

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta



Bakalářská práce

# **Molekulární fylogeneze motolic čeledi Opithorchiidae a Heterophyidae**

**Dagmar JIRSOVÁ**

Školitel: Prof. RNDr. Tomáš Scholz, CSc.

České Budějovice  
květen 2007

## **Bakalářská práce**

Jirsová, D., 2007. Molekulární fylogeneze motolic čeledi Opisthorchiidae a Heterophyidae. [Molecular phylogeny of trematodes of the families Opisthorchiidae and Heterophyidae, Bc. Thesis, in Czech] Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 21 pp.

## **Annotation**

Phylogenetic relationships of trematodes of the families Opisthorchiidae and Heterophyidae were examined using partial sequences of the 28S rRNA gene. Results indicate possible paraphyly of the family Heterophyidae.

Tato práce byla financována z projektu Grantové agentury Akademie věd ČR (A6022404 – řešitel T. Scholz).

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 14.5.2007 .....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Tomáši Scholzovi a vedoucímu Laboratoře molekulární taxonomie Miroslavu Oborníkovi za odborný dohled a vedení. Svojí práci bych asi nikdy nedokončila bez vydatné pomoci a duchaplného vedení Brabčáka (RNDr. Jana Brabce) a Ogara (Mgr. Aleše Horáka), díky nimž jsem tuto práci snad dotáhla až do zdárného konce.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>2</b>
1.1. <i>Charakteristika nadčeledi Opisthorchioidea .....</i>	2
1.2. <i>Charakteristika čeledi Opisthorchiidae a vybraných zástupců .....</i>	3
1.3. <i>Charakteristika čeledi Heterophyidae a vybraných zástupců .....</i>	6
<b>2. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>9</b>
3.1. <i>Materiál .....</i>	9
3.2. <i>Izolace DNA.....</i>	10
3.3. <i>Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....</i>	11
3.4. <i>Agarózová elektroforéza.....</i>	11
3.5. <i>Purifikace PRC produktů a izolace z gelu.....</i>	12
3.6. <i>Sekvence a sekvenční reakce .....</i>	13
3.7. <i>Analýza sekvencí.....</i>	13
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>15</b>
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>18</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>20</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>21</b>

# 1. ÚVOD

Plathelmini (ploštěnci) jsou velmi rozsáhlou skupinou bezobratlých, mezi které patří volně žijící i parazitičtí živočichové. Z této skupiny se nejlépe k parazitickému způsobu života adaptovali zástupci výhradně parazitické skupiny Neodermata. Jejich největší třídou jsou motolice (Digenea), jejichž definitivními hostiteli jsou obratlovci včetně člověka. Motolice jsou početnou skupinou složenou ze dvou řádů Diplostomatida a Plagiorchiida, a vyznačují se složitými životními cykly.

Klasifikace motolic je stále velmi obtížná a doposud získané poznatky o morfologii a životních cyklech tento problém zcela nevyřešily (Cribb a kol., 2003). Použití molekulárních dat však umožňuje lépe poznat přirozené vztahy mezi jednotlivými taxony. Zatím se jako jeden z nejspolehlivějších zdrojů dat ukázala být analýza sekvencí genu velké podjednotky rRNA (28S nebo LSU) (Olson a kol., 2003).

Motolice nadčeledi Opisthorchioidea se v současné době dělí do tří čeledí – Opisthorchiidae, Heterophyidae a Cryptogominidae (Olson a kol., 2003). Tyto tři taxony jsou značně morfologicky odlišné a jejich fylogenetické vztahy nejsou ještě zcela vyřešeny, neboť jen velmi malý počet druhů byl zahrnut do molekulárně-taxonomických analýz. Předpokládá se, že Cryptogominidae jsou bazální skupinou, avšak postavení čeledi Heterophyidae není jasné; čeleď Opisthorchiidae je patrně odvozeným taxonem (Olson a kol., 2003).

## ***1.1. Charakteristika nadčeledi Opisthorchioidea***

Některé druhy čeledi Heterophyidae a Opisthorchiidae patří mezi lékařsky významné parazity, kteří způsobují vážná onemocnění člověka (Jíra, 1998). K nákaze dochází konzumací syrového rybího masa, a proto je většina těchto nákaz rozšířena ve Skandinávii, na Sibiři a v některých oblastech jihovýchodní Asie. Tyto motolice jsou charakteristické trojhostitelskými životními cykly, ve kterých využívají plže a ryby jako prvního, respektive

druhého mezihostitele, a rybožravého ptáka nebo savce jako definitivního hostitele.

Vajíčko obsahující plně zformovanou larvu – miracidium – se do plže dostává pasivně (pozřením) a miracidium se líhne až v prvním mezihostiteli. Miracidium se po vylíhnutí zapouzdří a vytvoří sporocysty, ze kterých vznikají redie a z nich se líhnou cercárie. Cercárie opouští hostitele a samy si hledají druhého mezihostitele, kterým je ryba. Ve svalovině se cercárie opouzdří a změní v metacercárie, které musí být pozřeny konečným hostitelem. Dospělci se pak nejčastěji usazují ve žlučníku, žlučovodech nebo játrech, někdy se mohou vyskytnout i v pankreatu nebo ve střevě (čeled' Heterophyidae).

## **1.2. Charakteristika čeledi *Opisthorchiidae* a vybraných zástupců**

Nejvýznamnějšími cizopasníky člověka mezi zástupci čeledi *Opisthorchiidae* jsou motolice *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini* a *Clonorchis sinensis* (King a Scholz, 2001). Jsou to malé až střední motolice s plochým a protáhlým tělem se zúženou přední částí. Tegument je hladký. Obě přísavky jsou slabě vyvinuty; břišní přísavka se nachází v přední třetině těla. Střevní větve jsou dlouhé a dosahují až ke konci těla. Varlata jsou kulovitá, laločnatá nebo rozvětvená a jsou uložena šikmo nebo za sebou v zadní třetině těla. Vaječník je umístěn před varlaty. Vitellaria se skládají z četných folikulů uložených laterálně v hroznovitých útvarech. Děložní kličky jsou uloženy v prostoru mezi střevními větvemi od vaječníku po břišní přísavku. Pohlavní otvor se nachází u horního okraje břišní přísavky. Vajíčka jsou opatřena víčkem a mají na povrchu nepravidelnou vrásčitou strukturu viditelnou v rádkovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Struktura se liší podle druhu a slouží jako identifikační znak.

***Opisthorchis felineus*** (Rivolta, 1884) neboli motolice sibiřská byla poprvé objevena u kočky. První nálezy u člověka pocházejí z roku 1892 (Jíra, 1998). Dospělá motolice má kopinatý tvar, zúženou přední a oblou zadní část, je průsvitná a měří 7–12 × 2–3 mm. Obě přísavky jsou stejně velké. Vakovitý exkreceční měchýř sahá od exkrecečního póru k vaječníku.

Laločnatá varlata jsou umístěna za sebou v zadní části těla. Cirrus, cirrový vak a prostatické žlázy chybějí. Oválný vaječník je umístěn před varlaty. Vitellaria se skládají z četných folikulů uspořádaných ve dvou podélných pásech v přední a střední třetině těla.

Vajíčka jsou oválná a mají světle žlutohnědou barvu. Vajíčko je opatřeno víčkem (operkulem) a na opačném pólu má hrbolek. Vajíčka jsou vylučována plně vyvinutá, ale miracidia se líhnou až v prvním meziphostiteli, kterým je předožábrý plž *Bithynia leachi*, v němž se vyvíjejí sporocysty první a druhé generace, redie a cercárie (typ pleurolofocercárie), které dozrávají za dva měsíce. Mají dvojici pigmentových skvrn, 10 párů penetračních žláz a ocásek s vroubkovanou ocasní ploutvičkou (finfold). Druhým meziphostitelem, v němž se vyvíjejí metacercárieové cysty, jsou převážně kaprovité ryby (Cyprinidae). Kromě člověka jsou konečnými hostiteli kočka, pes, liška, prase a další rybožraví savci.

Podle odhadu je nákazou ohroženo asi 14 miliónů osob a 1,5 miliónu je nakaženo (Jíra, 1998). Většina případů pochází z bývalého SSSR. Intenzivní migrace obyvatel podporuje šíření nákazy a formování ohnisek. Nákaza probíhá alimentární cestou a zdrojem kontaminace prostředí vajíčky motolice jsou kočky, psi a lidé, jejichž výkaly se dostávají do vody.

***Opisthorchis viverrini*** (Poirier, 1886) je menší než předchozí druh, má hlubší laloky varlat, které jsou méně vzdálené od vaječníku, folikuly vitelárií tvoří méně trsů a jícen je delší. Vajíčka jsou menší, ale výrazně širší (19–29 × 11–19 μm) než u *O. felineus* (26–30 × 11–15 μm). Čerstvě vyloučená vajíčka obsahují miracidium, které se uvolňuje až po pozření plžem čeledi Bithyniidae (Jíra, 1998). Cercárie jsou také opatřeny ocáskem s ploutvičkou. Metacercárieové cysty mají oválný tvar, obsahují pohyblivé metacercárie, které jsou stočené do tvaru písmene C a mají nápadně tmavý obsah. Druhým meziphostitelem je ryba, především kaprovitá. Konečnými hostiteli jsou psi, cibetky a jiní masožraví savci.

Podle odhadu je nákazou ohroženo kolem 50 miliónů osob a nakaženo je asi 9 miliónů. Častý výskyt nákazy souvisí s tradiční úpravou syrových ryb v jihovýchodní Asii, především Thajsku a Laosu, a nízkou úrovní hygieny vedoucí k trvalé kontaminaci vody vajíčky (Jíra, 1998).

Metacerkárie se uvolňují z cysty v duodenu a postupují přes Vaterovy ampuly a dále do žlučových cest. Patologické změny závisí na intenzitě a trvání nákazy. Vzniká nadměrné bujení buněk stěny žlučovody, jejichž stěna se ztlušťuje a dochází k otoku žlučníku. Nákaza bývá často spojena se žloutenkou. Nákaza motolicemi *O. felineus* a *O. viverrini* postihuje především žlučník a játra, kde může v těžkých případech přispívat i ke vzniku karcinomu jater (Jíra, 1998).

*Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) je další z lékařsky významných parazitů patřících do čeledi Opisthorchiidae. Dospělý parazit má ploché průsvitné tělo narůžovělé barvy, jehož přední konec je silně zúžený a zadní zakulacený. Ústní přísavka je větší než břišní. Na přísavkách a kolem nich se nachází smyslové papily. Exkreční měchýř je dlouhý. Varlata jsou keříčkovitá a leží za sebou v zadní části těla. Mírně laločnatý vaječník je uložen ve středu těla. Motolice se vyskytuje ve žlučových cestách. Živí se sekrety sliznice v horních žlučových cestách a patrně přijímá i erytrocyty a leukocyty (Jíra, 1998).

Vajíčka jsou oválná, žluté barvy, mají operkulum a na pólu proti víčku je výběžek (knob). Miracidium se uvolňuje až po pozření vajíčka prvním mezihostitelem – ve většině případů vodním plžem z čeledi Hydrobiidae nebo Bythiniidae. Na předním pólu miracidia tvoří apikální papila trnový výběžek, kam vede krátká primární měchýřkovitá trávicí trubice. Tělo je vyplněno sekrečními žlázami, dvojicí plaménkových buněk a zárodečnými buňkami (Jíra, 1998).

Po průniku do mezihostitele migruje sporocysta do lymfatického sinu, kde dozrává. Vytvořené redie se uvolňují a dozrávají v lymfatickém sinu a v hepatopankreasu. Z každé

redie se vyvine 6-8 cercárií. Cercárie volně plavou ve vodě a hledají dalšího mezihostitele, do něhož aktivně pronikají povrchem těla. Během penetrace ztratí ocásek a po dosažení svaloviny vytvoří cystu ve svalovině ryb, většinou kaprovitých. Konečným hostiteli jsou kromě člověka pes, kočka, prase a potkan (Jíra, 1998).

Nákaza probíhá alimentární cestou. Larvy se uvolňují z cyst v duodenu a migrují pomocí přísavky proti proudu žluči do žlučového. Způsobují zvětšení žlučového a někdy pronikají až do pankreatu; mohou způsobit až karcinom jater (Jíra, 1998).

### ***1.3. Charakteristika čeledi Heterophyidae a vybraných zástupců***

Motolice čeledi **Heterophyidae** jsou střevními parazity ptáků a savců (včetně člověka). Pozorování taxonomicky významných struktur je velice obtížné kvůli jejich malé velikosti rychlé autolýze tkání po smrti hostitele. Řada taxonů je z toho důvodu popsána velmi nedostatečně. Jedním z nejpoužívanějších genů pro molekulární taxonomii se stal gen pro rRNA (28S). Ale i přes využití tohoto genu v molekulární taxonomii v této čeledi zůstávají četné nevyřešené problémy (Lee a kol., 2004).

Motolice uvedené čeledi jsou malé, oválné nebo hruškovité a žijí ve střevě rybožravých ptáků a savců. Od zástupců předchozí čeledi se liší velikostí (1–2,5 mm × 0,3–0,75 mm), jejich vajíčka mají také víčko (operkulum), nemají cirrus a cirrový váček; někteří zástupci této čeledě jsou vybaveni pouze jedním vaječným a jejich tegument je otrněný. Břišní přísavka je pozměněna v komplex s trny a sklerity – ventrogenitální komplex (Jíra, 1998). Uvolněná vajíčka obsahují zcela vyvinuté miracidium, které se uvolňuje po pozření první mezihostitelem. Stejně jako v případě motolic čeledi Opisthorchiidae, používají jako prvního mezihostitele plže, nejčastěji z čeledi Melaniidae. V plži se vyvíjí sporocysta, jedna nebo dvě generace redií a cercárie. Metacercárie, které se encystují ve sladkovodních rybách, pak musejí být pozřeny konečným hostitelem. Mezi zástupce čeledi patří významní cizopasnici člověka, jenž se nakazí pozřením metacercárií v syrovém rybím masu.



Nejznámějšími zástupci cizopasíciemi druhy u lidí jsou *Heterophyes heterophyes* a *Metagonimus yokogawai*, kteří způsobují méně častá lidská střevní onemocnění. Mimo střev mohou být lokalizováni i v jiných orgánech (především v srdci a CNS), kde se vytvářejí granulózní léze (Jíra, 1998).

Motolice egyptská, *Heterophyes heterophyes* (Siebold, 1852), je hruškovitého tvaru se zaoblenou zadní a užší přední částí. Ústní přísavka je menší než břišní. U okraje břišní přísavky se nachází genitální přísavka s chitinovými zoubkovitými trny. Oválná varlata se nacházejí v zadní části těla a vaječník je umístěn nad varlaty.

Vajíčka jsou hnědá, opatřená operkulem. Vylučují se s vyvinutým miracidie, které je pozřeno prvním mezihostitelem, plžem čeledí Melaniidae, Hydrobiidae nebo Thiaridae. Druhým mezihostitelem je sladkovodní ryba, v oblasti střeozemí – cípal hlavatý (*Mugil cephalus*) nebo tlamoun nilský (*Oreochromis niloticus*), v Japonsku jsou jejich hostiteli braktické ryby. Konečnými hostiteli jsou pes, kočka, šakal, liška a rybožraví ptáci např. luňák hnědý (*Milvus migrans*) nebo pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*) (Jíra, 1998).

Dospělé motolice druhu *H. heterophyes* se zachycují v tenkém střevě mezi klky, kde produkují vajíčka. Při masivní nákaze se ve střevní sliznici vytvoří zánětlivé infiltráty a povrchové nekrózy a povrchové nekrózy. Paraziti pouze vzácně pronikají střevní stěnou. Pokud k tomu dojde, vajíčka se tak dostanou do lymfatického a venózního oběhu. Na vzdálenějších místech, jako je mozek, srdce nebo mícha mohou pak vytvořit granulomatózní léze (Jíra, 1998).

*Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1913) je drobná motolice hruškovitého tvaru. Významným morfologickým znakem je umístění ventrální přísavky, která leží stranou od podélné osy těla. Genitální otvor splývá s okrajem břišní přísavky a genitální přísavka je nepatrná. Varlata jsou umístěna v zadní třetině. Vajíčka mají oválný tvar, mají operkulum a jsou světle žlutá.

Životní cyklus se příliš neliší od vývoje druhu *H. heterophyes*. Prvním mezihostitelem je plž rodu *Semisulcospira*. Druhými mezihostiteli jsou různé sladkovodní ryby – např. v Asii ryby *Plecoglossus altivelis*, *Salangichthys microdon*, *Zacco temmincki* a *Cyprinus carpio*. Konečným hostitelem se mohou kromě člověka stát rybožraví savci, kočka, pes a různé druhy ptáků – např. volavky rodu *Ardea* a *Egretta*, kalous (*Asio*), káně (*Buteo*), pelikán (*Pelecanus*) aj.

Nákaza probíhá alimentární cestou pozřením metacerkáriových cyst. Dospělé motolice se usadí v tenkém střevě – především v jejunu, dostávají se také do intravenózních prostorů a mechanicky rozrušují enterocyty. Na střevní sliznici dochází k deformaci klků, k edému, zánětlivé infiltraci stromatu a k redukci pohárkových buněk (Jíra, 1998).

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je:

1) Posoudit vhodnost genu pro velkou podjednotku rRNA(28S) a gen pro ITS2 pro molekulární taxonomii této dosud málo studované skupiny motolic.

2) Na základě srovnání sekvencí tohoto genu posoudit fylogenetické vztahy zástupců čeledí Heterophyidae a Opisthorchiidae.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1. Materiál

Byly studovány následující druhy motolic Opisthorchiidae a Heterophyidae:

- *Clonorchis sinensis* Verdun et Bruyant, 1908 (OPISTHORCHIIDAE), Russia (L. Filimonova)
- *Erschoviorchis lintoni* (Gower, 1939) (OPISTHORCHIIDAE) – *Larus canus* – Yakutia, Russia (L. Filimonova)
- *Metorchis bilis* (Braun, 1790) (OPISTHORCHIIDAE) – red fox, Berlin (R. Schuster)
- *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) (OPISTHORCHIIDAE) – cat, Berlin (R. Schuster)
- *Ascocotyle (Phagicola) diminuta* Stunkard et Haviland, 1924 (HETEROPHYIDAE) – gills of *Poecilia velifera*, cenote Chaamac, Celestún, Yucatán, Mexico, 13.10. 2004 (T. Scholz)
- *Centrocestus armatus* (Tanabe, 1922) Price, 1932 (HETEROPHYIDAE) – small intestine of experimental cat, 7 day after infection, 26.x.2004 (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)
- *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (HETEROPHYIDAE) – small intestine of experimental cat, 20 days after infection (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)
- *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924) (HETEROPHYIDAE) – small intestine of experimental hamster, 20 days after infection, China (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)

- *Heterophyes heterophyes* (Siebold, 1853) (HETEROPHYIDAE) – cat, Dubai ( R. Schuster)
- *Heterophyes nocens* Onji and Nishio, 1916 (HETEROPHYIDAE) – small intestine of experimental cat, 20 day after infection, 11.x. 2004 (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)
- *Heterophyopsis continua* (HETEROPHYIDAE) – small intestine of experimental cat, 20 day after infection, 8. x. 2004 (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)
- *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) Katsurada, 1912 (HETEROPHYIDAE) – small intestine of experimental cat, 24 day after infection, 11.viii. 2004 (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)
- *Pygidiopsis summa* (HETEROPHYIDAE) – small intestine of naturally infected cat, Korea (W.-M. Sohn, J.-Y. Chai)

### 3.2. Izolace DNA

K izolaci DNA byly používány vzorky fixované v 96-99% etanolu. Celková DNA byla extrahována pomocí komerčního kitu JETQUICK Tissue DNA Spin Kit firmy GENOMED. Vzhledem k poměrně malé velikosti vzorků byla použita veškerá tkáň, ze které byl poté odstraněn etanol vysušením při teplotě 37°C po dobu 2-10 hodin.

Izolace byla provedena pomocí kitu JETQUICK podle manuálu. Tkáň zbavená etanolu byla zhomogenizována v 200 µl pufru T1 a poté zlyzována přidáním 25 µl proteinázy K a inkubací při teplotě 56°C s občasným protřepáváním po dobu 2-3 hodin. Po této době bylo přidáno 200 µl pufru T2 a vzorek byl promíchán a inkubován 10 minut při 70°C. Následovalo ochlazení roztoku po dobu 1 minuty a přidání 200 µl 96% etanolu. Celá směs byla přenesena do Spin kolony a zcentrifugována při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Následovalo promytí kolony nejdříve 500 µl pufru TX (centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm) a poté 500 µl pufru T3 při stejných podmínkách. Nakonec byl odstraněn zbytek pufru dodatečnou centrifugací

(2 minuty/13 000 rpm). Genomová DNA byla poté eluována přidáním 200 µl bidestilované H<sub>2</sub>O a po uplynutí 1 minuty centrifugací při 13 000 rpm po dobu 2 minut. Izolovaná DNA byla uskladněna při teplotě -20°C.

### 3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Gen pro ribozomální RNA (28S) byl aplikován PCR pomocí specifických primerů pro *Digenea* (viz tab.1). Reakční směs připravená do 0,5 ml eppendorfek obsahovala 5 µl 10 × Taq PCR pufru (Top-Bio), 2 µl 2,5 mM dNTP (Top-Bio), 0,5 µl forward a 0,5 µl reverse primeru, 0,4 µl Taq purple DNA polymerázy (Top-Bio) a 4 µl genomové DNA. Tato směs byla doplněna sterilní bidestilovanou vodou do objemu 50 µl.

**Tabulka 1.** Použité primery.

Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	směr
LSU		
LSU5	GAC KAC CCG CTG AAY TTA AGC A	→
360F OPISTO	CCG CTC AGA GGT AAA CGG GTG GAG	→
400F OPISTO1	GCT GGT GAG TKT KGT TTG RGC TTG G	→
400R OPISTO2	CCA AGC YCA AAC MAM ACT CAC CAG C	←
900F OPISTO1	GTG GTG TTG CGG TAG ACT ATC C	→
900R OPISTO2	GGA TAG TCT ACC GCA ACA CCA C	←
1500R OPISTO	ACT TGG CAC TCA CAT TCA ACG CC	←
ITS 2 *		
Proteo 1	CGG TGG ATC ACT CGG CTC	→
Proteo 2	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	←

\*primery podle Škeříková a kol. (2004)

### 3.4. Agarózová elektroforéza

Elektroforéza byla použita ke kontrole úspěšnosti izolace genomové DNA z tkáně a ke kontrole velikosti fragmentů DNA po PCR amplifikaci a byla prováděna na 1% agarózovém

gelu. Gel byl připraven rozpuštěním 0,35 g agarózy (Serva) v 35 ml 0,5 × TAE pufru (50 × TAE pufr: 242 g TRIS, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, 1 000 ml H<sub>2</sub>O, pH = 8,0) rozehřátím v mikrovlnné troubě. Po ochlazení na cca 50°C byl nalit do připravené formy s vloženými hřebeny a ponechán přibližně 20 minut tuhnout. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetického tanku a přelit puftrem (0,5 × TAE). Do vzniklých jamek pak bylo nanášeno požadované množství vzorků, v případě PCR produktů 5 µl pro kontrolu amplifikovaných úseků. Pro odečtení velikosti produktu byl použit marker 1kb DNA Ladder (New England Biolabs, Inc.). Elektroforéza probíhala při napětí 70 V po dobu 30–45 minut.

Přítomnost a velikost produktu byla detekována na UV transiluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Fotodokumentace gelů byla pořizována pomocí digitální kamery a počítačového programu Kodak Digital Science 1D.

### ***3.5. Purifikace PRC produktů a izolace z gelu***

U většiny vzorků byla použita pouze metoda purifikace PCR produktů, pouze u několika vzorků 4/18 i izolace z gelu. Při PCR reakci se vytvořilo více nespecifických produktů. K purifikaci byl použit kit firmy QIAquick a postup byl proveden podle přiloženého manuálu. K PCR produktu byl přidán pětinasobný objem produktu reakce, po naředění puftrem PBI tedy 250µl. Směs byla přenesena do 2 ml QIAquick spin kolon a centrifugována 30–60 sekund. Dále byla kolona promývána 0,75 ml puftrem PE s centrifugována 30–60 sekund. Zbytek pufru byl odstraněn dodatečnou centrifugací po dobu 60 sekund. Amplifikovaná DNA byla poté eluována přidáním 50 µl elučního pufru a po uplynutí 1 minuty centrifugací při 13 000 rpm po dobu 60 sekund. Izolovaná DNA byla uskladněna při teplotě 4°C

K izolace z gelu byl použit kit firmy QuickClean 5M Extraction kit. Po vyříznutí amplifikovaných úseků požadované velikosti byl vyříznutý gel zvážen a byl k němu přidán

trojnásobný objem Binding Solution II (100 mg = 100 µl). Směs byla inkubována 10 minut při teplotě 50°C a občas promíchána. Po inkubaci byl přidán jeden objem izopropanolu a směs byla přenesena do QuickClean kolon a centrifugována při 12 000 rpm 30 sekund. Kolona se dále promývala 500 µl promývacího roztoku a byla centrifugována při 13 000 rpm 1 minutu. Amplifikovaná DNA byla eluována 30 µl elučního pufru a centrifugována 1 min při 12 000 rpm.

### ***3.6. Sekvence a sekvenční reakce***

Pro správné provedení reakce bylo nutné znát koncentraci PCR produktu. Ta byla vypočítána podle absorbance zjištěné při spektrofotometrii (BioPhotometr Eppendorf).

Reakční směs obsahovala 0,5 µl primeru, 300 – 390 ng přečištěného PCR produktu a byla doplněna do celkového objemu 16 µl bidestilovanou vodou. Genové fragmenty byly sekvenovány pomocí CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter) nebo ABI PRISM® BIG DYE® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Sekvenční reakce a sekvence byla provedena v laboratoři genomiky. Použité sekvenační primery viz tabulka č. 1.

### ***3.7. Analýza sekvencí***

Při práci s molekulárními daty byly použity programy DNASTAR ver. 5.06 (DNASTAR, Inc.). Program EditSeq sloužil jako textový editor sekvencí, v programu SeqManII byly komplementární sekvence spojeny, upraveny a byla z nich vytvořena konsenzuální sekvence. Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pro vytvoření aligmentu byl použit program Mafft ver. 5.8 (Katoha a Toh, 2005). Případné úpravy aligmentu byly provedeny v programu BioEdit ver. 7.0.5.2 (Hall, 1999).

Veškerá data byla analyzovaná metodou maximální parsimonie (MP) a maximální věrohodnosti (maximum likelihood, ML) v programu PAUP\* ver.4.0b10 (Swofford, 2002). Nejvíce parsimonní stromy byly vyhledány algoritmem branch-and-bound, který byl použit i pro bootstrapovou podporu MP topologie (1000 opakování). Hodnota Akaike information criterion (AIC), získaná v programu Modeltest ver. 3.7 (Posada a Crandall, 1998) určila nejhodnější model evoluce pro daný dataset, na jehož základě byla pomocí heuristického vyhledávání branch-swapping algoritmem tree-bisection-reconnection (TBR) spočtena nejvěrohodnější topologie. Stejný model i postup byl zvolen i pro bootstrapová opakování (opět 1000 replikací). K vizualizaci výstupů z fylogenetických analýz byl použit TreeView ver. 1.6.6 (Page, 1996).

**Tabulka č. 2.** Použité sekvence z Genové banky.

Čeď	Druh	Číslo v Genové bance
Cryptogonimidae	<i>Caecincola parvulus</i>	AY222231
	<i>Siphodera vinalwardsii</i>	AY222230
	<i>Mitotrema anthostromatum</i>	AY222229
Heterophyidae	<i>Cryptocotyle lingua</i>	AY222228
	<i>Galactosomum lacteum</i>	AY222227
	<i>Haplorchoides</i> sp.	AY222226
Opisthorchiidae	<i>Amphimerus ovalis</i>	AY116876
	<i>Opisthorchis viverrini</i> (ITS2)	AF408147



## 4. VÝSLEDKY

V průběhu této studie byly získány celkem dvě částečné sekvence genu 28S rRNA (čeleď Opisthorchiidae - *Clonorchis sinensis*, čeleď Heterophyidae - *Ascocotyle (Phagicola) diminuta*) a čtyři částečné sekvence ITS2 (čeleď Opisthorchiidae - *C. sinensis*, čeleď Heterophyidae - *Ascocotyle (Phagicola) diminuta*, *Centrocestus armatus*, *Heterophyes heterophyes*)(viz tabulka č. 3). U zbývajících zástupců (čeleď Opisthorchiidae - *Erschoviorchis lintoni*, *Metorchis bilis*, *Opisthorchis felinus*, čeleď Heterophyidae - *Haplorchis pumilio*, *H. taichui*, *Heterophyes nocens*, *Heterophyopsis continua*, *Metagonimus yokogawai*, *Pygidiopsis summa*) se nepodařilo získat PCR produkty.

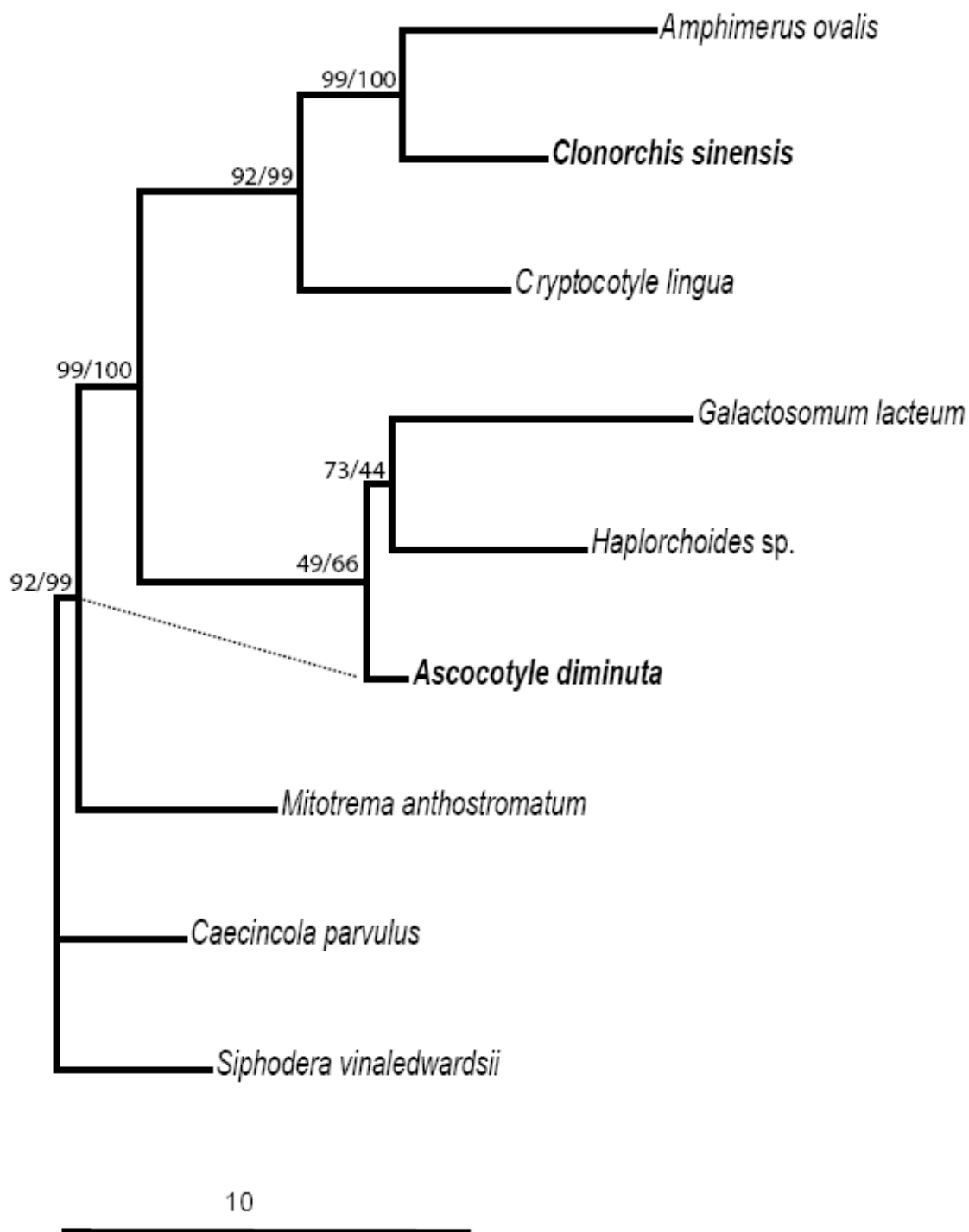
Nově získané sekvence byly porovnány se sekvencemi sedmi druhů z Genové banky (viz tabulka č. 2) od druhů obou studovaných čeledí a zástupců třetí čeledi Cryptogonimidae, která sloužila jako outgroup, neboť je dnes považovaná za bazální skupinu nadčeledi Opisthorchioidea (Olson a kol., 2003). Celá matice byla tvořena celkem devíti sekvencemi 28S rRNA genu. Získané sekvence ITS2 nebyly použity pro nízké zastoupení relevantních taxonů v Genové bance.

Analýzou matice metodou maximální (MP) byly získány dva stejně dlouhé kladogramy o délce 485 změn, které se lišily pozicí druhu *Ascocotyle (Phagicola) diminuta* (Heterophyidae) (obrázek č. 1). Naproti tomu druhá analýza metodou maximální věrohodnosti (ML) přiřadila *A. (Phagicola) diminuta* jako sesterský druh *Galactosomum lacteum*.

Druh *Cryptocotyle lingua*, který se podle morfologických znaků řadí do čeledi Heterophyidae, byl v obou provedených analýzách zařazen do čeledi Opisthorchiidae. Toto zařazení naznačuje možnou parafylii čeledi Heterophyidae.

**Tabulka č. 3.** Délka získaných sekvencí.

Druh	Délka sekvence (bází)
<b>LSU</b>	
<i>Clonorchis sinensis</i>	1321
<i>Ascocotyle (Phagicola) diminuta</i>	
3' konec	548
5'konec	475
<b>ITS2</b>	
<i>Clonorchis sinensis</i>	536
<i>Ascocotyle (Phagicola) diminuta</i>	487
<i>Centrocestus armatus</i>	490
<i>Heterophyes heterophyes</i>	510



**Obrázek č.1**

Strom zkonstruovaný metodou maximální parsimonie v programu PAUP\* ver.4.0b10. Délka stromu 485. HI = 0.2515, RI = 0.5719. Bootstrap – počet opakování 1000. Nově získané sekvence jsou tučně zvýrazněné.

## 5. DISKUSE

Cílem této práce bylo posoudit vhodnost genů pro velkou podjednotku rRNA (28S) a ITS2 a získat nové sekvence této málo studované skupiny. Bohužel, z důvodu nízkého zastoupení relevantních taxonů v Genové bance není možné ITS2 zařadit, a proto nebyl tento marker do práce zahrnut. Po analýze získaných sekvencí se jako dostatečně informativní ukázal gen pro velkou podjednotku (LSU).

Nejednoznačné postavení *Ascocotyle (Phagicola) diminuta* je s největší pravděpodobností způsobeno chybějící střední částí sekvence. Porovnání sekvencí rovněž naznačilo možnou parafylii čeledi Heterophyidae, kterou diskutoval již Olson a kol. (2003). S rostoucím počtem osekvenovaných zástupců nelze vyloučit narůstající množství parafyletických taxonů.

Nízký počet získaných sekvencí (z celkového množství 13 vzorků) souvisí s následujícími metodickými problémy:

1. Izolace DNA ze vzorků, které byly zřejmě špatně nafixovány (*Erschoviorchis lintoni*, *Opisthorchis felineus*, *Metorchis bilis*). Je pravděpodobné, že použité fixáže, např. denaturovaný etanol nebo formalín, mohly poškodit DNA.
2. Nepodařilo se získat dostatečné množství DNA ze vzorků některých motolic čeledi Heterophyidae, kteří jsou velmi malých rozměrů (kolem 500  $\mu\text{m}$ ) a u některých druhů byly k dispozici pouze jejich larvální stádia (metacerkárie).
3. Po optimalizaci PCR pro primery specifické pro motolice (viz Olson a kol., 2003) se jako další potíž projevila malá specifita těchto primerů. Místo sekvencí odpovídajících vybraným zástupcům se po kontrole zjistilo, že primery nasedají i na konzervativní úseky nematofágních hub, které jsou shodné s úseky zvolenými pro Digenea. Kontaminace houbami byla patrně způsobena již při izolaci DNA, kdy vybraní

zástupci pravděpodobně už obsahovali spory hub a jejich DNA byla tedy izolována současně s DNA motolic. Po vzájemném porovnání známých sekvencí motolic nadčeledi Opisthorchioidea se sekvencemi nematofágních hub a vybrání vhodnějších úseků byly navrženy primery specifické pro skupinu Opisthorchioidea.

4. Jedním z neobtěžněji řešitelných problémů v této práci byl nedostatek informací o sekvencích příbuzných. V Genové bance existuje velké množství sekvencí motolic (Digenea). Tyto sekvence, zejména lékařsky významných motolic z jihovýchodní Asie jako je *Opisthorchis viverrini* a *Clonorchis sinensis* (viz např. Lee a Huh, 2004; Lee a kol., 2004), jsou pouze částečné, a proto prakticky nepoužitelné. Navíc je většina sekvencí ITS2 a LSU těchto motolic v Genové bance velice krátkých –kolem 490 bází u ITS2 a méně než 400 bází u LSU.

Dalšími úkoly případné budoucí práce v magisterském studiu je vyřešení některých metodických problémů zmíněných v této práci, získání nových sekvencí a případné potvrzení nebo vyvrácení možné parafylie čeledi Heterophyidae.

## 6. ZÁVĚR

1. Ze třinácti studovaných vzorků byly získány dvě částečné sekvence LSU (*Clonorchis sinensis*, *Ascocotyle (Phagicola) diminuta*) a čtyři částečné sekvence ITS2 (*Ascocotyle (Phagicola) diminuta*, *Centrocestus armatus*, *Clonorchis sinensis*, *Heterophyes heterophyes*).
2. Délka sekvencí LSU pro *Clonorchis sinensis* je 1321 bází. U zástupce *Ascocotyle (Phagicola) diminuta* byly osekvenovány dva úseky z 3' konce o délce 548 bází a z 5' konce s délkou 475 bází, prostřední část se zatím nepodařilo amplifikovat.
3. Sekvence pro ITS2 měly následující délku: *Clonorchis sinensis* 536 bází, *Ascocotyle (Phagicola) diminuta* 487 bází, *Centrocestus armatus* 490 bází, *Heterophyes heterophyes* 510 bází.
4. U dalších studovaných zástupců obou čeledí (celkem 9 druhů) byly pokusy o získání sekvencí neúspěšné, pravděpodobně v důsledku špatné fixací materiálu, a tím poškození DNA, nebo malou specifitou primerů.
5. Vzhledem k problémům s kontaminací nematofágními houbami byly navrženy specifické primery pro nadčeleď Opisthorchioidea.
6. Na základě nově získaných sekvencí pro LSU a sekvencí z Genové banky byl sestaven kladogram. Získaný strom naznačuje parafylii čeledi Heterophyidae, neboť druh *Cryptocotyle lingua*, dosud řazený do této čeledi, je umístěn mezi opisthorchiidními motolicemi.

## 7. LITERATURA

- Cribb, T.H., Bray, R.A., Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., 2003. Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. *International Journal for Parasitology* 54: 65 – 308.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 – 98.
- Jíra J. 1998. *Lékařská helmintologie*. Galén, Praha, 139 pp.
- Katoha, K., Toh, M., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511 – 518.
- King, S., Scholz, T., 2001. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. *Korean Journal of Parasitology* 39: 145–148.
- Lee S.-U., Huh S., 2004. Variation of nuclear a mitochondrial DNAs in Korea a Chinese isolates of *Clonorchis sinensis*. *Korean Journal of Parasitology* 42: 145 – 148
- Lee S.-U., Huh S., Sohn W.-M., Chai J.-Y., 2004. Sequence comparisons of 28S ribosomal DNA and mitochondrial cytochrom c oxidase subunit I of *Metagonimus yokogawai*, *M. takahashii* a *M. miyatai*. *Korean Journal of Parasitology* 42: 129 – 135.
- Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., 2003. Phylogeny and classification of Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33: 733 – 755.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Application in the Biosciences* 12: 357 – 358.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution, *Bioinformatics* 14: 817 – 818 .
- Swofford, D.L., 2002. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Škeříková, A., Hypša, V., Scholz, T., 2004. A paraphyly of the genus *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808 (Cestoda: Pseudophyllidae) inferred from internal transcribed spacer-2 and 18S ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 90: 612 – 617.