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Janwan, P., Nawa, Y., Blair, D., Maleewong, W., 2013. Molecular Variation in the *Paragonimus heterotremus* Complex in Thailand and Myanmar. *Korean J Parasitol*, 51(6), 677-681.
- Shen, Y., Guan, L., Wang, D., Gan, X., 2016. DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River. *Ecology and Evolution*, 1-12, doi: 10.1002/ece3.2060
- Scholz, T. 2002. Family *Gymnophallidae* Odhner, 1905. In: D. I. Gibson. A. Jones & R. A. Bray. editors. Keys to trematoda. vol. I. Oxon, UK: CAB Publishing, 245-251
- da Silva, P.M., Cremonte, F., Sabry, R.C., Rosa, R. D., Cantelli, I., 2009. Presence and histopathological effects of the *Parvatrema* sp. (Digenea, Gymnophallidae) in the stout razor clam *Tagelus plebeius* (Bivalvia, Psammobiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 102, 14-20.
- Sthälberg, A., Krzyzanowski, P.M., Jackson, J.B., Egyud, M., Stein, L., Godfrey, T.E., 2016. Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Oxford Journals*, 1-7, doi: 10.1093/nar/gkw224
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J., 2005. Metody molekulární biologie. Brno, ISBN 80-210-3841-1
- Trivedi, S., Aloufi, A.A., Ansari, A.A., Ghosh, S.K., 2016. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 161-171
- Volf P., P. Horák a kol. *Parazitologie a jejich biologie*. Praha 10: TRITON, 2007. ISBN 978-807387-008-9.
- Yanagida, T., Shirakashi, S., Iwaki, T., Ikushima, N. and Ogawa, K., 2009. Gymnophallid digenean *Parvatrema duboisi* uses Manila clam as the first and second intermediate host. *Parasitology international*, 58(3), 308-310.
- Biologická fakta. *Průvodce Svalbardem*. [online]. 10.2.2016 [cit. 2016-02-10]. Dostupné z: <http://www.svalbard.cz/guide/bio.html#00>

10. Klíčová slova (Key words)

Motolice

Gymnophallidae

Molekulární diagnostika

ITS2.2. sekvence

COI sekvence

PCR

Trematode

Gymnophallidae

Molecular diagnostics

ITS2.2. sequences

COI sequences

PCR