

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Životní cyklus a diverzita motolic čeledi Opecoelidae na Svalbardu

Bakalářská práce

David Novotný

Školitel: Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Školitel specialista, konzultant: RNDr. Eva Myšková

České Budějovice 2019

Novotný, D., (2019): Životní cyklus a diverzita motolic čeledi Opecoelidae na Svalbardu [Life cycle and diversity of Opecoelidae (Digenea) in Svalbard, bc. thesis, in Czech.]- 46 p. University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

The study was aimed to determine the diversity and species identification of trematodes family Opecoelidae (Digenea) in sculpins living in shallow waters of Billefjord (Svalbard). Second aim was to determine the affinity between the partenogenetic parasitic larval stages living in whelks (Buccinidae) and adult stages living in sculpins to describe their life cycle. During the work, there were used molecular methods using DNA and phylogeny analysis to identify the species of collected trematodes.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval 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 bakalářské 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, 11. 4. 2018

David Novotný

Děkuji školiteli své bakalářské práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi CSc., RNDr. Evě Myškové za skvělé vedení mojí práce, cenné rady, které mi mnohokrát pomohly a hlavně za trpělivost, se kterou mě vedli skrze práci v terénu, laboratoři či při samotném psaní bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Anně Faltýnkové Ph.D. za pomoc hlavně při sestavování metodiky a s interpretací výsledků a také se zapůjčením karmínu na barvení. Také můj velký dík patří celému týmu Centra polární ekologie pod vedením doc. Ing. Josefa Elstera CSc. za to, že mi umožnili navštívit a provádět terénní část práce na odlehlém souostroví Svalbard a také za možnost pracovat v laboratořích CPE. Také bych rád poděkoval všem, kteří mi pomohli se sběrem a transportem vzorků, bez vaší podpory bych doteď vymotával ryby ze sítě. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Ivanovi Fialovi Ph.D. za pomoc a rady s editací sekvencí a fylogenetickými analýzami. V neposlední řadě bych také chtěl poděkovat mému otci, že si i ve svém krátkém volném čase, část svého čas vyhradil na opravu mé práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1. Třída Trematoda	2
1.2. Vývojový cyklus.....	3
1.3. Fylogeneze motolic.....	6
1.3.1. Diplostomida	7
1.3.2. Plagiorchiida	7
1.4. Opecoelidae	10
1.5. Fellodistomidae	13
1.6. Hostitelé.....	15
1.6.1. První meziphostitel.....	15
1.6.2. Druhý meziphostitel.....	17
1.6.3. Definitivní hostitel.....	18
2. CÍLE PRÁCE.....	20
3. MATERIÁL A METODY	21
3.1. Sběr vzorků.....	21
3.2. Barvení železitým acetokarmínem.....	22
3.3. Molekulární analýza.....	23
3.4. Fylogenetické analýzy.....	24
4. VÝSLEDKY.....	25
4.1. Nalezené motolice čeledi Opecoelidae Ozaki, 1925.....	26
4.2. Nalezené motolice čeledi Fellodistomidae Nicoll, 1909.....	29
4.3. Fotografická dokumentace.....	33
5. DISKUSE.....	35
6. ZÁVĚR.....	38
7. LITERATURA.....	39
8. PŘÍLOHY	45

1. ÚVOD

Parasitismus je jedna z nejrozšířenějších životních strategií mezi terestrickými, sladkovodními i marinními druhy organismů. Během evoluce téměř u všech velkých skupin organismů nezávisle vznikaly a zanikaly parazitické formy, které využívali určitých výhod s parazitismem spojených. Jakýkoliv organismus může sloužit jako mikrohabitat a ochrana před vnějším nestabilním prostředím pro jednoho či více druhů parazitů, kteří v něm sídlí. Jelikož většina parazitů jsou hostitelsky specifictí, ať je to z důvodu dokonalého přizpůsobení se jeho obranným mechanismům, či snížení kompetičního tlaku. Předpokládá se, že nezanedbatelnou část diverzity tvoří právě paraziti, kteří zastupují 40%-50% veškerých druhů (Poulin & Morand 2000). Paraziti ovlivňují fitness či v některých případech dokonce i chování svého hostitele a za předpokladu, že jakýkoliv živočich může být potenciálním hostitelem, hrají nezastupitelnou roli v ekologii celého společenstva či ekosystému, na který jsou jejich hostitelé vázáni. Nejlépe lze tuto roli studovat v oblastech s nízkou druhovou diverzitou organismů, jelikož zastoupení jakéhokoliv druhu má na okolní společenstvo výraznější vliv. Předpokládá se zde nižší míra rušivých elementů ovlivňujících výsledky studie. Lze předpokládat, že s nižší druhovou diverzitou organismů koreluje nižší druhová diverzita parazitů (Hoberg et al. 2013; Dobsen et al. 2008).

Ideálním místem pro studium diverzity organismů a jejich vlivu na ekosystém (nevyjímaje člověka) se staly polární oblasti. Geograficky jsou vymezeny vyšší zeměpisnou šířkou než 60°. Jde o nehostinná území, s průměrnou teplotou ovzduší pod bodem mrazu a teplotou hladiny moře kolem 2 °C (měřeno za posledních 10 let) (seatemperature.info). Kvůli nízkým teplotám, krátkému vegetačnímu období, trvale zmrzlým půdám jsou zdejší podmínky pro život velice obtížné pro osidlování novými druhy. Díky dříve zmíněným faktorům se zde trvale udržuje nízká druhová diverzita a jednodušší potravní vztahy v ekosystému.

Oceány a moře polárních oblastí jsou charakteristické nízkou konstantní teplotou napříč celým vodním sloupcem. Netvoří se zde výrazná stratifikace vrstev, která by tvořila bariéru pro volné proudění živin napříč celým vodním sloupcem. Vzhledem k vyššímu zastoupení živin v eutrofní vrstvě a primární produkci během vegetačního období, menším teplotním změnám jsou podmínky v moři ideální pro rozvoj vyšší druhové diverzity organismů, než je tomu známo v terestrických oblastech obdobné zeměpisné šířky.

Svalbard je souostroví nacházející se na 78° severní šířky a 12°-32° východní délky. Ze západu je omýván teplými mořskými proudy přicházejícími z jihu, zatímco východní a jižní část je ochlazována studenými proudy z Barentsova moře a Severního ledového oceánu. Většinu pobřeží Svalbardu tvoří zálivy a ledovcová údolí nazývané fjordy, které byly při stoupání mořské hladiny zality vodou a kde se teď na skalnatém či bahnitém podkladu rozkládají chaluhoité porosty (*Fucus*, *Laminaria*...) sloužící jako biotop pro velké množství charakteristických živočichů. Mezi nejčastější obyvatele chaluhoitých porostů patří korýši např. blešivci (*Gammarus setosus*, *Orchomenella minuta*), krabi (*Hyas araneus*), dále také mnoho druhů kroužkovců (Polychaeta), ostnokožců (hvězdice *Marthasterias glacialis*, hadice

Ophiopeten serriceum, ježovka *Strongylocentrotus droebachiensis*...). Z měkkýšů se zde nacházejí hlavně draví předožábří plži surmovky (Buccinidae) či býložravá *Margarites olivaceus*, zadožábří plž *Dendronotus robusta* a z mlžů *Mya truncata* či *Hiatella arctica*. Dále se zde nacházejí nespočetná množství přisedlých mechovek a žahavců. Z ryb se v litorální zóně objevují hlavně ryby z čeledi vrankovití (Cottidae), treskovití (Gadidae), platýsovití (Pleuronectidae), sled'ovití (Clupeidae) a pak také méně zastoupení vlkoušovití (Anarhichadidae) či okouníkovití (Sebastidae) (pítevní protokoly; Róžycki 1993). V neposlední řadě také nesmíme zapomenout na parazity obývajících předešle vyjmenované skupiny živočichů. Ve výsledku tvoří tato rozmanitá škála organismů komplexní ekosystém litorálních vod, kde se vytváří složitá síť potravních či symbiotických vztahů mezi organismy.

1.1. Třída Trematoda Rudolphi, 1808

Trematoda neboli motolice patří do skupiny ploštěnců (Platyhelminthes Claus, 1887). Ploštěnci jsou bilaterálně souměrní, nesegmentovaní a dorsoventrálně zploštělí bezobratlí živočichové. Jde o acoelomátní živočichy, tedy že v sobě nemají žádnou tělní dutinu. Nemají žádnou cévní či dýchací soustavu a výměnu plynů provádí skrze pokožku pomocí difuze. Také živiny vnikají do buněk difuzí z okolní tkáně. Trávicí trubice ploštěnců bývá slepě zakončená, někdy i výrazně rozvětvená, což napomáhá difuzi živin. Má pouze jeden otvor na přijímání potravy a vyměšování nestrávených zbytků. Mezi pokožkou tvořenou epidermálními buňkami a trávicí trubicí je prostor tvořen hlavně parenchymatickými buňkami, pojivovou tkání a kolagenovými vlákny, které zajišťují uchycení svalů. Mezi buňkami probíhají kanálky s proudící tělní tekutinou, která buď přivádí živiny či odvádí zplodiny k protonefridiím, skládajících se z plaménkových bičíkatých buněk a odvodného kanálku, který odvede zplodiny do vnějšího prostředí (Walker & Anderson 2001). Většina mořských a parazitických skupin ploštěnců si udržuje pomocí difuze či vylučování konstantní koncentraci solí v těle jako je v okolním prostředí. Nervová soustava je gangliová s párovým gangliem v hlavové části, ze které vybíhají nervová vlákna do celé části těla. Ve většině případů jde o hermafrodity se samčími tak samičími pohlavními orgány zároveň. Neparazitické formy ploštěnců se řadí do skupiny Turbellaria Ehrenberg, 1831, která však není monofyletická a není taxonomicky úplně korektní (Volf et al. 2007).

Dohromady s parazitickými skupinami tasemnice (Cestoda) a žábrolísti (Monogenea) tvoří monofyletickou skupinu Neodermata Ehlers, 1985. Larvální stádia neodermát mívají na sobě epidermis aspoň částečně se skládající také z ciliátních buněk sloužících k pohybu larvy. Pod epidermální vrstvou bývá vrstva extracelulárního materiálu oddělující epitelovou tkáň od pojivové nazývaná jako lamina basalis. Pod touto vrstvou jsou mezi podpovrchovou svalovinou vmezežené buňky tzv. neoblasty. Ty během přeměny larvy na parazitické stádium nahradí ciliátní epidermis a vytvoří nový syncytiální epidermis neboli neodermis či tegument. Jde o 7- 16 µm silnou bezjadernou vrstvu, u které nejsou patrné mezibuněčné membrány. Do hlubších tělních vrstev vnikají cytoplasmatické spoje lemovány

mikrotubuly a napojují se na jaderné buňky syncytia- subtegumentální buňky (bývalé neoblasty). U motolic se také v tegumentu často vyskytují tegumentální trny. Hlavní funkcí neodermis je aktivní přenos živin a také ochrana těla před vnějším prostředím. V případě motolic sídlících primárně v trávicím traktu obratlovců mohou hlavní problém představovat trávicí tekutiny či imunitní systém hostitele (Volf et al. 2007). Svalová soustava je tvořena vnější okružní vrstvou a vnitřní podélnou vrstvou a ke středu se mění v šikmou svalovinu. U přichytných orgánů či pohlavních vývodů je přítomna mohutnější svalovina. Častá je také bohatá inervace přichycovacích orgánů a také hltanu. Dalším přizpůsobením se parazitickému způsobu života je např. redukce či úplná ztráta trávicí trubice, jak je tomu např. u tasemnic, či změna velikosti parazita, aby se přizpůsobil ohraničenému prostředí, ve kterém parazit sídlí. Také většina neodermát, kvůli nízké pravděpodobnosti přenosu potomstva na další hostitele, přešla na vyšší produkci pohlavních buněk, což obnáší také komplexnější a produktivnější rozmnožovací aparát. Samčí orgánová soustava se skládá z různého počtu testes. Z testes jsou spermie odváděny chánovody přecházejícími v semenný vak. Semenný vak poté ústí také s vývody prostatických žlázek do penisu také nazývaného cirrus. Ten bývá často uložený v cirrově vaku. Cirrus je umístěn v blízkosti samčího pohlavního vývodu. Často bývá obalen bílkovinnými ostny.

Do samčího pohlavního ústrojí patří většinou jedno germarium, také nazývané ovarium, které produkuje vajíčka (oocyty). Ty následně putují vejcovodem do orgánu nazvaného ootyp, kde se nachází také vývod receptacula seminis, které slouží k uchovávání a postupnému uvolňování spermií po kopulaci. Také do ootypu ústí vývody skořápečných žlázek (Mehlisovy žlázy) a vitelária. Vitelarium složené z vitelinních folikulů jsou jedním z nejvíce zastoupených orgánů v těle, kterých se tu obvykle nacházejí v přepočtu několika desítek až stovek. V ootypu probíhá oplození vaječné buňky a následnému obalení vitelocyty (žloutkové buňky) vyprodukovanými ve vitelinních folikulech a skořápečným materiálem, pravděpodobně z Mehlišových žláz, které však výhradně slouží k vyměšování sekretu, který usnadňuje putování vajíčka uterem. Z ootypu také ústí takzvaný Laurerův kanál, který zpravidla slouží jako vývod přebytečného materiálu do vnějšího prostředí. Uterus je dlouhý trubicovitý orgán s množstvím kliček, kde vajíčka dozrávají. Uterus ústí do tzv. genitálního atria, kam také ústí vývody samčího pohlavního ústrojí. Spermie a vajíčka pak opouštějí tělo genitálním pórem (Volf et al. 2007).

1.2. Vývojový cyklus

U neodermát zahrnuje často velice komplikovaný vývojový cyklus mnoho fenotypicky rozdílných stádií s odlišnou strategií přežití zahrnujících volně žijící stadia, jejímž hlavním cílem je nalezení a vniknutí do hostitele či parazitická stadia u kterých většinou dochází k rozmnožování jedinců. U většiny Neodermat (kromě Monogenei) zahrnuje vývojový cyklus střídání dvou či více hostitelů, kdy jeden z nich je definitivní hostitel, kde parazit pohlavně dospívá a kde probíhá pohlavní rozmnožování a produkce vajíček. Další hostitelé jsou tzv. meziphostitelé, kde se parazit buď rozmnožuje nepohlavně,

nebo zde vyčkává ve formě dormantního stádia, než se dostane do svého definitivního hostitele, kde se již parazit množí pohlavně.

Prvním stádiem vývojového cyklu motolic je oplozené vajíčko, které se pasivním způsobem dostává do vnějšího prostředí. Ve vajíčku se ve vnějším prostředí či přímo v prvním mezihostiteli (např. Schistosomatidae) vyvíjí larva miracidium. Jde o 0,01- 0,35 mm dlouhou, ciliátní larvu nepřijímající potravu. Z vajíčka se dostává buď otevřením vaječného víčka tzv. operculum či prasknutím stěny skořápky u inoperkulátních vajíček (operculum postrádajících). Líhnutí miracidii je zpravidla iniciováno vnějšími faktory jako např. teplota, vyšší obsah kyslíku, světlo či změna osmotického tlaku. Larva je pokryta destičkami ciliátních buněk, které slouží k pohybu larvy ve vodním prostředí. Mezi těmito destičkami se nacházejí mezibuněčné valy. Dále se na povrchu miracidia nacházejí senzorycké papily, které slouží jako receptory k aktivnímu vyhledávání prvního mezihostitele. V přední části larvy se většinou nachází apikální papila propojená se žlázami obsahujícími proteolytické enzymy či stylet sloužící k penetraci do prvního mezihostitele. Uvnitř larvy se nachází shluk zárodečných buněk, sloužících k následnému vývoji uvnitř prvního mezihostitele. V centrální části larvy se nachází nervové ganglion a v některých případech i pigmentovaná oční skvrna sloužící k fotorepci. Také tu jsou přítomny protonefridie. Miracidia nepřijímají potravu a jejich životnost se počítá v řádu hodin při nenalezení vhodného mezihostitele. U většiny motolic bývá prvním mezihostitelem měkkýši (většinou plži, méně pak mlži), ale v některých případech také může jít o mnohoštětinatce (Aporocotylidae Odhner, 1912). Uvnitř mezihostitele dochází k interakcím s hostitelským imunitním systémem, a proto bývá většina druhů motolic hostitelsky specifických, tedy zaměřených jen na zúžený okruh hostitelů skládající se z jednoho či několika příbuzných druhů. Po penetraci do mezihostitele se miracidium zbavuje povrchové ciliátní vrstvy a z mezibuněčných valů vzniká povrchové syncytium tzv. neodermis a z miracidia se stává první parazitické stádium tzv. mateřská sporocysta.

Mateřská sporocysta tvarově připomíná oválný protáhlý vak bez jakéhokoliv otvoru pro příjem či výdej metabolicky aktivních látek. Příjem živin a vody tedy probíhá difúzí či aktivním transportem přes neodermis přímo z tělních tekutin mezihostitele. Ze zárodečných buněk přítomných u miracidia se uvnitř mateřské sporocysty vytváří další geneticky totožná generace (klony) avšak morfologicky rozdílná. V případě druhé generace se jedná buď o dceřiné sporocysty, které se podobají mateřské sporocystě, či o redie. Mateřská sporocysta se zprvu usazuje na místě penetrace miracidia, což většinou bývají místa na měkkýši nekrytá schránkou a později migruje i do dalších tkání. Tam se pak uvolňují její potomci prasknutím mateřské sporocysty nebo porodním otvorem (Volf et al. 2007).

Dceřiná sporocysta (Obr. 12) většinou má podobný tvar i metabolismus jako mateřská sporocysta. Některé druhy mohou mít i vláskovitý či rozvětvený tvar těla. Jak dceřiné sporocysty, tak redie bývají většinou lokalizovány v hepatopankreatu měkkýšů. Na rozdíl od mateřské sporocysty mohou dceřiny sporocysty narušovat okolní tkáň. Ze zárodečných buněk v dceřiných sporocystách pak začnou vznikat další dceřiné sporocysty či cercarie, které poté unikají aktivně či pasivně z prvního mezihostitele.

Na rozdíl od dceřiných sporocyst mají redie vakovité střevo s hltanem a jsou tedy schopny se aktivně živit tkání meziphostitele či jinými vývojovými stádii motolic. Také jsou schopny aktivního pohybu kónickými výrůstky na povrchu těla. V rediích se ze zárodečných buněk vyvíjí další generace redií zakončené finální generací cercárií. Při vyšší infekci tak může jediný napadený meziphostitel produkovat až tisíce cercárií denně.

Mnoho druhů motolic je schopných cílené hormonální kastrace prvního meziphostitele, aby pak více času a energie investoval do získávání potravy a nabývání svojí biomasy, ze které motolice mohou čerpat potravu. Díky nevynaložené energii do rozmnožování se také meziphostitel může dožít vyššího věku, což také napomáhá motolicím se delší dobu v meziphostiteli nepohlavně množit. Avšak v mnoha případech jsou cercárie motolic schopny pozměnit chování svého hostitele (motolice *Leucochloridium paradoxum*, hostitel plž rodu *Succinea*) a tím pomoci svým klonům se dostat do dalšího hostitele (Wesołowski & Wesołowska 2013).

Cercárie je další vývojové stádium motolic. Jde o larvální stádium, jehož hlavním cílem je transport do dalšího hostitele. Je charakteristická oválným či kulatým tvarem těla připomínajícího zmenšenou verzi dospělého stádia. Na anteriorním konci je přítomna ústní přísavka, která může být zakončena styletem, což je útvar sloužící k proniknutí do tkáně hostitele. Zde se také nachází zakončení penetračních, únikových (escape) či mukózních (mucoid) žláz obsahujících proteolytické enzymy. Ty usnadňují cercárii snadnější penetraci do tkáně hostitele (Ligasová et al. 2011) či v případě únikových žláz snadnější únik ze sporocysty (Bogotish et al. 2005). V rámci trávicí soustavy se u cercárií vyskytuje ústní otvor (který často obklopuje ústní přísavka) s pokračujícím prefarynxem a následujícím farynxem. Poté je trávicí trubice zakončena slepě zakončeným rozvětveným či jednoduchým slepým střevem. U mnoha cercárií se uprostřed těla také nachází břišní přísavka sloužící k přichycení či pohybu cercárie po podkladu. U cercárií se už také nacházejí jak samčí, tak samičí pohlavní orgány. Vyměšování metabolických zplodin je zajištěno protonefridiemi (Volf et al. 2007).

Na terminálním konci vyúsťuje pórem exkreční měchýř. Zadní část cercárie většinou zakončuje ocásek sloužící k pohybu cercárie ve volném vodním prostředí či k přichycení a pohybu cercárie po podkladu. Ocásek může nabývat různých tvarů, velikostí a z nich poté vyplývajících funkcí. Velikostně může být menší (virgulatní cercárie), podobně dlouhý (echinostomní cercárie) či delší (furcoceršní cercárie) než je tělo cercárie. Dále se může větvit do vidlice (furcoceršních cercáre), nebo na ní mohou vyrůstat ploutvičky (parapleurolophoceršních a pleurolophoceršních cercárie) či cilie (trichoceršní cercárie) (Anucherngchai et al. 2016). Předchozí jmenované typy cercárií se specializují hlavně na pohyb ve volném vodním prostředí.

U cercárií cotylceršního typu (Obr. 12) se ocásek redukoval na protrusibilní papilu mnohonásobně menší, než je velikost těla, jenž obsahuje mnohé žlázy produkující lepkavý sekret. Pomocí této papily se mohou pohybovat po podkladu podobným způsobem jako pijavice. (Cribb 2004). Tyto cercárie po samovolném úniku z meziphostitele čekají nehybně na dně. Pokud ucítí lehké proudění vody, je schopna se vzpřímit a uchytit se na proplouvajícího hostitele (Jousson & Bartoli 2003).

Cerkárie se do dalšího hostitele dostává zpravidla dvěma způsoby. Buďto bývá následující hostitel infikován pozřením předchozího hostitele infikovaného cercáriemi nebo aktivně přes kůži hostitele. Při penetraci do dalšího hostitele využívá zpravidla svůj stylet (*Xiphidiata*) a proteolytické enzymy vyprodukované penetrálními žlázami. U motolic s dvouhostitelským cyklem cercárie aktivně vnikají do definitivního hostitele (*Schistosoma*), pasivně přes pozření mezihostitele definitivním hostitelem (*Leucochloridium*), nebo jsou schopny se ve vnějším prostředí (např. na vodní vegetaci) encystovat do klidové formy tzv. metacerkárie, která poté vyčkává na pozření definitivním hostitelem (*Fasciola*) (Mas-Coma et al. 2009). Některé druhy jsou schopny prodělat přeměnu z mateřské sporocysty až do metacerkárie uvnitř prvního mezihostitele a vyčkat na jeho pozření definitivním hostitelem (některé druhy čeledí Microphallidae, Lissorchiidae, Fellodistomidae a Gymnophallidae) (Poulin & Cribb 2002).

U motolic s tříhostitelským cyklem cercárie vnikají do druhého mezihostitele, který funguje jako vektor. Při penetraci do mezihostitele cercárie ztrácí ocásek. V tkáni se poté encystuje do klidové formy tzv. metacerkárie, která poté v mezihostiteli vyčkává na chvíli, kdy je pozřen definitivním hostitelem. V definitivním hostiteli motolice dospívají do dospělého stádia schopného se pohlavně množit.

Většina druhů motolic jsou hermafrodité, tedy dokáží tvořit jak samčí tak samičí gamety (viz výše). Avšak i mezi motolicemi se nachází i čistě gonochoristická čeleď Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898. Po přeměně motolice do dospělé pohlavně se množící fáze v definitivním hostiteli se vývojový cyklus motolice završuje a dále se motolice podílí na tvorbě následující generace svých potomků.

1.3. Fylogeneze motolic

Třída Trematoda Rudolphi, 1808 se dělí na dvě podtřídy Digenea Carus, 1863 a Aspidogastrea Faust & Tang, 1936.

Podtřída Aspidogastrea zahrnuje kolem 80 dosud popsáných druhů motolic rozdělených do 4 čeledí. Jde o skupinu motolic parazitujících především u sladkovodních a mořských měkkýšů a obratlovců. Od širší skupiny Digenea se odlišuje hlavně zjednodušeným jednohostitelským či dvouhostitelským vývojovým cyklem postrádajícím partenogeneticky se rozmnožující larvální stádia. Specifita nakažených hostitelů je u Aspidogastrea mnohem nižší než u Digenea, kdy jeden druh např. *Aspidogaster conchicola* Baer, 1827 je schopen infikovat široké spektrum hostitelů zabírající hlavně sladkovodní mlže ale také plže a u definitivních hostitelů zaobírá široké spektrum druhů sladkovodních ryb a dokonce i sladkovodních želv. U mnoha druhů je přítomnost obratlovce jakožto definitivního hostitele pouze fakultativní a jsou schopny pohlavně dospět v těle měkkýše (Rhode, 1972).

Většina diverzity motolic se skrývá v podtřídě Digenea. Digenea je typická monofyletická skupina motolic s dvou až tříhostitelským vývojovým cyklem zabírajícím jak partenogenetické

rozmnožování v prvním meziphostiteli, jímž je většinou druh měkkýše nebo mnohoštětinatce (čeleď Aporocotylidae), tak rozmnožování pohlavní v definitivním hostiteli, jímž je zpravidla vodní nebo suchozemský obratlovec. Do skupiny Digenea patří 2 řády motolic. Prvním a méně diverzifikovaným je řád Diplostomida Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003.

1.3.1. Diplostomida Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003

Diplostomida je podle novějších studií zaměřených na analýzu mitochondriální DNA parafyletickou skupinou, kdy se rody *Diplostomum* von Nordmann, 1832 a *Clinostomum* Leidy, 1856 řadí do příbuznosti ke druhému řádu Plagiorchiida La Rue 1957 (Locke et al. 2018). Řád Diplostomida vznikl po rozdělení řádu Strigeida La Rue 1957, pro které bylo charakteristickým morfologickým znakem furkocerní cercárie, která aktivně vniká do svého definitivního hostitele. Na základě studie velké a malé podjednotky ribosomální DNA (Olson et al. 2003) byl však tento řád zrušen. Mnoho čeledí bylo přiřazeno do řádu Plagiorchiida a vznikl nový řád Diplostomida. Jsou zde řazeny 3 nadčeledi Brachylaimoidea Joyeux & Foley, 1930, Diplostomoidea Poirier, 1886 a Schistosomatoidea Stiles & Hassall, 1898. Morfologicky je skupina charakteristická posteriorním umístěním genitálního póru vůči acetabulu. Tento znak je ovšem synapomorfni s podtřídou Aspidogastrea a bazální skupinou Plagiorchiida. Mezi další znaky patří charakteristika penetrálních žláz u cercárií, která je totožná u Diplostomoidea a Schistosomatoidea (Olson et al. 2003).

1.3.2. Plagiorchiida La Rue, 1957

Druhým významným řádem tvořícím převážnou část diverzity motolic je řád Plagiorchiida. Do tohoto řádu se na základě studií velké a malé ribosomální podjednotky (Olson et al. 2003) řadí 13 větví neboli nadčeledí. Ty je dále možné dělit podle umístění větví ve fylogenetickém stromu na bazální a vyšší Plagiorchiida.

Mezi bazální Plagiorchiida náleží podřád Bivesiculata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 s jedinou čeledí Bivesiculidae Yamaguti, 1934. Pro tuto bazální čeleď je charakteristická absence přísavky, což může být buď odvozený znak, nebo také může vypovídat o nezávislém vzniku a vývoji přísavky u Diplostomida a Plagiorchiida (Olson et al. 2003). Dalším bazálním podřádem je Transversotremata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003. Se svojí jedinou čeledí Transversotrematidae Witenberg, 1944 jde o menší skupinu motolic adaptovaných na život pod rybími šupinami, kde jsou jedinými známými motolicemi. Pro tuto čeleď je typická možná absence ústní přísavky ale mívají místo nich různé analogické útvary. Díky tomu, že jde o bazální skupinu Plagiorchiid může tento znak podporovat teorii nezávislého vývoje ústní přísavky mezi Diplostomida a Plagiorchiida (Olson et al. 2003). Poslední skupinou bazálních Plagiorchiid tvoří podřád Hemiurata Skrjabin & Guschanskaja, 1954. Tato skupina zahrnuje 2 nadčeledi Azygioidea Lühe, 1909 a Hemiuroidea Looss, 1899 (Gibson et al. 2002). Jejím typickým znakem je přítomnost sinusového vaku (sinus sac), což je synapomorfni znak odvozený od bivezikulárního cirrového vaku, který se u této nadčeledi motolic na

úkor sinusového vaku vytratil. Sinusový vak lze definovat jako svalnatý útvar obklopující genitální atrium. Hlavní funkcí je uzavírání ejakulační trubice a utera (Gibson & Bray 1979). Jedním z dalších charakteristických znaků zvláště u nadčeledi Hemiuroidea je kondenzace vitelinních folikulů z folikulárního uspořádání na útvary tvořící jeden nebo více shluků filament. U této skupiny bazálních Plagiorchiid se také nacházejí množství jedinečných, často primitivních znaků v jejich vývojovém cyklu. Například vývojový cyklus motolic z čeledi Ptychogonimidae Dollfus, 1937 je charakteristický volně žijícími pohyblivými stádii sporocyst, využitím kelnatek (Scaphopoda) jakožto prvních meziphostitelů, či specializací na příčnoústé paryby (Elasmobranchii) jakožto definitivní hostitele (Olson et al. 2003).

Na bázi vyšších Plagiorchiid se na základě studií 28S a 18S rDNA je umístěna skupina Heronimata Skrjabin & Schulz, 1937 s jedinou čeledí Heronimidae Ward, 1918. Jde o kontroverzní čeleď, která byla mnohými odborníky (Brooks et al. 1985) považována za nejprimitivnější taxonomickou skupinu podtřídy Digenea. Podle Gibson (1987) jde o aberantní skupinu motolic přizpůsobenou atypickým podmínkám. Dospělí jedinci této čeledi (dokumentováno na druhu *Heronimus mollis* Leidy, 1856) parazitují v plicích sladkovodních želv. Miracidia se mohou líhnout přímo v děložce rodiče a v primárním meziphostiteli, kterým zpravidla bývá druh měkkýše, vývojový cyklus postrádá vývoj sekundárního partenogenetického stádia (dceřiná sporocysta, redie). Cerkárie, které se vyvinou přímo z mateřské sporocysty se do finálního hostitele (želvy) dostávají pozřením jejich meziphostitele. Dospělí jedinci se od ostatních motolic odlišují antero-dorzálním vylučovacím pórem a absencí acetabula (Olson et al. 2003, Barker et al. 1993).

Výše se pak nachází taxonomická skupina Bucephalata La Rue, 1926. V rámci skupiny se zde nacházejí 2 nadčeledi. První je nadčeleď Bucephaloidea Poche, 1907 se dvěma čeleděmi Bucephalidae Poche, 1907 a Nueitrematidae Kurochkin, 1975. Druhou nadčeledí je Gymnophalloidea Odhner, 1905 s čeleděmi Botulisaccidae Yamaguti, 1971, Fellodistomidae Nicoll, 1909 (viz Obr. 2), Gymnophallidae Odhner, 1905 a Tandanicolidae Johnston, 1927. Společným znakem skupiny Bucephalata je, mimo již objasněné příbuznosti na základě úseků 28S a 18S rDNA, také průběh partenogenetického množení, který zpravidla probíhá v mlžích (Bivalvia) jakožto prvních meziphostitelů.

Další taxonomickou skupinu motolic Pronocephalata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 tvoří dvě nadčeledi Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901 a Pronocephaloidea Looss, 1899. Tato skupina je charakteristická jedinou svalovou strukturou (obvykle bývají 2) u vstupu do střeva. Stále není jasné, zda jde o morfologicky pozměněný farynx či ústní přísavku (Pearson 1992), i když současné názory se přiklání spíše k farynxu. Mimo čeledi Diplodiscidae Cohn, 1904 a Cladorchiidae Fiscoeder, 1901 je u této skupiny také charakteristická absence acetabula. Hlavní radiace této skupiny probíhala hlavně u čtyřnožců a méně pak u sladkovodních ryb. V mořských rybách bývají nalézány zcela výjimečně (Olson et al. 2003).

Podřád Haplospilchnata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 je zastoupen jedinou čeledí Haplospilchnidae Poche, 1926. Jde o jednu z méně fylogeneticky stabilních čeledí (Olson et al.

2003), která je však uvnitř svojí skupiny prokazatelně monofyletická (Huston et al. 2017). Skupina nemá žádné specifické determinační znaky mimo zjednodušené terminální genitálie a nevětvené střevo (Olson et al. 2003).

Charakteristickou skupinou motolic, vyskytujících se výhradně u čtyřnožců a méně často také u ryb, jsou Echinostomata La Rue, 1926 (Tkach et al. 2016). Náleží do ní čeledi Cyclocoelidae Stossich, 1902, Echinostomatidae Looss, 1899, Fasciolidae Railliet, 1895, Echinochasmidae Odhner, 1910 a 5 dalších. Vyskytují se zde motolice s vývojovými cykly zahrnujícími pouze jednoho hostitele (Fasciolidae, Cyclocoelidae) tak také dva meziphostitele (Echinostomatidae, Echinochasmidae,...) (Tkach et al. 2016).

Opisthorchiata La Rue, 1957 je malou skupinou motolic zahrnující 3 čeledi: Cryptogonimidae Ward, 1917, Heterophyidae Leiper, 1909 a Opisthorchiidae Looss, 1899. Na základě studie ssr rDNA (Olson et al. 2003) byla část druhů čeledi Opisthorchiidae přearžena do čeledi Heterophyidae, avšak následná studie ITS2 sekvencí (Thaenkham et al. 2011) tyto skupiny od sebe opět oddělila. Definitivními hostiteli této skupiny motolic jsou opět čtyřnožci. Je zde známo také mnoho lidských patogenních motolic (*Opisthorchis viverrini*, *O. felinus*, *Clonorchis sinensis*, *Haplorchis* spp. a *Metagonimus* spp.) (Thaenkham et al. 2011).

Další oddělenou linií tvoří skupina Apocreadiata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 s jedinou čeledí Apocreadiidae Skrjabin, 1942. Jde o čeleď, jejíž dospělá stadia parazitují v trávicí trubici sladkovodních a mořských ryb (Olson et al. 2003).

Taxonomická skupina Lepocreadiata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 je skupinou parazitující výhradně u mořských živočichů. Vyskytuje se v ní 10 čeledí (Enenteridae Yamaguti, 1958, Gorgocephalidae Manter, 1966, Gyliuchenidae Fukui, 1929, Lepocreadiidae Odhner, 1905,...) (Olson et al. 2003).

Následující taxonomická skupina Monorchiata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 obsahuje jednu výhradně mořskou čeleď Monorchiidae Odhner, 1911 a jednu sladkovodní čeleď Lissorchiidae Magath, 1917 (Olson et al. 2003).

Největší skupinou řádu Plagiorchiida je Xiphidiata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003. Obsahuje 5 nadčeledí: Allocreadioidea Looss, 1902, Gorgoderioidea Looss, 1901, Haploporoidea Nicoll, 1914, Microphalloidea Ward, 1901, Plagiorchioidea Lühe, 1901. Zásadním znakem definujícím tuto skupinu je přítomnost penetračního styletu u cercárií, který se v žádné jiné dříve uvedené skupině neobjevuje (Olson et al. 2003).

Motolice čeledi Opecoelidae, které se na základě pitevních protokolů a dřívější studentské práce (Otáhal 2015) vyskytují ve sledovaných druzích ryb, patří do nadčeledi Allocreadioidea Looss, 1902. Tato nadčeleď zahrnuje také čeledi Acanthocolpidae Lühe, 1906, Allocreadiidae Looss, 1902, Batrachotrematidae Dollfus & Williams, 1966 a Brachycladiidae Odhner, 1905. Jsou to výhradně střevní parazité ryb, sporadicky obojživelníků a také kytovců (charakteristické pro čeleď Brachycladiidae) (Olson et al. 2003, Cribb 2004).

1.4. Opecoelidae Ozaki, 1925

Čeď Opecoelidae (Xiphidiata, Digenea; Obr. 2) je považována za největší čeď motolic vyskytujících se kosmopolitně u mořských a sladkovodních ryb. Podle současné databáze mořských organismů (WoRMS, březen 2019) je do této čeledi zařazeno 104 rodů v 9 podčeledích: **Bathycreadiinae** Martin, Huston, Cutmore & Cribb, 2018; **Helicometrinae** Bray, Cribb, Littlewood & Waeschenbach, 2016; **Opecoelinae** Ozaki, 1925; **Opecoelininae** Gibson & Bray, 1984; **Opistholebetinae** Fukui, 1929; **Plagioporinae** Manter, 1947; **Podocotylinae** Dollfus, 1959; **Polypipapiliotrematinae** Martin, Cutmore & Cribb in Martin, Sasal, Cutmore, Ward, Aeby & Cribb, 2018 a **Stenakrinae** Yamaguti, 1970 (Cribb 2004; Martin, Huston et al. 2018; Martin, Sasal et al. 2018).

Dříve se čeď Opecoelidae řadila do stejné větve jako jí příbuzná čeď Opistholebetidae Fukui, 1929 (Olson et al. 2003) avšak na základě molekulárně fylogenetické studie Bray et al. (2016) byly tyto dvě čeledi sloučeny, čímž vznikla nová podčeď Opistholebetinae.

Podle nejnovější studie 28S+18S rDNA (Martin, Huston et al. 2018) byla parafyletická podčeď Plagioporinae Manter, 1947 rozdělena na Plagioporinae (sensu lato) obsahující hlavně mořské zástupce této podčeledi (aktuálně jsou řazeny do skupin Plagioporinae B a Plagioporinae C) a také do podčeledi Opistholebetinae a nově založené podčeledi Polypipapiliotrematinae, která se na základě morfologických rozdílů (absence kanákovitého receptacula seminis), molekulární fylogenetické analýzy 28S+ 18S rDNA a ITS2 rDNA a rozdílným vývojovým cyklem využívajícím korálnatce jako druhého meziphostitele oddělila od podčeledi Plagioporinae s. l. (Martin, Sasal et al. 2018).

Druhou větví bývalé podčeledi tzv. hlubokomořských a sladkovodních Plagioporinae tvoří Plagioporinae (sensu stricto) obsahující hlavně sladkovodní zástupce, poté podčeď Podocotylinae, kam patří druhy *Bathypodocotyle* (*Allopodocotyle*) *margolisi* Martin, Huston, Cutmore & Cribb, 2018, *Buticulotrema thermichthysi* Bray, Waeschenbach, Dyal, Littlewood & Morand, 2014, *Halosaurotrema* (*Gaevskajatrema*) *halosauropsi* (Bray & Campbell, 1996) Martin, Huston, Cutmore & Cribb, 2018, *Neolebouria georgiensis* Gibson, 1976 a *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905. Také v této větvi vznikla na základě odlišných fylogenetických, morfologických a ekologických znaků nová podčeď Bathycreadiinae s jediným rodem *Bathycreadium* Kabata, 1961. Také byly dva rody z této větve *Scorpidotrema* Aken'Ova & Cribb, 2003 a *Holsworthotrema* Martin, Huston, Cutmore & Cribb, 2018 nově zařazeny do podčeledi Stenakrinae. Pro rody *Abyssopedunculus* Martin, Huston, Cutmore & Cribb, 2018 (dříve *Podocotyloides*) a *Mesobathylebouria* Martin, Huston, Cutmore & Cribb, 2018 (dříve *Neolebouria*) z důvodu nedostatečných morfologických či ekologických podkladů nebyla vymezena podčeď sjednocující tyto dva rody (Martin, Huston et al. 2018).

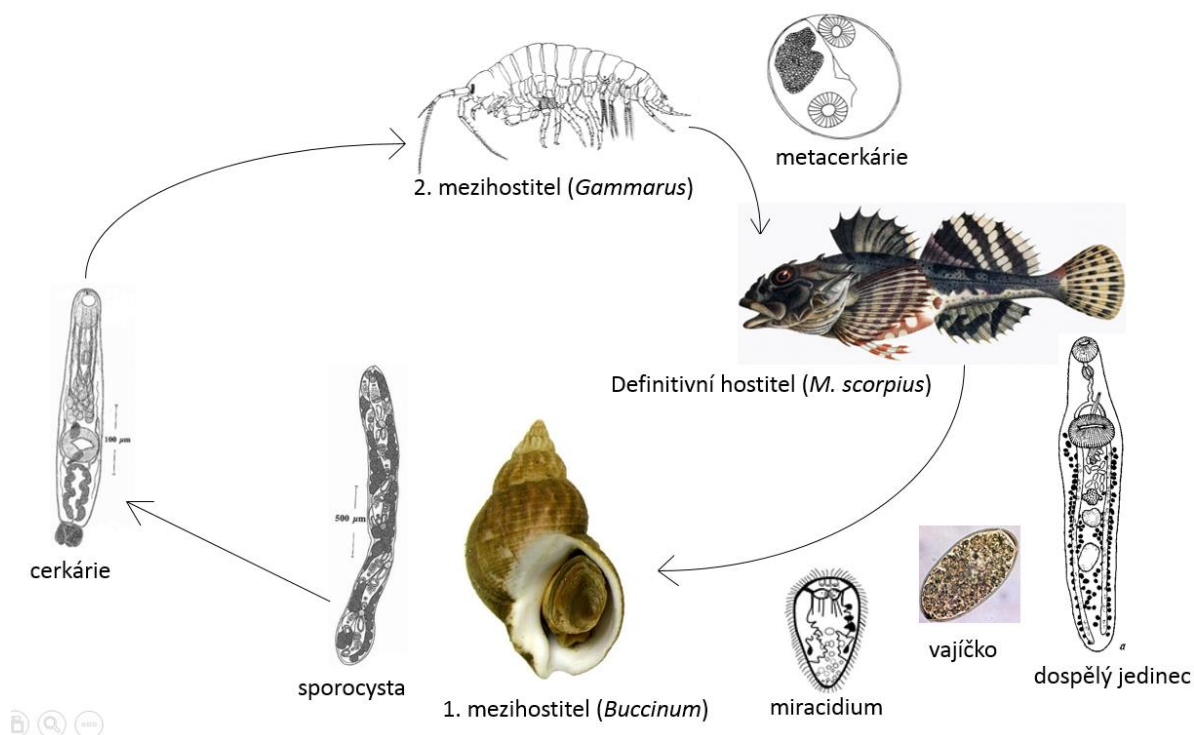
Tato čeď není charakteristická žádným morfologickým znakem, který by výrazně odlišoval tuto skupinu od ostatních. Spíše je charakterizována soustavou vlastností a znaků, které se však dá nalézt i u jiných čeledí motolic. Tvar těla je zpravidla oválný. Tělo pokrývá hladký tegument bez ostnů. Z těla také vyčnívá výrazná ústní a břišní přísavka. Trávicí systém se skládá z částí prefarynx, farynx a

následným jednou větveným slepým střevem. Exkreční pór je ve tvaru I. Motolice jsou hermafrodité a jejich tělo obsahuje jak samčí, tak samičí pohlavní orgány. Samčí pohlavní soustava se skládá ze dvou až deseti oválných testes a je zakončena cirrem, který vyčnívá z cirrového vaku uzavírajícího vesicula seminis. Samičí pohlavní soustava se skládá z jednoho ovária, Laurerova kanálku a utera zabírajícího většinu prostoru zadní části těla a je zakončena genitálním pórem. Receptaculum seminis je zpravidla kanálkovitě. Vitelinní folikuly netvoří žádné shluky a jsou rozprostřeny po celé délce těla. Mezi základní determinační znaky, rozlišující odlišné podčeledi či rody motolic je umístění genitálního póru, tvaru cirrového vaku, cirra a receptacula seminis (Cribb 2004). Například podčeď Opecoelinae je charakteristická odlišným tzv. membránovým cirrovým vakem a děložním receptaculem seminis (Bray et al. 2016; Sokolov et al. 2018). U podčeledi Polypipapiliotrematinae a Stenakrinae se vyskytuje děložní receptaculum seminis (Martin, Huston et al. 2018; Martin, Sasal et al. 2018).

Vývojový cyklus čeledi Opecoelidae (Obr. 1) zpravidla zahrnuje 3 hostitele a vyskytuje se zde jak partenogenetické množení v prvním mezihostiteli, tak sexuální množení v definitivním hostiteli. Fakultativně vznikl u jednoho druhu *Caudotestis sinitsini* (Mueller, 1934) Yamaguti, 1971 (syn. *Plagioporus sinitsini* Mueller, 1934) jednohostitelský cyklus, kdy vajíčka mohou být produkována dospělými jedinci uvnitř prvního mezihostitele *Elimia symmetrica* Haldeman, 1841 (Barger & Esch 2000; Cribb 2004). Vajíčka bývají většinou oválná, 40- 80 µm dlouhá, hnědá či žlutá a mívají operculum. Občas mívají vajíčka na jednom či obou koncích patrné filenty. Z těla definitivního hostitele odcházejí většinou společně s výkaly. Po vylíhnutí se miracidium dostává do prvního mezihostitele, kterým je zpravidla předožábří plž, kde probíhá metamorfóza miracidia na mateřskou sporocystu. Poté zde proběhne dvougenerační partenogenetické množení dceřiných sporocyst, jehož výsledkem je generace zpravidla cotylocerních cercárií (Obr. 12). Cercárie jsou charakteristické metamorfózou či zakrtním ocásku v určitý útvar připomínající malý výrůstek tzv. protrusibilní papilu napomáhající cercárii k pohybu po podkladu zpravidla podobným způsobem jako pijavice. Výjimkou jsou cercárie druhu *Helicometra gibsoni* Meenakshi, Madhavi & Swarnkumari, 1993, které mají dlouhý ocásek sloužící k plavání. Cercárie mívají plně vyvinutou ústní i břišní přísavku, penetrační žlázy a stylet a postrádají světločivné skvrny. Cercárie jsou schopné nakazit široké spektrum mezihostitelů počínaje hmyz, korýše, máloštětinatce, žahavce či ryby. V nich většinou cercárie utvoří hibernační stádium metacercárie (Obr. 4). Poté už čeká na pozření mezihostitele definitivním hostitelem a následnou přeměnu do dospělého stádia schopného se sexuálně rozmnožovat a produkovat vajíčka (Cribb 2004; Obr. 7). V některých případech např. u druhu *Coitocaecum parvum* Crowcroft, 1945 (podčeď Opecoelinae) jsou metacercárie schopny předčasného pohlavního vývoje (progeneze) uvnitř druhého mezihostitele v závislosti na rozdílných podmínkách prostředí. Vajíčka takto vzniklých dospělých jedinců se poté uvolňují do vnějšího prostředí až po smrti mezihostitele (Daniels et al. 2012).

V rámci expedic Centra polární ekologie byly motolice čeledi Opecoelidae nacházeny ve dvou druzích vranek a sporocysty produkující cotylocerní cercárie, které jsou pro tuto čeď typické, byly nalézány běžně v surmovkách (Buccinidae). Na základě morfologických studií se v dřívější studentské

práci (Otáhal 2015) nepodařilo věrohodně prokázat druhovou příslušnost motolic (výsledky ukazovali na základě poměrů délky těla ke vzdálenosti přísavky u všech vyšetřených jedinců na druh *Podocotyle atomon*). Z toho důvodu je tato práce zaměřena na druhovou determinaci pomocí molekulárních fylogenetických metod, kterou také můžeme spolehlivě určit příbuznost sporocyst a dospělých stádií a tím osvětlit i jejich vývojový cyklus (Obr. 1).



Obr. 1: Zjednodušené schéma vývojového cyklu motolice čeledi Opecoelidae na Svalbardu. (Wikimedia Commons; Wikipedia; Jousson & Bartoli 2003; skaphandrus.com; msubiology.info; Zoofirma.ru).

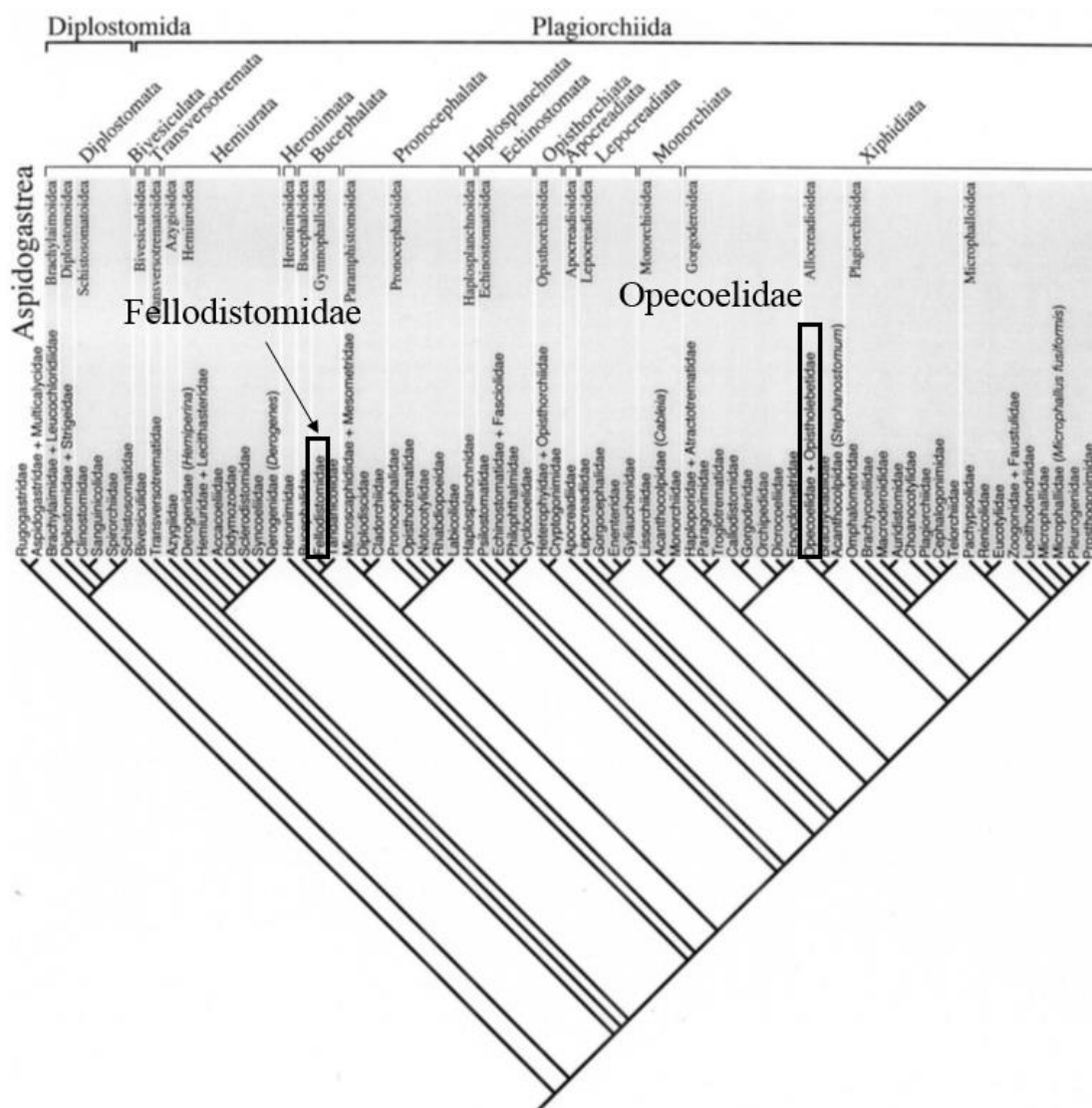
1.5. Fellodistomidae Nicoll, 1909

Čeď Fellodistomidae (Bucephalata, Digenea; Obr. 2) je morfologicky velice různorodá skupina bez jediného znaku vymezujícího čistě tuto čeď. Na základě studie 18S rDNA (ssr rDNA) (Cribb et al. 1999), kde porovnávali úseky DNA 13 druhů čeďi Fellodistomidae s osmi druhy ze sedmi odlišných čeďí motolic, byla tato čeď určena jako polyfyletická s aspoň dvěma podčeďemi, které byly řazeny do příbuznosti s jinými čeďemi. Pod fellodistomidy spadá 33 rodů ve 4 podčeďích (Fellodistominae Nicoll, 1909, Piriforminae Skrjabin & Koval, 1957, Tergestiinae Skrjabin & Koval, 1957, Asymmetrinae Bilqees, Khalil, Khan, Perveen & Haseeb, 2016 (platnost nejasná) (databáze WoRMS). Partenogenetická stádia motolic parazitují v mlžích a dospělá stádia se vyskytují v trávicím traktu, žlučníku i žlučovodech sladkovodních, mořských litorálních i hlubokomořských paprskoploutvých ryb a vzácně také v žaludku mořských měkkýšů. Jako druhého meziphostitele na základě studie potravy definitivních hostitelů mohou využívat široké spektrum mořských organismů (Bray et al. 1999; Bray 2002).

Tělo fellodistomidů je zpravidla oválné až protáhlé a pokrývá ho většinou hladký tegument. Občas bývá viditelná svalová ornamentace či vzácně se i vyskytují tegumentální trny. Ústní přísavka je zpravidla subterminální a globulární. Břišní přísavka se nachází v centrální či přední části těla, je zpravidla globulární a může nabývat různých velikostí. Prefarynx je zpravidla krátký, či může zcela chybět. Farynx je globulární až protáhlý. Slepé střevo většinou bývá jednou větvené, ale u některých druhů bývá jednoduché nevětvené. Fellodistomidae jsou hermafrodité. Samčí pohlavní soustava se skládá ze dvou symetrických testes, svalnatého cirrového vaku obklopujícího vesicula seminis, prostatické buňky a ejakulační trubice. Samičí pohlavní soustava se skládá z jednoho jednoduchého či lalokovitého germária. Laurerův kanál je přítomen. Receptaculum seminis je zpravidla děložní. Uterus je zpravidla protažený a zabírá většinu prostoru v zadní části těla od testes. Vitelinní folikuly tvoří 2 (někdy i 4) shluky na bocích těla. Exkrementní měchýř je většinou tvarován do písmene Y nebo V a délka měchýře u některých druhů dosahuje až k faryngu. Exkrementní pór je zpravidla terminální (Bray 2002).

Rod *Steringophorus* Odhner, 1905 z podčeďi Fellodistominae je častým parazitem výhradně hlubokomořských druhů ryb severního Atlantiku, kde podle Bray (1999) proběhla hlavní radiace tohoto rodu (Bray et al. 1999). Avšak nejčastěji dokumentovaný druh *S. furciger* Olsson, 1867 (Obr. 11) se nachází u ryb napříč všemi hloubkovými pásmy. Byl již nalezen u 67 druhů ryb 17 čeďí (nejčastěji uváděný je druh platýze *Pleuronectes americanus* Walbaum, 1792) (Bray & Campbell 1995). Dospělí jedinci byli také nalezeni v žaludku plže *Buccinum undatum* Linnaeus, 1758 (Tétreault et al. 2000). Je také známo, že tento druh nevyžaduje ve svém vývojovém cyklu přítomnost druhého meziphostitele. Tento znak je charakteristický i pro více druhů fellodistomidů (*Steringotrema pagelli* van Beneden, 1871, nejspíše *Oceroma praecox* (Walker, 1971) Cribb, Miller, Bray & Cutmore, 2014 což je odhadováno na základě vyspělosti cercárie) a nejspíše se jeví jako plesiomorfnní znak pro celou čeď (Cribb et al. 2014). V rámci tohoto rodu byl na základě studie 28S rDNA zařazen druh *Steringotrema robertpoulini* Pérez-Ponce de León, Anglade & Randhawa, 2018 z Nového Zélandu jakožto jediný

osekvenovaný zástupce rodu *Steringotrema* Odhner, 1911. Mezi hlavní morfologické znaky rodu *Steringophorus* patří přítomnost dvou shluků vitelinních folikulů (u rodu *S. robertpoulini* 4 shluky), mediánová pozice pohlavního otvoru, přítomnost jednoduchého germária a exkrečního měchýře ve tvaru V. Dříve byl považován tento rod jako synonymum rodu *Fellodistomum* Stafford, 1904, avšak na základě molekulárních fylogenetických studií 18S a 28S rDNA a nad1 mitochondriálních DNA sekvencí byl uznán jako samostatný rod (Anglade et al. 2018).



Obr. 2: Fylogenetický strom Digenea znázorňující fylogenetickou příbuznost čeledí motolic Opisthorchiidae a Fellodistomidae nalezených ve vránkách severních *Gymnocanthus tricuspis* na Svalbardu (Olson et al. 2003).

1.6. Hostitelé motolic čeledi Opecoelidae na Svalbardu

Na základě dřívějších studií (studentská práce Otáhal 2015) a protokolů z parazitologických pitev (od roku 2009 po současnost) prováděných na Svalbardu v zálivu Petuniabukta byly motolice čeledi Opecoelidae nalezeny ve dvou druzích vranek (Cottidae Bonaparte, 1831) a cotyloceršní cerkárie (pravděpodobně náležící čeledi Opecoelidae) byly nalezeny v hepatopankreatu dvou rodů předožábřích plžů rodu *Buccinum* Linnaeus, 1758 a *Plicifusus* Dall, 1902. Také v rámci studentské práce (Otáhal 2015) byla provedena experimentální nákaza potencionálních druhých mezihostitelů a to korýšů rodu *Gammarus setosus* Dementieva, 1931. Experimentální nákaza proběhla úspěšně a v korýších byly nalezeny metacerkárie dané motolice.

1.6.1. První mezihostitel

Prvním hostitelem motolic čeledi Opecoelidae je na základě nálezů cotyloceršních cerkárií předpokládána čeleď Buccinidae. Jde o mořské předožábře dravé plže z řádu Neogastropoda Wenz, 1938 žijící převážně ve vodách do 1200 m hloubky s bahnitým či skalnatým dnem. Nejběžnějším představitelem této čeledi je rod *Buccinum* Linnaeus, 1758. V okolních vodách Svalbardu se potenciálně nachází 7 druhů tohoto rodu (Rózycki 1993).

Nejčastěji chyceným druhem byla *Buccinum undatum* Linnaeus, 1758 (česky surmovka vlnitá; Obr. 3), jejíž ulita dosahuje délky až 12 cm a šířky 6 cm (Shelmerdine et al. 2007). Jde o nejběžnější druh rodu *Buccinum* v okolí Svalbardu a je také široce rozšířen přes celý severní Atlantik od Hudsonova zálivu až po západní pobřeží poloostrova Kanin. Na jih spadá rozšíření až po severní pobřeží Španělska. Jde hlavně o mrchožravého či dravého plže živícího se převážně uhynulými těly živočichů, mlži či jinými druhy plžů. V těle *B. undatum* byly mimo sprocysty a cerkárie čeledi Opecoelidae nalezeny také parazitická stádia motolic druhu *Neophasis anarrichae* (Nicoll, 1909) Bray, 1987, *Zoogonoides viviparus* (Olsson, 1868) Odhner, 1902 a *Renicola* sp. (Køie, 1969). V žaludku také byly nalezeny dospělí jedinci motolice *Steringophorus furciger* Olsson, 1867, které jsou však výhradně rybími parazity a nejspíše se do těla dostali společnou potravou. Z hlediska patogenity se tomuto druhu nepřisuzuje žádný výrazný efekt (Tétrault et al. 2000). Parazitická stádia motolice rodu *Neophasis* infikují hlavně gonády hostitele, čímž dojde u hostitele k jeho kastraci a při vysokých koncentracích parazitů i k úhynu hostitele (Tétrault et al. 2000).

Buccinum glaciale Linnaeus, 1761 (česky surmovka grónská; Obr. 3) dorůstá délky 9 cm. Znakem odlišujícím tento druh od ostatních daného rodu je patrná spirálovitá ostřejší hrana či linie táhnoucí se podél ulity. Rozšíření má cirkumarktické. Zabírá stejnou ekologickou niku jako *B. undatum*. Bohužel z odborné literatury nejsou známy žádné záznamy parazitóz tohoto druhu.

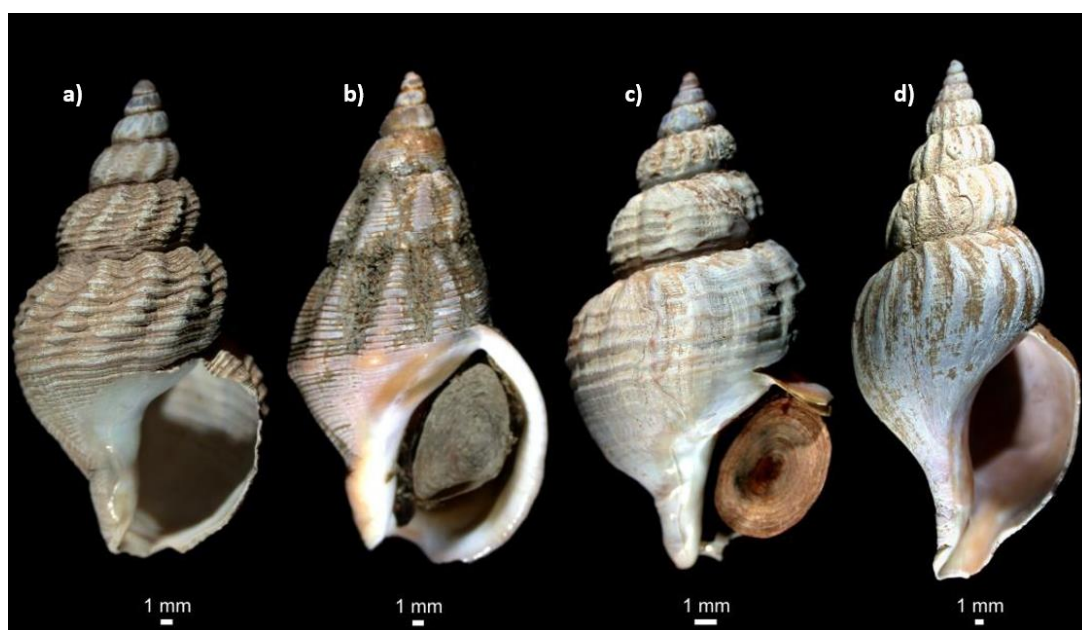
Buccinum polare Gray, 1839 (Obr. 3) se od ostatních druhů odlišuje dvěma či více výraznými spirálními záhyby a širokými zploštělými spirálními provazci oddělenými úzkou, ale hlubokou linií či úzkým meziprostorem, které lze detekovat mírným zvětšením. U tohoto druhu je známá vysoká variabilita v rámci tvaru a vrásnění ulity (Fraussen & Terryn 2019). Tento druh je převážně rozšířen

v severní Kanadě od zálivu Maine a Svatého Vavřince až po Beringovo a Ochotské moře. Také byl zaznamenán výskyt u ostrova Hokkaido (databáze WoRMS) a také jsou i záznamy ze Svalbardu (Odhner 1915; Kowalczuk 2007). Ekologicky zabírá stejnou niku jako předešlé 2 druhy.

Mezi další druhy rodu *Buccinum* zaznamenané na Svalbardu patří *B. cyaneum* Bruguière, 1789, *B. scalariforme* Møller, 1842, *B. hydrophanum* Hancock, 1846 a *B. maltzani* Pfeffer, 1886 (Odhner 1915; Różycki 1993).

Dalším zaznamenaným mezihostitelem je předožábřý plž příbuzný předešlému popsanému rodu (čeleď Buccinidae Rafinesque, 1815) *Plicifusus kroeyeri* Möller, 1842. Od rodu *Buccinum* se odlišuje protaženější ulitou s výraznějším axiálním žebrováním a protaženějším výraznějším anteriorním kanálkem. Rozšíření je cirkumarktické mimo pobřeží Norska a Islandu (Kosyan & Kantor 2012). Ekologicky zabírá stejnou niku jako rod *Buccinum*. V odborné literatuře nejsou zaznamenány žádné případy parazitózy.

Mezi další potenciální avšak nevyšetřené mezihostitele z čeledi Buccinidae žijící v litorálních zónách a fjordech Svalbardu patří plži rodu *Colus* Röding, 1798 a *Volutopsius* Mörch, 1857 (Kowalczuk 2007).



Obr. 3: Zástupci parazitologicky vyšetřených plžů čeledi Buccinidae jakožto potenciálních prvních mezihostitelů motolic čeledi Opecoelidae na Svalbardu: **a)** *Buccinum undatum*, **b)** *B. glaciale*, **c)** *B. polare*, **d)** *Plicifusus kroeyeri* (měřítko 1 mm; Foto: World Register of Marine Species).

1.6.2. Druhý mezihostitel

Druhým mezihostitelem se na základě zmíněného experimentu a odborné literatury potvrdilo široké spektrum korýšů řádu Amphipoda. Ekologicky hrají v ekosystému roli dravců a mrchožroutů či detritivorů a sami slouží jako potrava pro množství ryb, velryb či vodního ptactva. Tyto ekologické faktory hrají významnou roli v případě přenosu parazitů (Trematoda, Acanthocephala). Nejpravděpodobněji (doloženo i dřívějším experimentem) se korýši nakazí cotylocerními cercáriemi při požívání uhynulých plžů, přičemž jsou teoreticky možné 2 typy infekce. První z nich je penetrace cercárií do korýšů skrz vápenatou kostru či v část epidermis kostrou nekrytou. Druhou možností je se nechat druhým mezihostitelem pozřít, a poté penetrovat do svaloviny korýše skrz stěnu trávicí trubice. V těle korýše se poté metamorfuje cercárie na hibernační stádium metacercárie.

Nejběžnějším korýšem řádu Amphipoda v přílivové a litorální zóně zálivu Petuniabukta je druh *Gammarus setosus* Dementieva, 1931 (Gammaridae; Obr. 4). Dorůstají délky kolem 20- 30 mm, přičemž pohlavní dospělosti dospívají u samců při velikosti 12 mm a u samic při 13,5 mm. Živí se hlavně odumřelým živočišným materiálem. Rozšíření tohoto druhu je cirkumarktické. Nejčastěji je můžeme nalézt pod kameny v přílivové zóně či na vegetaci chaluh. Ve vodách kolem 3 °C jsou samice schopny zplodit jednu snůšku, nejčastěji během podzimu, kdy je hlavním spouštěcím mechanismem fotoperioda. Ve vodách kolem 12 °C jsou samice schopné zplodit i více snůšek během roku (Steele & Steele 2011).



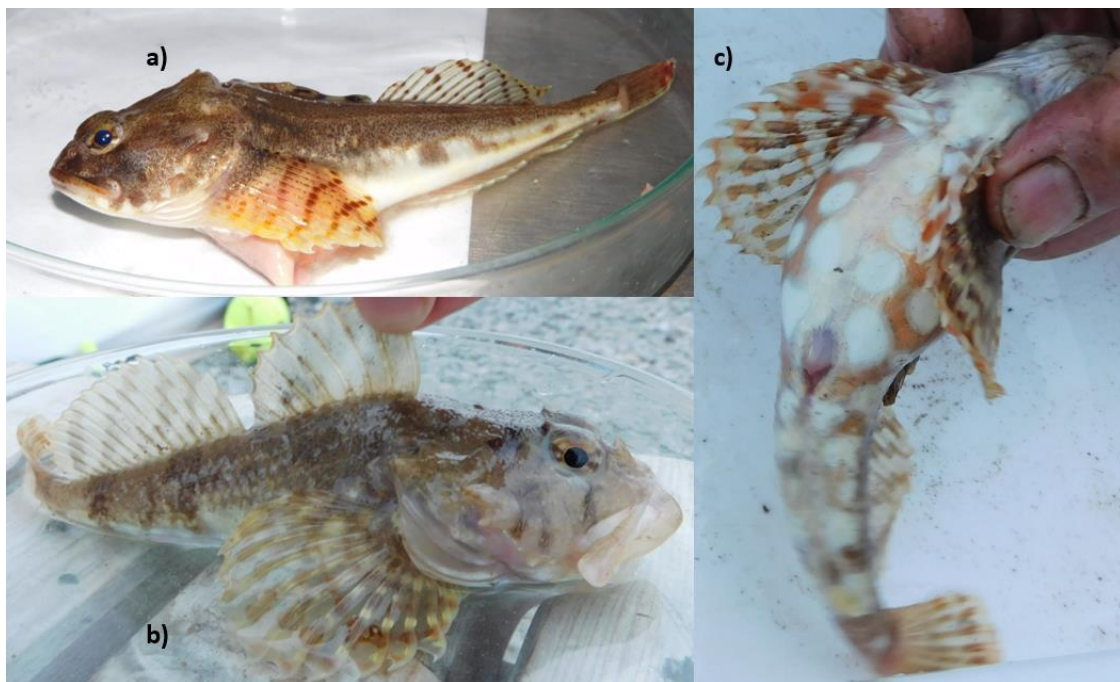
Obr. 4: **a)** *Gammarus setosus* (měřítko 5 mm; Foto: Jindra Šichová), **b)** metacercárie vyizolovaná z *G. setosus* 72 hodin po experimentální nákaze se zachovalým styletem na zvětšeném obrázku (měřítko větší obraz 100 μm, menší obraz 10 μm; Foto: Oleg Ditrich).

1.6.3. Definitivní hostitel

Dospělá stádia motolic čeledi Opecoelidae byla nalezena v zátocích Petuniabukta ve střevěch dvou druhů mořských vrankovitých ryb (čeleď Cottidae Bonaparte, 1831). Jde o bentické druhy žijící na skalnatém, písčitém či bahnitém dně nebo v nárůstu chaluh či vodních trav. Živí se většinou rybami a korýši, ale nepohrdnou také mnohoštětinatci.

Prvním a častěji chyceným druhem je *Myoxocephalus scorpius* Linnaeus, 1758 (česky vranka mořská; Obr. 5). Jde o rybu dorůstající až 60 cm, přičemž dospělosti dosahuje mezi 15-30 cm. Mezi charakteristické znaky tohoto druhu patří masivní hlava s mnoha páry ostnů, přičemž nejvýraznější jsou 2 páry na skřelích. Na hřbetní ploutvi mají 7- 11 tvrdých paprsků a charakteristický je zakulacený okraj na ocasní ploutvi (Froese 2014). Zbarvení je od různých odstínů světle hnědé až hnědo-žluté s tmavě hnědým mramorováním. U samců se během rozmnožovací sezóny zbarví břicha do červena a objeví se na nich nápadné bílé oválné skvrny. Tento druh žije převážně v litorálních vodách, avšak vyskytuje se také v hloubších vodách do 451 m. Rozšíření tohoto druhu je cirkumarktické (Severní ledový oceán, Severní Atlantik i Pacifik) sahající na jih až k Británskému poloostrovu a v Americe až k zálivu Maine (Bailly 2008). Na Svalbardu je jednou z nejběžnějších ryb v litorálních vodách. Preference teplot je od 0,4- 10,3 °C (Froese 2014). Z čeledi Opecoelidae byly v trávicím traktu vranky nalezeny *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905, *P. reflexa* (Creplin, 1825) Odhner, 1905, *P. simplex* (Rudolphi, 1809) Srivastava, 1966, *Peracreadium commune* (Olsson, 1868) Nicoll, 1909 a *Helicometra plovomornini* Issaichikov, 1928 (van der Land & Bailly 2008). Dále zde byli nalezeni dospělí jedinci motolic čeledí Hemiuridae, Derogenidae, Fellodistomidae, Lecithasteridae, Acanthocolpidae, Bucephalidae a Zoogonidae (van der Land & Bailly 2008).

Druhým druhem vranky je *Gymnocanthus tricuspis* Reinhardt, 1830 (česky vranka severní; Obr. 5). Je zpravidla menší než *M. scorpius*, dorůstá délky max. 30 cm. Charakteristickým znakem tohoto druhu je osten na skřelích, který se na konci rozděluje do tří menších ostnů, podle čehož dostala vranka druhový název. Mívá méně masivní hlavu než *M. scorpius*. Řitní ploutev má delší (15-19 paprsků) než *M. scorpius* (9-15 paprsků). Zbarvení nabývá různých světlých odstínů hnědé s tmavě hnědým mramorováním. Břišní strana je zpravidla bílá nebo nabývá světle žlutých odstínů. Potravně zabírá stejnou niku jako *M. scorpius*, avšak preferují spíše prostředí s holým sedimentem, zatímco *M. scorpius* se běžně nachází v kelpových porostech. Rozšíření je také cirkumarktické. Vyskytuje se ve vodách do maximální hloubky 451 m a teplotami -2- +13 °C (FishBase). Z motolic čeledi Opecoelidae byly v trávicí trubici nalezeny druhy *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905 a *Stenakron vetustum* Stafford, 1904. Z dalších motolic zde byli nalezeni zástupci čeledí Fellodistomidae a Lepidapedidae (van der Land & Bailly 2008).



Obr. 5: Definitivní hostitelé motolic čeledi Opecoelidae na Svalbardu (Petuniabukta): **a)** *Gymnocanthus tricuspis* (vranka severní), **b)** samice *Myoxocephalus scorpius* (vranka mořská), **c)** spodní strana těla samce *Myoxocephalus scorpius*.

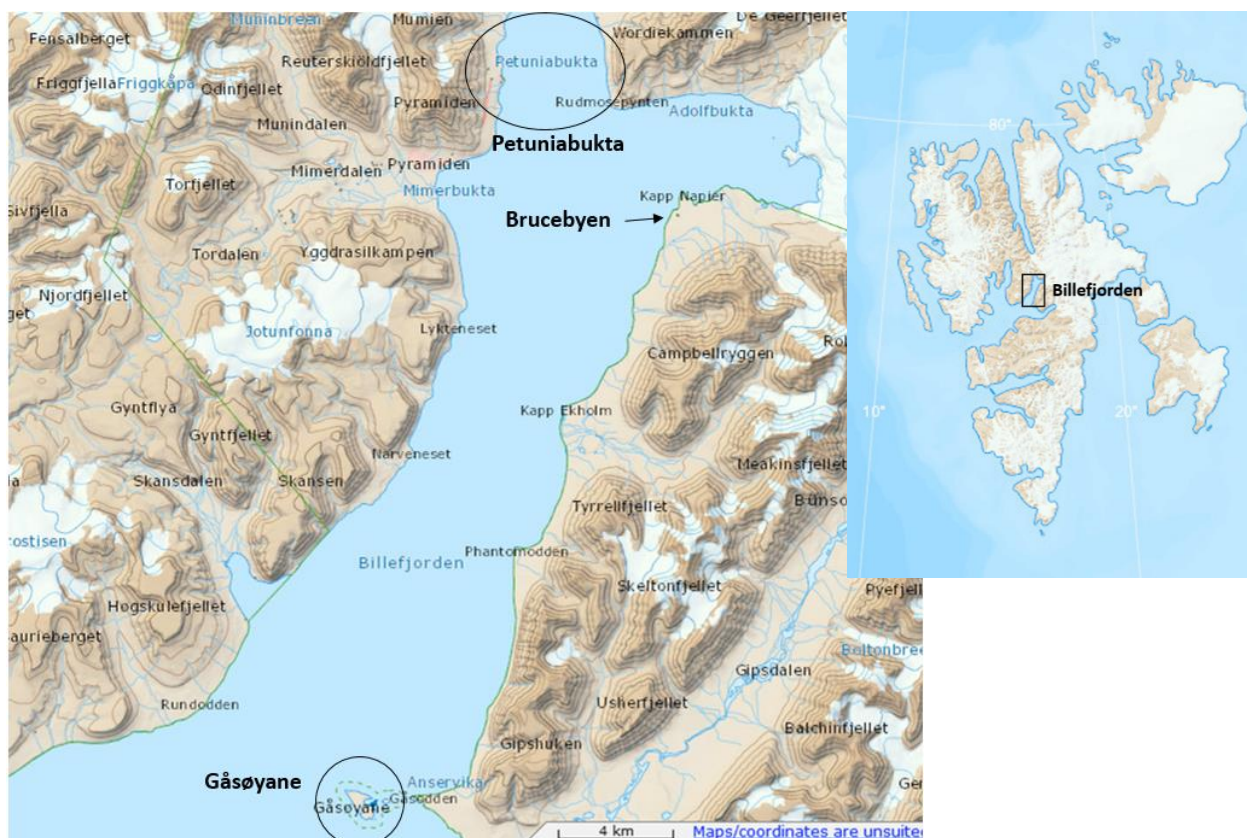
2. CÍLE PRÁCE

1. Pomocí molekulárních fylogenetických analýz DNA určit příbuznost dospělých stádií motolic z čeledi Opecoelidae z vranek *Myoxocephalus scorpius*, *Gymnocanthus tricuspis* a cotylocerních cercárií ze surmovek (Buccinidae) a tím osvětlit jejich vývojový cyklus.
2. Pomocí molekulárních fylogenetických analýz DNA popsat diverzitu motolic, nacházejících se v trávicím traktu vranek *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocanthus tricuspis* na Svalbardu.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Sběr vzorků

Vzorky motolic byly nasbírány v letech 2010, 2011, 2014 a 2018, nejčastěji na konci srpna a začátku září. Pochází z vraneček (*M. scorpius* a *G. tricuspis*) a surmovek (*Buccinum*) chycených v zátocích Petuniabukta, Brucebyen a Gåsøyane (vše je v rámci zálivu Billefjord; Obr. 6). Jak vranky tak surmovky se nejčastěji chytaly do tenat (typ rybářské sítě) či pastí na kraby. Všechny úlovky pocházejí z hloubky do 20 m. Chycené vranky i surmovky byly zabity až těsně před parazitologickou pitvou. Partenogenetická stádia motolic se nacházela nejčastěji v hepatopankreatu plže a dospělá stádia motolic byla nacházena ve střevě ryby. Vzorky byly izolovány a fixovány 96% etanolem a v případě vyššího počtu vzorků také horkým formalínem. Veškeré vzorky byly poté dovezeny do laboratoře Centra polární ekologie v Českých Budějovicích. V laboratoři byly poté motolice uchované ve formalínu barveny Schubertovým karminem. Pro účely této práce bylo nabarveno 11 motolic z *M. scorpius* (Obr. 7, Obr. 10) a 3 z *G. tricuspis* (Obr. 11).



Obr. 6: Mapa zálivu Billefjord (Svalbard) s lokalitami odběru vzorků (Zdroj mapy: toposvalbard.npolar.no).

3.2. Barvení železitým acetokarmínem

Barvení motolic karmínem slouží hlavně ke zvýraznění tkáňových struktur a orgánů v jejich těle. Motolice byly přeneseny z formalínu do 30% roztoku etanolu, poté do 70% roztoku etanolu. V každém roztoku byly ponechány 15 minut. Tento postup slouží hlavně k odstranění formalínu a přebytečné vody ze vzorku. Poté byl vzorek na 2,5 hodiny ponořen do 10% roztoku Schruberova karmínu v 70% etanolu s příměsí HCl. Po barvení byl vzorek přenesen do 70% etanolu s příměsí HCl, kde probíhá odstranění přebytečné barvy. Pro zvýraznění veškerých struktur po odbarvení byly vzorky ještě 15 minut projasněny hřebíčkovým olejem. Poté podstoupil vzorek alkoholovou řadou sloužící k dehydrataci vzorku. Na 15 minut byl vzorek ponořen v 70%, 80%, 90%, 96% a dvakrát v absolutním (blížícímu se koncentraci 100%) roztoku etanolu. 100% etanol vznikl adsorpcí vody na vyžíhaných keramických kuličkách s mikroskopickými póry. Z dehydratovaného vzorku se na podložním sklíčku po zalití do kanadského balzámu vytvořil trvalý preparát na pozdější morfologické analýzy.



Obr. 7: Motolice *Podocotyle atomon* (Opecoelidae) z hostitele *M. scorpius*, obarvena železitým acetokarmínem, měřítko 200 µm.

3.3. Molekulární analýza

Pro molekulární fylogenetické analýzy byly využity motolice fixované a uchované v etanolu (Tab. 1). Před samotnou lyzí byly vzorky usušeny ve vakuovaném koncentrátoru, aby se zbavily veškerého alkoholu. Pro extrakci DNA byl použit laboratorní kit Exgene SV mini a dříve Macherey-Nagel Nucleo Spin tissue. Následná extrakce a purifikace DNA proběhla za použití kolonek se silica membránou dle návodu výrobce. Vzorky DNA byly po izolaci skladovány při teplotě -20 °C.

Tab. 1: Seznam vzorků DNA izolovaných z motolic vyskytujících se u následujících hostitelů

hostitel	počet izolovaných vzorků DNA
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	18
<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	13
<i>Buccinum undatum</i>	6

Pro PCR amplifikaci byly vybrány 2 geny. Prvním z nich je gen pro velkou ribosomální podjednotku (LSU rDNA nebo také 28S rDNA u eukaryot) (Eperon et al. 1980). Primery využitý na amplifikaci LSU rDNA jsou LSU5 (5'-TAGGTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC-3') a 1500R (5'-GCT ATC CTG AGGGAA ACT TCG-3') (Martin et al. 2017). Pro PCR reakci byl použit Plain PP Master mix (Top Bio, Česká republika), který v sobě obsahoval Taq polymerázu. PCR reakce probíhala v následujících cyklech: 1x (denaturace 4 min. při 95 °C), 30x (1 min. 95 °C, 1 min. 56 °C, 2 min. 72 °C) a 1x (1 min. 95 °C, 45 s 55 °C, 4 min. 72 °C) (Martin et al. 2017). Výsledky PCR reakce a velikost získaných DNA fragmentů byly ověřovány gelovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu s přídavkem GoodView™ Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, Čína) při napětí zdroje 70 V po dobu 45 minut. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm. Jako DNA marker byl použit 100 bp DNA ladder (Solis BioDyne, Estonsko).

Druhý vybraný gen byl vybrán ITS1+5,8S+ITS2 (Jousson et al. 1999). Výhodou ITS sekvencí (ITS1 a ITS2) oproti 28S rDNA je vyšší variabilita mezi blízkce příbuznými druhy organismů (Jousson et al. 1999). Primery, vybraný pro amplifikaci této sekvence, jsou S18 (5'-TAACAGGTCTGTGATGCC-3') a L3T (5'-CAACTTTCCTCACGGTACTTG-3') (Jousson et al. 1999). PCR probíhala v následujících cyklech: 40x (30 s 93,5 °C, 30 s 50 °C a 120 s 72 °C) a poté 1x 5 min. 72 °C (Jousson et al. 1998).

Pozitivní PCR produkty byly přečištěny enzymaticky, s použitím mixu 0,5 µl Exo I (Exonuclease I z *E. coli*, Thermo Scientific, 20 000 U/ml) a 2 µl FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase; Thermo Scientific 1 u/µl) a 2,5 µl H₂O. Vlastní přečišťování probíhalo v termocycleru za následujících podmínek: 15 min. 37 °C a 15 min. 80 °C. Přečištěné PCR produkty pozitivních vzorků byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit na sekvenátoru

ABI3130 (SEQme, ČR) za použití PCR primerů. Pro 28S rDNA byl navíc použit sekvenační primer 300F (5'-CAA GTA CCG TGA GGG AAAGTT-3'). Na sekvenaci bylo zasláno 72 vzorků (24 sekvencí) s 28S rDNA a 42 vzorků (21 sekvencí) s ITS1+5,8S+ITS2.

3.4. **Fylogenetické analýzy**

Pro zjištění fylogenetických vztahů získaných sekvencí byly vytvořeny jedno-genové matice (pro 28S rDNA a ITS). Tyto matice byly vytvořeny použitím získaných sekvencí v této práci a sekvencí vybraných z databáze GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Jako outgroup byla vybrána nejčastěji sesterská čeleď osekvenovaných motolic. Úprava a alignment sekvencí se prováděl v programu Geneious Prime 2019.0.4 (Biomatters Ltd.). Poté byl v tomto programu alignment ručně upraven. Alignment byl vytvořen pomocí pluginu MAFFT v.6 (Kato et al. 2002, 2005). Fylogenetické vztahy mezi motolicemi byly poté rekonstruovány pomocí metody Maximální věrohodnosti (Maximum likelihood, ML) modelem GTR+ I+ Γ se 4 kategoriemi, který byl zvolen na základě článku Martin et al. (2017). Bootstrapová podpora byla získána na základě 1000 opakování metodou ultrafast bootstrap. Analýza byla provedena v programu IQ-Tree 1.6.9 (Hoang et al. 2018; Nguyen et al. 2015). Druhou provedenou fylogenetickou analýzou je Bayesianovská analýza (Bayesian inference, BI). Analýza byla provedena pomocí pluginu MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) v programu Geneious Prime pomocí modelu (GTR+ Γ se 4 kategoriemi) pro 1 000 000 generací, přičemž 100 000 vzorků bylo vyřazeno jako „burn in“. Tento model byl již v programu nastaven jako defaultní. Také byla v programu Geneious Prime pomocí pluginu MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) vyhodnocena distanční matice mezi osekvenovanými vzorky ze Svalbardu a nejbližším příbuzným druhem z databáze GenBank. Fylogenetické stromy byly následně graficky upraveny v programu FigTree 1.4.3. a Inkscape 0.92.3.

4. VÝSLEDKY

V rámci terénního kurzu polární ekologie na Svalbardu, kterého jsem se 20. 8.- 3. 9. 2018 zúčastnil, a odkud také většina vzorků pochází, byly nachytány a následně vypitvány druhy, které jsou uvedeny v Tab. 2. Zatímco veškeré nachytané vranky (*M. scorpius*, *G. tricuspis*) pochází ze zátoky Petuniabukta, surmovky (Buccinidae) byly nachytány jak ze zátoky Petuniabukta tak z okolních vod města Longerbyern (LYR), kde však byl chycen pouze 1 pozitivní vzorek z *P. kroeyeri*.

Tab. 2: Přehled pitvaných druhů živočichů, u kterých se vyskytují motolice čeledi Opecoelidae, získaných během kurzu polární ekologie v roce 2018.

druh	počet jedinců	lokalita	prevalence	počet parazitů
<i>M. scorpius</i>	13	Petuniabukta	10/13	2-20
<i>G. tricuspis</i>	15	Petuniabukta	8/15	1-13
<i>B. undatum</i>	7	Petuniabukta	3/7	stovky
<i>B. undatum</i>	24	LYR	0/24	-
<i>B. glaciale</i>	13	LYR	0/13	-
<i>P. kroeyeri</i>	5	LYR	1/5	stovky

Mimo motolice se ve střevě vranek *M. scorpius* také nacházely v 7 exemplářích tasemnice druhu *Diplocotyle olrikii* Krabbe, 1874, či v břišní dutině byly u většiny ryb přítomny hlístice rodu *Anisakis* Dujardin, 1845. Na žábrech také nacházeli nálevníci rodu *Trichodina* Ehrenberg, 1830. V hepatopankreatu surmoven (Buccinidae) se zase mimo sporocysty a cercárie motolic čeledi Opecoelidae nacházely ve 4 exemplářích sporocysty a cercárie motolic čeledi Heterophyidae Leiper, 1909.

Z 37 vzorků DNA motolic (18 z *M. scorpius*, 13 z *G. tricuspis* a 6 z *B. undatum*) se podařilo 24 vzorků 28S rDNA úspěšně amplifikovat (kontrola agarózovou elektroforézou) a poslat na sekvenaci. Z toho bylo 12 od *M. scorpius*, 9 od *G. tricuspis* a 3 od *B. undatum*. Pro fylogenetické analýzy bylo použito 19 vzorků (9 od *M. scorpius*, 7 od *G. tricuspis* a 3 od *B. undatum*). Pět vzorků bohužel buď nešlo alignovat s ostatními vzorky či jejich kvalita nebyla dostatečně dobrá. Již na základě zadání sekvencí do Standard Nucleotide BLAST od NCBI bylo zjištěno, že ve vzorcích se nacházejí motolice čeledi Opecoelidae a Fellodistomidae, které jsou od sebe fylogeneticky značně vzdálené (Fellodistomidae se nacházejí v podřádu Bucephalata zatímco Opecoelidae se nacházejí v podřádu Xiphidiata) (Olson et al. 2003; Obr. 2). Na základě tohoto zjištění byly zhotoveny fylogenetické analýzy zvlášť pro vzorky obou čeledí. Byly prováděny pouze fylogenetické analýzy 28S rDNA, jelikož z jejich vzorků bylo získáno více spolehlivých dat (vyšší kvalita sekvencí) a v GenBank databázi má u příbuzných druhů motolic tento gen daleko vyšší zastoupení než ITS sekvence.

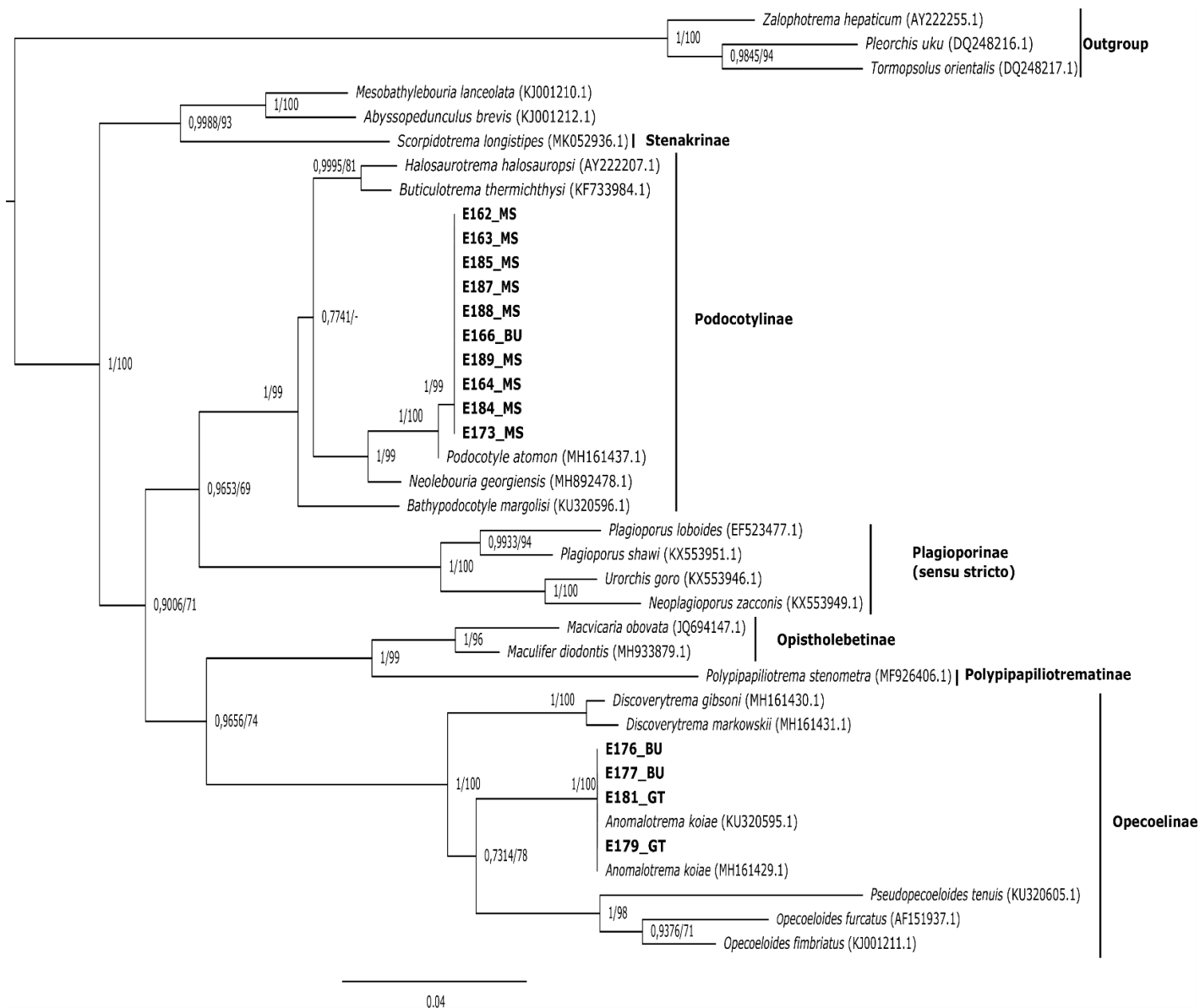
4.1. Nalezené motolice čeledi Opecoelidae Ozaki, 1925

Převážnou část vzorků (9 od *M. scorpius*, 2 od *G. tricuspis* a 3 od *B. undatum*) tvořily motolice čeledi Opecoelidae. Při fylogenetických analýzách byly jako „outgroup“ zvoleny sekvence druhů sesterských čeledí Acanthocolpidae Lühe, 1906 (*Pleorchis uku* Yamaguti, 1970 a *Tormopsolus orientalis* Yamaguti, 1934) a Brachycladiidae Odhner, 1905 (*Zalophotrema hepaticum* Stunkard & Alvey, 1929). Získané sekvence (Tab. 3) dohromady se sekvencemi z GenBank databáze (Tab. 7, Příloha) byly následně alignovány, manuálně upraveny na totožnou délku 1242 bazí a porovnány ML a BI analýzami (Obr. 8).

Lze tu pozorovat, že veškeré sekvence motolic izolovaných z vranky *M. scorpius* a jedné ze surmovky *B. undatum* se klastrovaly se sekvencí druhu *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905, který byl z plže *Littorina saxatilis*. Sekvence motolic z vranky *G. tricuspis* a zbylé sekvence motolic ze surmovky *B. undatum* se klastrovaly se sekvencí druhu *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 izolovaných z okouníka *Sebastes viviparus* a hranáče *Eumicrotremus fedorovi*. Poté byla vyhodnocena procentuální příbuznost pomocí distanční matice mezi zmíněnými vzorky (Tab. 4).

Tab. 3: Přehled nově získaných sekvencí DNA motolic čeledi Opecoelidae ze Svalbardu.

druh	hostitel	lokalita	kód sekvence	literatura
E162_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E163_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E164_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E165_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Gåsøyane	-	-
E166_BU	<i>Buccinum undatum</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E173_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E176_BU	<i>Buccinum undatum</i>	Svalbard, Brucebyen	-	-
E177_BU	<i>Buccinum undatum</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E179_GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E181_GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E182_GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E184_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E185_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E186_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E187_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E188_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E189_MS	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E190_GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-



Obr. 8: Kladogram fylogenetických vztahů motolic čeledi Opecoelidae vytvořený na základě ML a BI analytických metod na základě genu 28S rDNA. Vzorky nasbírané na Svalbardu jsou uvedeny tučně kódem jako: kód sekvence_hostitel (MS- *M. scorpius*, GT- *G. tricuspis* a BU- *B. undatum*). Hodnoty uvedené na uzlech značí apriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP)/bootstrap, přičemž jsou uváděny hodnoty u PP přesahující hodnotu 0,50 a ML bootstrap přesahující 70%. Rody *Abyssopedunculus* a *Mesobathylebouria* nejsou zařazeny do žádné podčeledi.

Tab. 4: Procentuální příbuznost (distanční matice) mezi sekvencemi získanými ze Svalbardu a nejpříbuznější sekvencí (druhem) získanou z databáze GenBank.

	E162_MS	E163_MS	E164_MS	E166_BU	E173_MS	E184_MS	E185_MS	E187_MS	E188_MS	E189_MS
<i>Podocotyle atomon</i> (MH161437)	99,669	99,669	99,545	99,669	99,586	99,545	99,669	99,669	99,669	99,504
E162_MS	-	100	99,876	100	99,917	99,876	100	100	100	99,835
E163_MS	-	-	99,876	100	99,917	99,876	100	100	100	99,835
E164_MS	-	-	-	99,876	99,793	99,752	99,876	99,876	99,876	99,752
E166_BU	-	-	-	-	99,917	99,876	100	100	100	99,835
E173_MS	-	-	-	-	-	99,876	99,917	99,917	99,917	99,793
E184_MS	-	-	-	-	-	-	99,876	99,876	99,876	99,752
E185_MS	-	-	-	-	-	-	-	100	100	99,835
E187_MS	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,835
E188_MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,835

	E176_BU	E177_BU	E179_GT	E181_GT
<i>Anomalotrema koiae</i> (MH161429)	99,793	100	99,959	100
<i>Anomalotrema koiae</i> (KU320595)	99,793	100	99,959	100
E176_BU	-	99,793	99,751	99,793
E177_BU	-	-	99,959	100
E179_GT	-	-	-	99,959

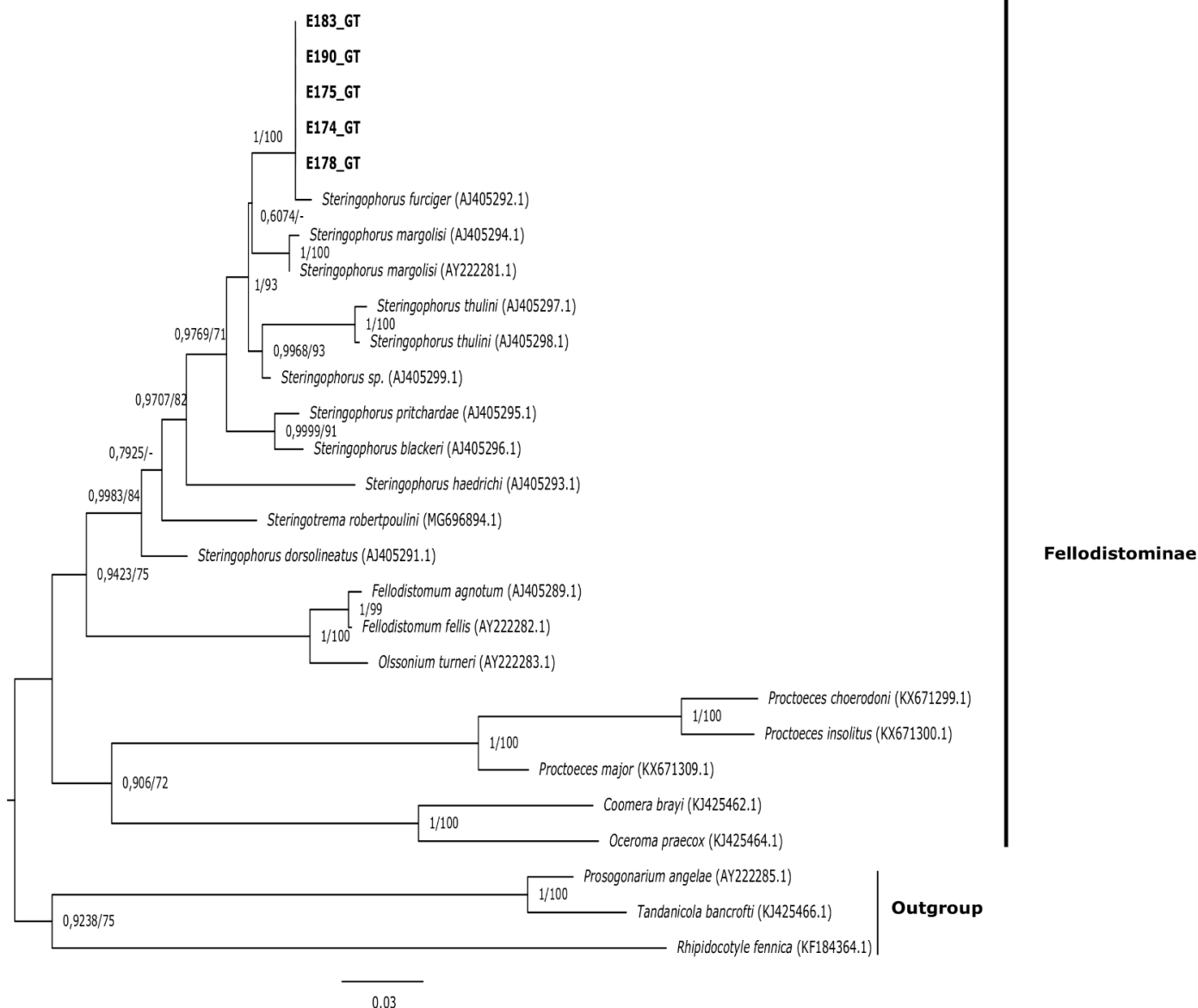
4.2. Nalezené motolice čeledi Fellodistomidae Nicoll, 1909

U pěti vzorků z vranky *G. tricuspis* byla zjištěna příbuznost (na základě NCBI BLAST) k odlišné čeledi Fellodistomidae. Pro fylogenetické analýzy této čeledi byly využity jako outgroup sekvence druhů sesterských čeledí Tandanicolidae Johnston, 1927 (*Prosogonarium angelae* Cribb & Bray, 1994, *Tandanicola bancrofti* Johnston, 1927) a Bucephalidae Poche, 1907 (*Rhipidocotyle fennica* Gibson, Taskinen & Valtonen, 1992). Získané sekvence (Tab. 5) byly následně porovnány a alignovány se sekvencemi z databáze GenBank (Tab. 8, Příloha) a poté manuálně upraveny na stejnou délku 888 bází. Poté byla provedena ML a BI analýza (Obr. 9).

Veškeré získané sekvence se klastrovaly se sekvencí druhu *Steringophorus furciger* (Olsson, 1867) Odhner, 1905 izolovaného z platýze *Limanda limanda*. Poté byla sestavena distanční matice porovnávající procentuální příbuznost získaných vzorků ke *S. furciger* (Tab. 6).

Tab. 5: Přehled nově získaných sekvencí DNA motolic čeledi Fellodistomidae ze Svalbardu.

druh	hostitel	lokalita	kód sekvence (ncbi)	literatura
E174GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E175GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Brucebyen	-	-
E178GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E183GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-
E190GT	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Svalbard, Petuniabukta	-	-



Obr. 9: Kladogram fylogenetických vztahů motolic čeledi Fellodistomidae vytvořený na základě ML a BI analytických metod na základě genu 28S rDNA. Vzorky nasbírané na Svalbardu jsou uvedeny tučně kódem jako: E(kód)_druh hostitele (GT- *G. tricuspis*). Hodnoty uvedené na uzlech značí apriorní pravděpodobnost (posterior probability, PP)/bootstrap, přičemž jsou uváděny hodnoty u PP přesahující 0,50 a ML bootstrap přesahující 70%.

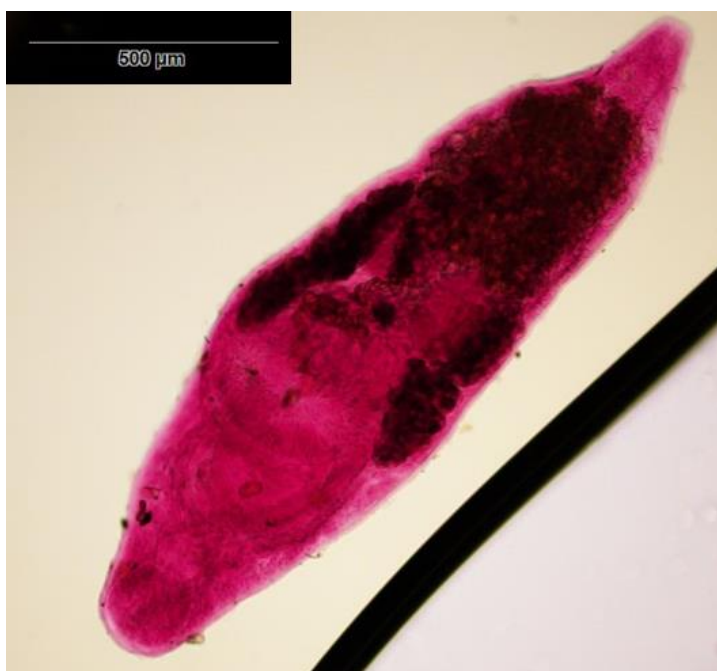
Tab. 6: Procentuální příbuznost (distanční matice) mezi sekvencemi získanými ze Svalbardu a nejpříbuznější sekvencí (druhem) získanou z databáze GenBank.

	E174-GT	E175_GT	E178GT	E183_GT	E190_GT
<i>Steringophorus furciger</i> (AJ405292)	99,366	99,423	99,308	99,423	99,423
E174_GT	-	99,942	99,885	99,942	99,942
E175_GT	-	-	99,885	100	100
E178_GT	-	-	-	99,885	99,885
E183_GT	-	-	-	-	100

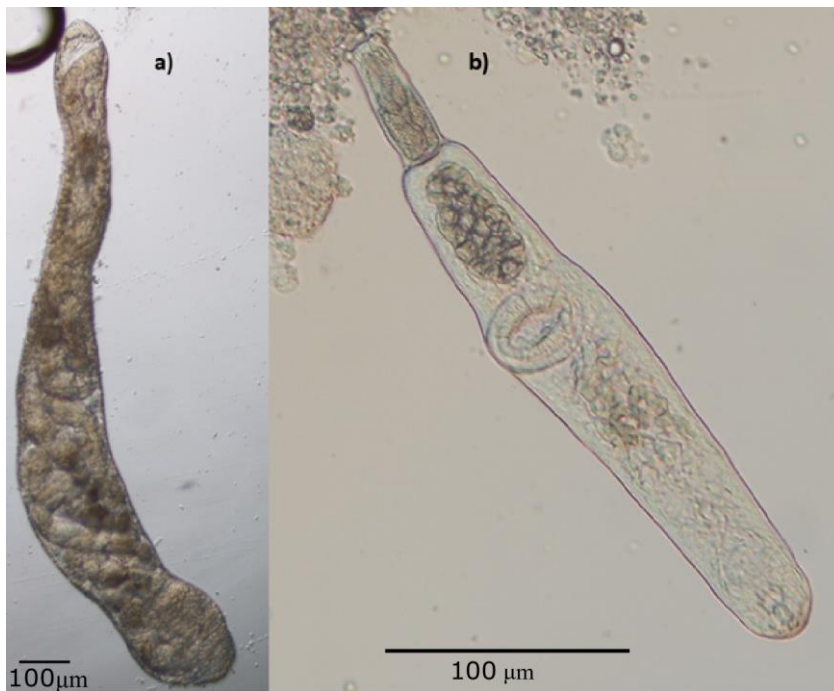
4.3. Fotografická dokumentace



Obr. 10: Dospělé stádium motolice druhu *P. atomon* (Opecoelidae) vyizolované z trávicího traktu *M. scorpius* a nabarvené železitým acetokarmínem; měřítko 500 µm.



Obr. 11: Dospělé stádium motolice druhu *Steringophorus furciger* (Fellodistomidae) vyizolované z trávicího traktu *G. tricuspis* a nabarvené železitým acetokarmínem; měřítko 500 µm.



Obr. 12: Vývojové fáze motolice čeledi Opecoelidae vyizolované z *B. undatum*: **a)** sporocysta, **b)** ciliated cercaria; měřítko 100 µm.

5. DISKUSE

V rámci práce byly pomocí molekulárních metod sekvenace DNA nalezeny 3 druhy motolic infikující 2 druhy vranek *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocanthus tricuspis*. Bylo zjištěno, že nalezené druhy motolic patří do dvou čeledí Opecoelidae a Fellodistomidae charakteristických pro mořské a sladkovodní ekosystémy, a jejichž definitivními hostiteli jsou výhradně paprskoploutvé ryby. Přítomnost motolic čeledi Fellodistomidae byla v případě vranek obývajících záliv Billefjord na Svalbardu překvapivá, jelikož se ve dřívější studentské studii, zabývající se hlavně druhovým zařazením motolic na základě morfologických znaků a ani v pitevních protokolech nebyla žádná zmínka, ikdyž jsou od čeledi Opecoelidae značně fylogeneticky vzdálené a morfologicky s v mnohých znacích lišící (Olson et al. 2003). Proto jsem se v úvodu stručně zabýval i čeledí Fellodistomidae.

Druh *Steringophorus furciger* (Olsson, 1867) Odhner, 1905 (Obr. 11) byl nalezen ve svém dospělém stádiu v pěti ze sedmi vzorků z vranek severních (*G. tricuspis*). Mezihostitelé tohoto druhu na Svalbardu dosud nejsou známi. Tento druh již byl dle databáze WoRMS zaznamenán u *G. tricuspis*, což znamená, že jeho výskyt tu mohl být předpokládán. Tento druh, jak je již výše zmíněno, je schopen nakazit široké spektrum paprskoploutvých ryb (charakteristický pro čeledi Pleuronectidae, Anarhichadidae, Cottidae,...), tedy jedná se o hostitelského generalistu (v rámci definitivních hostitelů). Hlavními morfologickými rozdíly mezi tímto druhem a ostatními nalezenými motolicemi čeledi Opecoelidae jsou dva shluky vitelinních folikulů, uterem nacházejícím se z větší části posteriorně od testes, absence prefarynxu a exkreční měchýř ve tvaru Y (Bray 2002). Druh je hlavně rozšířen v severním Atlantiku (pobřeží Kanady, Grónska, Islandu, Irska a Skandinávie, Severní moře) a také pobřeží ostrova Vancouver a Honšú (Gibson 2013).

Porovnáním procentuální příbuznosti motolic si lze všimnout (Tab. 6), že jedinci ze Svalbardu jsou si mnohem příbuznější navzájem než s jedincem vyloveným poblíž Velké Británie. V rámci méj práce by bylo výhodné k tomuto druhu dodat také morfologická data, jelikož barvení karminem u exemplářů tohoto druhu se úplně nezdařilo, aby se dalo povšimnout veškerých znaků odlišujících tento druh od ostatních.

Druhou čeledí vyskytující se u vranek je čeleď Opecoelidae. Je zde zastoupena dvěma druhy. Prvním z nich je druh *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 z podčeledi Opecoelinae. Ten se vyskytoval jak ve střevě vranky *G. tricuspis*, tak byl nalezen v hepatopankreatu surmovky *B. undatum*. Podle databáze WoRMS nebyl u *G. tricuspis* ani *B. undatum* uveden výskyt tohoto druhu. Druh *A. koiae* byl pozorován hlavně ve druzích ryb čeledi Sebastidae a Pleuronectidae a druhů např. *Eumicrotremus fedorovi*, *Enchelyopus cimbrius*, *Helicolenus dactylopterus* a *Phycis chesteri*. Výskyt tohoto druhu je uváděn převážně v severním Atlantiku a Pacifiku (WoRMS; Sokolov et al. 2018). Od druhu *Podocotyle atomon* se liší hlavně děložním receptaculem seminis, membránovým cirrovým vakem a rozmístěním vitelinních folikulů, přičemž *A. koiae* je má více nahloučený v zadní části těla (Sokolov et al. 2018).

Bohužel, zatím v rámci mojí práce nebyl nalezen exemplář, který by šel na základě morfologických charakteristik určit jako *A. koiae* (žádná motolice tohoto druhu nebyla barvena karmínem).

U všech vzorků z vranek *M. scorpius* na základě molekulárních analýz 28S rDNA popsán druh čeledi Opecoelidae *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905 (Obr. 7, Obr. 10). Tento druh motolice byla také nalezen ve vrance *M. scorpius* v dřívější studentské práci (Otáhal 2015), kde autor porovnával poměr délky těla motolice ke vzdálenosti přísavky, který je pro každý druh motolice rodu *Podocotyle* specifický. Byla také nalezena jeho partenogenetická parazitická stádia v jednom vzorku ze surmovky *B. undatum*. Jde o druh podčeledi Podocotylinae, která byla obnovena na základě molekulárních fylogenetických studií v roce 2018 (Martin, Huston et al. 2018). Tato podčeď obsahuje většinou motolice parazitující u hlubokomořských ryb.

Podle databáze WoRMS byla motolice *P. atomon* pozorována jak u *M. scorpius*, tak *G. tricuspis*, avšak nebyla zatím popsána z *B. undatum*. V případě tohoto druhu jde spíše o hostitelského generalistu (což se týká hlavně definitivních hostitelů) nalezeného ve více jak 30 druzích ryb různých čeledí (Cottidae, Pleuronectidae, Scombridae, Anarhichadidae,...). Výskyt tohoto druhu je převážně v Severním Atlantiku, severním a západním pobřeží Kanady a Barentsově moři (WoRMS). Také byl zaznamenán výskyt ve vodách Mosambického průlivu (Parukhin 1976).

Porovnáním příbuznosti *P. atomon* ve vrance mořské (*M. scorpius*), *A. koiae* ve vrance severní (*G. tricuspis*) a partenogenetických parazitických stádií v hepatopankreatu surmovky *B. undatum* se potvrdila jejich specifická druhová příbuznost a také jejich vývojový cyklus. Jak *P. atomon* tak *A. koiae* využívají surmovku *B. undatum* jako svého prvního mezihostitele. Avšak toto tvrzení bylo podpořeno jen malým počtem vzorků, které je potřeba navýšit a ještě potvrdit morfologickou analýzou cercárií.

Další zajímavým faktem je, že u dvou blízce příbuzných vranek žijících ve stejném zálivu se nacházejí rozdílná společenstva motolic. Jednou z možností je rozdílná druhová biotopová specifita, kdy vranka mořská (*M. scorpius*) se váže spíše na prostředí s kamenitým podložím, které je většinou zarostlé chaluhoým porostem, kde se vyskytují jiné druhy živočichů (potenciálních mezihostitelů motolic), než je tomu u prostředí s holým bahnitým dnem pokrytým ledovcovými sedimenty, které preferuje vranka severní (*G. tricuspis*) (Moen & Svensen 2004).

V rámci budoucí práce by bylo potřeba se zaměřit hlavně na studii rozdílů v morfologických znacích u nalezených dospělých stádií motolic a také jejich cercárií, což by hlavně platilo pro cercárie čeledi Opecoelidae. Jednalo by se hlavně o metody barvení karmínem a elektronové mikroskopii. Také by bylo vhodné ověřit výsledky fylogenetickými analýzami jiného genu např. COI.

Také zde nastává problém, že se v této práci opomíjí fakt, že osekvenované motolice by mohly ve skutečnosti být motolice ryb, které byly požřeny zkoumanou vrankou. Nejčastěji nacházenou potravou vranek byli korýši, menší jedinci vlastního druhu či jiné ryby nejčastěji druhu *Lumpenus lampraeformis* (Stichaeidae). Z toho důvodu byly poté výsledné druhy motolic porovnány s daty v databázi WoRMS, které buď potvrdzovaly výskyt u stejného druhu hostitele, jako byl nalezen v rámci této práce na Svalbardu (platí pro *P. atomon* a *S. fusciger*) či u jeho příbuzných druhů (platí pro *A.*

koiae). Druhou možností, jak se vyvarovat tomuto problému je morfologická studie osekvenovaných jedinců, čímž se propojí data z molekulární a morfologické studie a vznikne ucelený souhrn dat o každém druhu motolice a nemůže dojít k žádné záměně za cizorodou DNA.

6. ZÁVĚRY

- Ve střevě vranky mořské (*Myoxocephalus scorpius*) byla na základě genu 28S rDNA nalezena dospělá stádia motolic *Podocotyle atomon* (Opecoelidae, Digenea). Partenogenetická parazitická stádia byla nalezena v surmovce vlnité (*Buccinum undatum*). Přítomnost tohoto druhu v surmovkách vlnitých zatím nebyla v žádné odborné literatuře doložena.
- Ve střevě vranky severní (*Gymnocanthus tricuspis*) byla na základě genu 28S rDNA nalezena dospělá stádia motolic druhu *Anomalotrema koiae* (Opecoelidae, Digenea). Partenogenetická parazitická stádia *A. koiae* byla také nalezena v surmovce vlnité (*Buccinum undatum*). V případě druhu *A. koiae* jde o první nález této motolice u *G. tricuspis* a *B. undatum*.
- Ve střevě vranky severní (*Gymnocanthus tricuspis*) byla na základě genu 28S rDNA nalezena dospělá stádia motolic druhu *Steringophorus furciger* (Fellodistomidae, Digenea). Mezihostitelé tohoto druhu na Svalbardu jsou zatím neznámí.
- Na základě genu 28S rDNA se podařilo ověřit druhová totožnost dospělých stádií motolic ve vrankách a partenogenetických parazitických stádií v surmovkách. Tato data pak objasňují jejich vývojový cyklus přes prvního mezihostitele surmovku vlnitou (*B. undatum*) a definitivního hostitele vranku mořskou (*M. scorpius*) pro motolici *P. atomon* a vranku severní (*G. tricuspis*) pro motolici *A. koiae*.

7. LITERATURA

1. ANDRES, M., J., PULIS, E., E., OVERSTREET, R., M., (2014), New genus of opecoelid trematode from *Pristipomoides aquilonaris* (Perciformes: Lutjanidae) and its phylogenetic affinity within the family Opecoelidae, *Folia Parasitologica*, 61: 221-230.
2. ANUCHERNGCHAI, S., TEJANGKURA, T., CHONTANANARTH, T., (2016), Epidemiological situation and molecular identification of cercarial stage in freshwater snails in Chao-Phraya Basin, Central Thailand, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6: 539-545.
3. BARGER, M., A., ESCH, G., W., (2000), *Plagioporus sinitsini* (Digenea: Opecoelidae): A One-Host Life Cycle, *Journal of Parasitology*, 86: 150-153.
4. BARKER, S., C., BLAIR, D., CRIBB, T., H., TONION, K., (1993), Phylogenetic position of *Heronimus mollis* (Digenea): evidence from 18S ribosomal RNA, *Internal Journal for Parasitology*, 23: 533- 536.
5. BOGOTISH, B., J., CARTER, C., E., OELTMANN, T., N., (2005), General Characteristics of the Trematoda, *Human parasitology*, Elsevier Academic Press, 459 pp.
6. BOUCHET, P., GOFAS, S., (online) *Buccinum polare* Gray, 1839, (cit. 17. 3. 2019), World Register of Marine Species.
7. BRAY, R., A., (2002), Family Fellodistomidae Nicoll, 1909, *Keys to trematoda*, 1: 261-293.
8. BRAY, R., A., CAMPBELL, R., A., (1995), Fellodistomidae and Zoogonidae (Digenea) of deep-sea fishes of the NW Atlantic Ocean, *Systematic Parasitology*, 31: 201-213.
9. BRAY, R., A., CRIBB, T., H., LITTLEWOOD, D., T., J., WAESCHENBACH, A., (2016), The molecular phylogeny of the digenean family Opecoelidae Ozaki, 1925 and the value of morphological characters, with the erection of a new subfamily, *Folia Parasitologica*, 63: 13- 24.
10. BRAY, R., A., WAESCHENBACH, A., DYAL, P., LITTLEWOOD, D., T., MORAND, S., (2014), New digeneans (Opecoelidae) from hydrothermal vent fishes in the south eastern Pacific Ocean, including one new genus and five new species. *Zootaxa*, 3768: 73-87.
11. BRAY, R., H., LITTLEWOOD, D., T., HERNIOU, E., A., WILLIAMS, B., HENDERSON, R., E., (1999), Digenean parasites of deep-sea teleosts: a review and case studies of intrageneric phylogenies, *Parasitology*, 119: 125-144.
12. BRAY. R., A., WEBSTER, B., L., BARTOLI, P., LITTLEWOOD, D., T., J., (2005), Relationship within the Acanthocolpidae Lühe, 1906 and their place among the Digenea, *Acta Parasitologica*, 50: 281-291.

13. CRIBB, T., H., (2004), Family Opecoelidae Oazaki, 1925, Keys to trematoda, 2: 443-531.
14. CRIBB, T., H., HALL, K., BARKER, S., (1999), V4 region of small subunit rDNA indicates polyphyly of the Fellodistomidae (Digenea) which is supported by morphology and life-cycle data, Systematic Parasitology, 43: 81-92.
15. CRIBB, T., H., MILLER, T., L., BRAY, R., A., CUTMORE, S., C., (2014), The sexual adult of *Cercaria praecox* Walker, 1971 (Digenea: Fellodistomidae), with the proposal of *Oceroma n. g.*, Systematic Parasitology, 88: 1-10.
16. CURRAN, S., S., OVERSTEER, R., M., TKACH, V., V., (2007), Phylogenetic affinities of *Plagiocirrus* Van Cleave and Mueller, 1932 with the description of a new species from the Pascagoula River, Mississippi, The Journal of parasitology, 93: 1452-1458.
17. DANIELS, R., R., BELTRAN, S., POULIN, R., LAGRUE, C., (2012), Do parasites adopt different strategies in different intermediate hosts? Host size, not host species, influences *Coitocaecum parvum* (Trematoda) life history strategy, size and egg production, Parasitology, p. 1-9.
18. ELELA, S., A., NAZAR, R., N., (1997), Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation, Nucleic Acids Research, 25: 1788-1794.
19. EPERON, I., C., ANDERSON, S., NIERLICH, D., P., (1980), Distinctive sequence of human mitochondrial ribosomal RNA genes, Nature, 286: 460-467.
20. FALTYNKOVA, A., GEORGIEVA, S., KOSTADINOVA, A., BRAY, R., A., (2017), Biodiversity and evolution of digeneans of fishes in the Southern Ocean, Parasitology research monographs, 9: 49-75.
21. FAYTON, T., J., ANDRES, M., J., (2016), New species of *Plagioporus* Stafford, 1904 (Digenea: Opecoelidae) from California, with an amendment of the genus and a phylogeny of freshwater plagioporines of the Holarctic, Systematic parasitology, 93: 731-748.
22. FRAUSSEN, K., TERRY, Y., (2019), How well are the northern whelks known? On the history of the Polar Whelk, *Buccinum polare* Gray, 1839 (Gastropoda: Buccinidae), Gloria Maris, 57: 134- 153.
23. FROESE, R., (online), *Myoxocephalus scorpius* (Linnaeus, 1758), (cit. 18. 3. 2019), FishBase.
24. FROESE, R., REYES, K., K., (online), *Gymnocanthus tricuspis* (Reinhardt, 1830), (cit. 18. 3. 2019), FishBase.
25. GIBSON, D., (online), *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) Odhner, 1905, (cit. 4. 4. 2019), World Register of Marine Organisms.
26. GIBSON, D., (online), *Steringophorus furciger* (Olsson, 1867) Odhner, 1905, (cit. 2. 4. 2019), World Register of Marine Organisms.
27. GIBSON, D., I., BRAY, R., A., (1979), The Hemiuroidea: terminology, systematics and evolution, Bull. Br. Museum (Nat. Hist.) (Zool. Ser.), 36: 35-146.

28. GOMES, A., KORF, B., (2018), Chapter 5 - Genetic Testing Techniques, Pediatric Cancer Genetics, 47-64.
29. HOANG, D., T., CHERNOMOR, O., von HAESELER, A., MINH, B., Q., (2018), UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap, Molecular biology and evolution, 35: 518-522.
30. HOBERG, E. P., KUTZ, S. J., (2013), Arctic Biodiversity Assessment: 2013, Chapter 15, Parasites, Conservation of Arctic Flora and Fauna, 421-449.
31. HUELSENBECK, J., RONQUIST, F., (2001), MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, Bioinformatics, 17: 754-755.
32. HUSTON, D., C., CUTMORE, S., C., CRIBB, T., H., (2017), Molecular phylogeny of the Haplosporinae Olson, Cribb, Tkach, Bray and Littlewood, 2003, with a description of *Schikhalotrema huffmani* n. sp., Acta Parasitologica, 62: 502-512.
33. JOUSSON, O., BARTOLI, P., (2003), The life-cycle of *Podocotyle scorpaenae* (Opelcoelidae: Digenea) demonstrated by comparative analysis of ribosomal DNA sequences, Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites, 1: 17-27.
34. JOUSSON, O., BARTOLI, P., PAWLOWSKI, J., (1999), Molecular identification of developmental stages in Opelcoelidae (Digenea), International Journal for Parasitology, 29: 1853-1858.
35. JOUSSON, O., BARTOLI, P., ZANINETTI, L., PAWLOWSKI, J., (1998), Use of the ITS rDNA for elucidation of some life-cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea), International Journal of Parasitology, 28: 1403-1411.
36. KOIE, M., (1969), On the endoparasites of *Buccinum undatum* L. with special reference to the trematodes, Ophelia, 6: 251-279.
37. KOSYAN, A., R., KANTOR, Y., I., (2012), Revision of the genus *Plicifusus* Dall, 1902 (Gastropoda: Buccinidae), Ruthenica, 22: 55-92.
38. KOVALCZUK, M., W., (2007), Molluscs in Kongsfjorden (Spitsbergen, Svalbard): a species list and patterns of distribution and diversity, Polar research, 26: 48-63.
39. LIGASOVÁ, A., ŠEBESTA, O., BULANTOVÁ, J., KASNY, M., (2011), Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti* - Ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations, Parasites & Vectors 4: 162.
40. LOCKE, S., A., VAN DAM, A., CAFFARA, M., PINTO, H., A., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D., BLANAR, C., A., (2018), Validity of the Diplostomoidea and Diplostomida (Digenea, Platyhelminthes) upheld in phylogenomic analysis, International Journal for Parasitology, 48: 1043-1059.
41. Longerbyern water temperature [online], Sea temperature info, 2018, [cit. 13. 10. 2018], Dostupné z: <https://seatemperature.info/longyearbyen-water-temperature.html>.

42. MARTIN, S., B., CUTMORE, S., C., CRIBB, T., H., (2017), Revision of *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea: Opecoelidae), with *Trilobovarium* n. g., for species infecting tropical and subtropical shallow-water fishes, *Systematic Parasitology*, 94: 307–338.
43. MARTIN, S., B., HUSTON, D., C., CUTMORE, S., C., CRIBB, T., H., (2018), A new classification for deep-sea opecoelid trematodes based on the phylogenetic position of some unusual taxa from shallow-water, herbivorous fishes off south-west Australia, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 20: 1-29.
44. MARTIN, S., B., RIBU, D., CUTMORE, S., C., CRIBB, T., H., (2018), Opistholobetes (Digenea: Opecoelidae) in Australian tetraodontiform fishes, *Systematic Parasitology*, 95: 743-781.
45. MARTIN, S., B., SASAL, P., CUTMORE S., C., WARD., S., AEBY, G., S., CRIBB, T., H., (2018), Intermediate host switches drive diversification among the largest trematode family: evidence from the Polypipapiliotrematinae n. subf. (Opecoelidae), parasites transmitted to butterflyfishes via predation of coral polyps, *International Journal of Parasitology*, 48: 1107-1126.
46. MAS-COMA, S., VALERO, M., A., BARGUES, M., D., (2009), *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, *Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control*, *Advances in Parasitology*, 69: 41-146.
47. MOEN, F., E., SVENSEN, E., (2004), *Myoxocephalus scorpius*- Shorthorn sculpin, Marine fish and invertebrates of Northern Europe, KOM, 608 pp.
48. MYŠKOVÁ, E., (2014), Střevní paraziti obratlovců na Svalbardu, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta, Diplomová práce, 66 pp.
49. NGUYEN, L., T., SCHMIDT, H., A., von HAESELER, A., MINH, B., Q., (2015), IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies, *Molecular biology and evolution*, 32: 268-274.
50. ODHNER, N., H., (1915), Die Molluskenfauna des Eisfjordes, *Kungl. Svenska Vet. Handl.* 54: 1- 274.
51. OLSON, P., CRIBB, T., TKACH, V., BRAY, R., LITTLEWOOD, D., (2003), Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda), *International Journal for Parasitology*, 33: 733-755.
52. PARUKHIN, A., M., (1976), Trematodes of fish in the Indian Ocean, *Biologiya Morya*, 38: 76-84.
53. PEARSON, J., C., (1992), On the position of the digenean family Heronimidae: an inquiry into a cladistic classification of the Digenea, *Systematic Parasitology*, 21: 81-166.
54. PERÉZ-PONCE DE LEON, G., ANGLADE, T., RANDHAWA, H., S., (2018), A new species of *Steringotrema* Odhner, 1911 (Trematoda: Fellodistomidae) from the New Zealand

- sole *Peltorhamphus novaezeelandiae* Günther off Kaka point in the Catlins, South Island, New Zealand, *Systematic Parasitology*, 95: 213-222.
55. POULIN, R., CRIBB, T., H., (2002), Trematode life cycles: short is sweet?, *Trends in Parasitology*, 18: 176-183.
 56. POULIN, R., MORAND, S., (2000), The Diversity of Parasites, *The Quarterly Review of Biology*, 75:277-293.
 57. RHODE, K., (1972), The Aspidogastrea, especially *Multicotyle purvisi* Dawes, 1941, *Advances in Parasitology*, 10: 77–151.
 58. RHODE, K., CRIBB, T., H., (2005), *Digenea (endoparasitic flukes)*, Marine parasitology, CSIRO Publishing, 592 pp.
 59. ROGERS, S., O., (2012), *Integrated molecular evolution*, CRC Press: Boca Raton, 391 pp.
 60. RÓŻYCKI, O., (1993), Shallow-water molluscs of Isfjorden (West Spitsbergen, Svalbard), *Polish polar research*, 14: 55- 64.
 61. SHELMEERDINE, R., L., ADAMSON, J., LAURENSEN, C., H., LESLIE, B., (2007), Size variation of the common whelk, *Buccinum undatum*, over large and small spatial scales: potential implications for micro-management within the fishery, *Fisheries Research*, 86: 201–206.
 62. SOKOLOV, S., G., SHCHENKOV, S., V., GORDEEV, I., I., (2018), Records of opecoeline species *Pseudopascoelus* cf. *vulgaris* and *Anomalotrema koiae* Gibson & Bray, 1984 (Trematoda, Opecoelidae, Opecoelinae) from fish of the North Pacific, with notes on the phylogeny of the family Opecoelidae, *Journal of Helminthology*, 24: 1-11.
 63. STEELE, V., J., STEELE, D., H., (2011), The biology of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) in the northwestern Atlantic. II. *Gammarus setosus* Dementieva, 1931, *Canadian Journal of Zoology*, 48: 659-671.
 64. STUNŽENAS, V., PETKEVIČIŪTĖ, R., STANEVIČIŪTĖ, G., BINKIENĖ, R., (2014), *Rhipidocotyle fennica* (Digenea: Bucephalidae) from *Anodonta anatina* and pike *Esox lucius* in Lithuania, *Parasitology Research*, 113: 3881-3883.
 65. TÉTREAU, F., HIMMELMAN, J., H., MEASURES, L., (2000), Impact of a castrating trematode, *Neophasis* sp., on the common whelk, *Buccinum undatum*, in the northern Gulf of St. Lawrence, *The Biological Bulletin*, 198: 261-271.
 66. THAENKHAM, U., BLAIR, D., NAWA, Y., WAIKAGUL, J., (2011), Families Opisthorchiidae and Heterophyidae: Are they distinct?, *Parasitology International*, 61: 90-93.
 67. TKACH, V., V., KUDLAI, O., KOSTADINOVA, A., (2016), Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea), *International Journal of Parasitology*, 46: 171-185.

68. TKACH, V., V., PAWLOWSKI, J., MARIAUX, J., (2000), Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences, *International Journal for Parasitology*, 30: 83-93.
69. VAN DER LAND, J., BAILLY, N., (online), *Gymnocanthus tricuspis* (Reinhardt, 1830), (cit. 18. 3. 2019) World Register of Marine Organisms.
70. VAN DER LAND, J., BAILLY, N., (online), *Myoxocephalus scorpius* (Linnaeus, 1758), (cit. 18. 3. 2019), World Register of Marine Organisms.
71. VOLF, P., HORÁK, P. et al, (2007), *Paraziti a jejich biologie*, TRITON Praha, 393 pp.
72. WALKER, J., C., ANDERSON, D., T., (2001), *The Platyhelminthes*, Anderson, D.T. Invertebrate Zoology. Oxford University Press, 476 pp.
73. WEE, N., Q., X., CRIBB, T., H., BRAY, R., A., CUTMORE, S., C., (2017), Two known and one new species of *Proctoeces* from Australian teleosts: Variable host-specificity for closely related species identified through multi-locus molecular data, *Parasitology International*, 66: 16-26.
74. WESOŁOWSKA, W., WESOŁOWSKI, T., (2013), Do *Leucochloridium* sporocysts manipulate the behaviour of their snail hosts?, *Journal of Zoology*, 292: 151-155.

8. PŘÍLOHY

Tab. 7: Přehled sekvencí motolic čeledi Opecoelidae získaných z databáze Genbank a použitých na fylogenetické analýzy sekvencí ze Svalbardu.

druh	hostitel	lokalita	kód sekvence (GenBank)	literatura
<i>Bathypodocotyle margolisi</i>	<i>Coryphaenoides mediterraneus</i>	Velká Británie: Rockall Trough	KU320596	Bray et al. 2016
<i>Anomalotrema koiae</i>	<i>Eumicrotremus fedorovi</i>	severní Pacifik	MH161429	Sokolov et al. 2018
<i>Anomalotrema koiae</i>	<i>Sebastes viviparus</i>	Velká Británie: Shetlandy	KU320595	Bray et al. 2016
<i>Buticulotrema thermichthysi</i>	<i>Thermichthys hollisi</i>	Tichý oceán: JV Pacific Rise, hydrotermální vývěr Hobbs	KF733984	Bray et al. 2014
<i>Discoverytrema gibsoni</i>	<i>Muraenolepis marmorata</i>	Rossovo moře	MH161430	Sokolov et al. 2018
<i>Discoverytrema markowskii</i>	<i>Muraenolepis marmorata</i>	Rossovo moře	MH161431	Sokolov et al. 2018
<i>Halosaurotrema halosauropsi</i>	<i>Halosauropsis macrochir</i>	Velká Británie	AY222207	Olson et al. 2003
<i>Maculifer diodontis</i>	<i>Diodon hystrix</i>	Austrálie: Queensland, ostrov Heron	MH933879	Martin et al. 2018
<i>Macvicaria obovata</i>	<i>Cyclope neritea</i>	Španělsko: Laguna Els Alfacs	JQ694147	Born-Torrijos et al. 2012
<i>Neolebouria georgiensis</i>	<i>Trematomus pennellii</i>	Antarctida: Weddellovo moře, kanál Prince Gustava, ostrov Jamese Rosse	MH892478	Faltynkova et al. 2017
<i>Mesobathylebouria lanceolata</i>	<i>Polymixia lowei</i>	USA: podmořský svah, západní Florida	KJ001210	Andres et al. 2014
<i>Neoplagioporus zacconis</i>	<i>Opsariichthys platypus</i>	Japonsko	KX553949	Fayton et Andres 2016
<i>Opecoeloides fimbriatus</i>	<i>Micropogonias undulatus</i>	USA: Texaso-Louisianský útes	KJ001211	Andres et al. 2014
<i>Opecoeloides furcatus</i>	<i>Mullus surmuletus</i>	Korsika	AF151937	Tkach et al. 2000
<i>Plagioporus loboides</i>	<i>Fundulus nottii</i>	USA, Přírodní rezervace horního toku řeky Pascagoula, George County, Mississippi	EF523477	Curran et al. 2007
<i>Plagioporus shawi</i>	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	USA, řeka McKenzie, Oregon	KX553951	Fayton et Andres 2016
<i>Pleorchis uku</i>	<i>Aprion virescens</i>	Austrálie: Ještěří ostrov	DQ248216	Bray et al. 2005
<i>Podocotyle atomon</i>	<i>Littorina saxatilis</i>	Výzkumná a vzdělávací stanice 'Belomorskaja', Petrohradská univerzita, Bílé moře, Rusko	MH161437	Sokolov et al. 2018
<i>Abyssopedunculus brevis</i>	<i>Conger esculentus</i>	Mona Passage, Portoriko	KJ001212	Andres et al. 2014

<i>Polypipapiliotrema stenometra</i>	<i>Heniochus chrysostomus</i>	Francouzská Polynésie: Mo'orea	MF926406	Martin et al. 2017
<i>Pseudopecoeloides tenuis</i>	<i>Priacanthus hamrur</i>	Nová Kaledonie	KU320605	Bray et al. 2016
<i>Scorpidotrema longistipes</i>	<i>Scorpis georgiana</i>	Západní Austrálie, Point Peron	MK052936	Martin et al. 2018
<i>Tormopsolus orientalis</i>	<i>Seriola dumerli</i>	Scandola, Korsika	DQ248217	Bray et al. 2005
<i>Urorchis goro</i>	<i>Rhinogobius sp.</i>	Japonsko	KX553946	Fayton et Andres 2016
<i>Zalophotrema hepaticum</i>	<i>Zalophus californianus</i>	USA	AY222255	Olson et al. 2003

Tab. 8: Přehled sekvencí motolic čeledi Fellodistomidae získaných z databáze Genbank a použitých na fylogenetické analýzy sekvencí ze Svalbardu.

druh	hostitel	lokalita	kód sekvence (GenBank)	literatura
<i>Coomera brayi</i>	<i>Monodactylus argenteus</i>	Austrálie	KJ425462	Cribbet al. 2014
<i>Fellodistomum agnotum</i>	<i>Anarhichas lupus</i>	Velká Británie	AJ405289	Bray et al. 1999
<i>Fellodistomum fellis</i>	<i>Anarhichas lupus</i>	Velká Británie	AY222282	Olson et al. 2003
<i>Oceroma praecox</i>	<i>Scorpis lineolata</i>	Austrálie	KJ425464	Cribb et al. 2014
<i>Olssonium turneri</i>	<i>Alepocephalus agassizi</i>	Velká Británie	AY222283	Olson et al. 2003
<i>Proctoeces choerodoni</i>	<i>Choerodon cyanodus</i>	Austrálie	KX671299	Wee et al. 2016
<i>Proctoeces insolitus</i>	<i>Acanthopagrus australis</i>	Austrálie	KX671300	Wee et al. 2016
<i>Proctoeces major</i>	<i>Monodactylus argenteus</i>	Austrálie	KX671309	Wee et al. 2016
<i>Prosogonarium angelae</i>	<i>Euristhus lepturus</i>	Austrálie	AY222285	Olson et al. 2003
<i>Rhipidocotyle fennica</i>	<i>Anodonta anatina</i>	Ukrajina: řeka Smolka	KF184364	Stunženas et al. 2014
<i>Steringophorus blackeri</i>	<i>Xenodermichthys copei</i>	hloubka 960m	AJ405296	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus dorsolineatus</i>	<i>Bathypterois dubius</i>	hloubka 1541m	AJ405291	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus furciger</i>	<i>Limanda limanda</i>	hloubka 59m, VB	AJ405292	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus haedrichi</i>	<i>Spectrunculus grandis</i>	hloubka 2570m	AJ405293	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus margolisi</i>	<i>Spectrunculus grandis</i>	hloubka 1745-1760m	AJ405294	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus margolisi</i>	<i>Spectrunculus grandis</i>	Velká Británie	AY222281	Olson et al. 2003
<i>Steringophorus pritchardae</i>	<i>Alepocephalus rostratus</i>	hloubka 1625m	AJ405295	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus sp.</i>	<i>Cataetys laticeps</i>	hloubka 1645m	AJ405299	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus thulini</i>	<i>Coryphaenoides mediterranea</i>	hloubka 1745-1760m	AJ405297	Bray et al. 1999
<i>Steringophorus thulini</i>	<i>Coryphaenoides leptolepis</i>	hloubka 4100m	AJ405298	Bray et al. 1999
<i>Steringotrema robertpoulini</i>	<i>Peltorhamphus novaezeelandiae</i>	Nový Zéland	MG696894	Perez-Ponce de Leon et al. 2018
<i>Steringotrema robertpoulini</i>	<i>Peltorhamphus novaezeelandiae</i>	Nový Zéland	MG696893	Perez-Ponce de Leon et al. 2018
<i>Tandanicola bancrofti</i>	<i>Tandanus tandanus</i>	Austrálie	KJ425466	Cribb et al. 2014