

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



MAGISTERSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Molekulární fylogeneze vybraných druhů rybích
hlístic podřádu Spirurina na bázi SSU rRNA genů**

Eva Černotíková

Školitel: **RNDr. František Moravec, DrSc.**

Školitel specialista: **Prof. RNDr. Julius Lukeš, CSc.**

České Budějovice

2010

Magisterská práce

Černotíková E. (2010): Molekulární fylogeneze vybraných druhů rybích hlístic podřádu Spirurina na bázi SSU rRNA genů. [Molecular phylogeny of selected species of suborder Spirurina from fishes inferred from SSU rRNA gene sequences. MSc. Thesis, in Czech] – 48 pp. Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Nematodes contain species parasitic in freshwater, brackish-water and marine fishes. Some of them are highly pathogenic and are known to be agents of serious disease of fish with economic importance. The present classification based on morphology and life-cycles is unsatisfactory and it is necessary to incorporate the new molecular phylogenies into a classification system of nematodes. This work is aimed to assess phylogenetic relationships inferred from SSU rRNA gene sequences within “clade III“ (suborder Spirurina *sensu* De Ley and Blaxter (2002)), especially among representatives of spirurid nematodes parasitizing fishes.

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

Prohlašuji, že v souladu s paragrafem 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetové stránce.

České Budějovice, 30. dubna 2010

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Františku Moravcovi za jeho vstřícnost a ochotu, za odborné rady a čas, který mi věnoval, ale i za optimismus a motivovací ve chvílích, kdy to nevypadalo vůbec růžově. Můj velký dík patří také Honzovi (Brabčákovi) za pomoc s fylogenetickými analýzami a cenné rady z oblasti molekulární taxonomie. Děkuji Tomáši Scholzovi a Julovi Lukešovi za pomoc s finálními úpravami této práce. Můj dík směřuje také k Mírovi Oborníkovi za to, že mi umožnil pracovat ve své laboratoři a všem lidem z této laborokry za vytvoření přátelské atmosféry, zasvěcení do tajů molekulární biologie a pomoc kdykoli s čímkoli. Děkuji též všem těm, kteří mi poskytli vzorky hlístic nebo mi pomohli s jejich sběrem. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině, která mi umožnila studovat a psychicky mě podporovala a příteli Jakubovi, který mi byl velkou oporou.

OBSAH

1. ÚVOD	
1.1. Základní charakteristika kmene Nematoda	1
1.2. Taxonomie hlístic (Nematoda)	3
1.3. Klasifikace spiruridních hlístic	6
1.4. Charakteristika řádu Spirurida Chitwood, 1933	8
1.4.1. Podřád Camallanina Chitwood, 1937	9
1.4.2. Podřád Spirurina Chitwood, 1937	10
2. CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODIKA	13
3.1. Materiál	13
3.2. Metodika	16
3.2.1. Izolace DNA	16
3.2.2. PCR amplifikace	17
3.2.3. Klonování amplifikovaných PCR produktů	18
3.2.4. Restrikční analýza	19
3.2.5. Sekvenování	19
3.2.6. Analýza sekvencí	20
3.2.7. Fylogenetické analýzy	23
4. VÝSLEDKY	25
4.1. Sekvenční analýza	25
4.2. Fylogenetická analýza	26
5. DISKUSE	34
6. ZÁVĚRY	40
7. CITOVANÁ LITERATURA	42

1. ÚVOD

1.1. Základní charakteristika kmene Nematoda

Hlístice (Nematoda) tvoří starobylou a velmi rozmanitou skupinu organismů, jejíž zástupci jsou z hlediska biomasy kvantitativně nejpočetnějšími ze všech metazoi (Platt 1994). Tato skupina využívá téměř všechny ekologické niky a je rozšířena po celém světě. Zajímavé je, že někteří zástupci jsou přizpůsobeni dokonce k životu v extrémních podmínkách, např. na dně nejhlubších oceánů nebo v ledových pouštích Antarktidy (Platonova a Gal'tsova 1976, Blaxter 2003). Tento kmen zahrnuje volně žijící terestrické a mořské mikrobivory, predátory meiofauny, býložravce a parazity rostlin a živočichů včetně člověka (Mitrev a kol. 2005). Dosud bylo popsáno přibližně 25 tisíc druhů, z nichž velkou část tvoří paraziti (De Ley a Blaxter 2002, de Meeus a Renaud 2002), přičemž celkový počet druhů je odhadován na 40 tisíc až 100 milionů (Lamshead 1993, Dorris a kol. 1999), nicméně poslední údaj může být nadhodnocený (Lamshead a kol. 2003).

Hlístice mají nesegmentované tělo protáhlého až niťovitého tvaru. Dutinou tělní je pseudocoel. Vyskytují se zde mikroskopické organismy (*Lucionema balantonense*) ale i několikametroví obři (*Placentonema* parazitující u velryb). Tělní stěna se skládá z nebuněčné kutikuly, buněčné epidermis a podélné somatické svaloviny (Lee 2002). Kutikula tvoří multifunkční exoskelet, jenž zajišťuje ochranu proti vnějšímu prostředí, hostitelské imunitě, plní opornou funkci, podílí se na osmoregulaci a metabolismu a umožňuje pohyb spolu se svaly, které jsou k ní pevně připojeny. Epidermis vylučuje vně kutikulu, která je během ontogeneze čtyřikrát svlékána.

Zástupci této skupiny jsou až na výjimky gonochoristi s velmi rozmanitými přímými, nepřímými i alternativními vývojovými cykly. Ontogeneze zahrnuje vznik vajíčka (ve kterém se mohou vyvíjet až 2 larvy), 4 larvální stádia a dospělce. Infekčním stádiem pro hostitele je obvykle larva třetího stádia. Mezihostiteli jsou obvykle bezobratlí (např. měkkýši, kroužkovci, korýši nebo hmyz). Při přenosu jsou mnohdy využíváni i fakultativní hostitelé, např. parateničtí nebo postcykličtí hostitelé (Anderson 2000). Samice jsou oviparní nebo ovoviviparní a zpravidla mnohem větší než samci. Samci bývají vybaveni přídatnými, často nápadnými kopulačními orgány, jako jsou spikuly nebo gubernakulum (Hyman 1951).

K charakteristickým znakům těchto helmintů patří většinou dobře vyvinutá trubicovitá trávicí soustava, která je rozdělena na 3 hlavní části (Bird a Bird 1991): stomodeum zahrnující ústa, pysky, dutinu ústní a hltan (v helmintologické literatuře vztahující se k hlísticím

cizopasícím u obratlovců je hltan obecně uváděn jako jícen, což je dáno historicky), mesenteron (střevo) a proctodeum, jehož součástí je samičí rektum a samčí kloaka. Přední a zadní úsek trávicí trubice je vystlán kutikulou. Ústní část bývá u většiny zástupců orientována terminálně a často dochází k její modifikaci a vzniku různých přídatných struktur, jako jsou pysky, papily, stylety, trny či zuby, které usnadňují přijímání potravy. Jícen (hltan) obsahuje tři jícnové žlázy, přičemž někdy bývá zřetelně rozdělen na přední svalnatou a zadní žlaznatou část. Podle stavby se dělí na dorylamoidní, rhabditoidní nebo oxyuroidní. Stomodeum hraje již tradičně hlavní roli v určování jednotlivých druhů i klasifikaci vyšších taxonomických jednotek (Munn a Munn 2002).

Parazitické druhy hlístic jsou medicínsky, veterinárně a hospodářsky významné. Působí vážná onemocnění člověka postihující stamilióny lidí. Například škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) napadá přibližně 1,47 miliard lidí (Lukeš a kol. 2005), z nichž ročně umírá 100 tisíc. Měchovci *Necator americanus* a *Ancylostoma duodenale* infikují 1,3 miliardy lidí ročně (Lukeš a kol. 2005) a způsobují ankylostomózu projevující se anémií a poruchami metabolismu. Lymfatické a kožní filárie (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* a *Onchocerca volvulus*) infikují dohromady přes 130 milionů lidí (Lukeš a kol. 2005), u nichž působí závažné oční a lymfatické poruchy (Chan a kol. 1994, Bundy 1997, Crompton 1999, Blaxter a kol. 2000). Cizopasnici hospodářských zvířat způsobují ve velkém množství často značné ekonomické ztráty, a to zejména u ovcí, koz, skotu, prasat a ryb. Vážně postiženi bývají i psi a koně (Prichard 1994, Blaxter a kol. 2000).

Volně žijící hlístice *Caenorhabditis elegans* je považována za nejlépe prostudovaný laboratorní modelový organismus náležící ke kmeni Nematoda (Blaxter 1998, Dieterich a Sommer 2009). Genom tohoto háďátka byl kompletně osekvenován jako první ze všech metazoí (Consortium 1998, 1999). Výzkum na této hlístici přinesl týmům vědeckých pracovníků již tři Nobelovy ceny v oblasti fyziologie a medicíny (2002, 2006) a chemie (2008). Od té doby byla dokončena řada dalších důležitých studií založených na sekvenování genomu u hlístic, jež zahrnují volně žijící druh *Caenorhabditis briggsae* (Stein a kol. 2003), lidského parazita *Brugia malayi* (Ghedini a kol. 2007), rostlinné parazity *Meloidogyne incognita* (Abad a kol. 2008), *Meloidogyne hapla* (Opperman a kol. 2008) a na brouky vázaného *Pristionchus pacificus* (Dieterich a Sommer 2009).

1.2. Taxonomie hlístic (Nematoda)

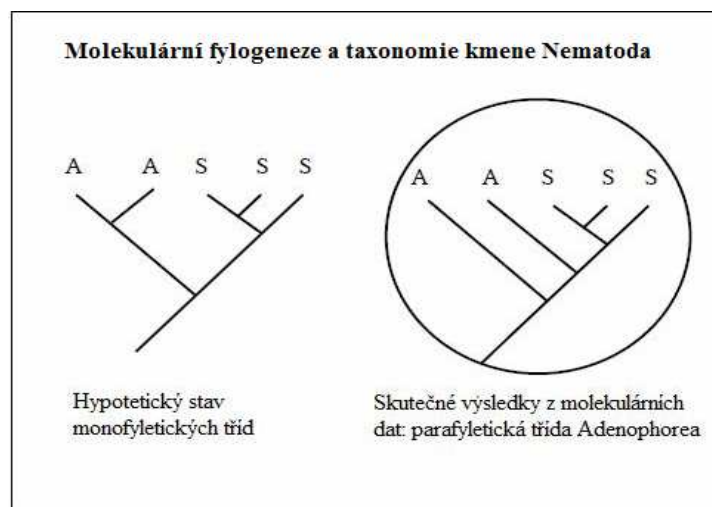
Umístění nematodů v zoologickém systému je nejasné a příbuznost s ostatními skupinami je neustále předmětem diskuse. Rudolphi v roce 1808 ve svém systému helmintů považoval hlístice za řád, který pojmenoval Nematodea. Později byl taxon Nematoda většinou považován za třídu podkmene Aschelminthes (spolu s třídami Rotifera, Gastrotricha, Kinorhyncha, Priapulida, Nematomorpha) kmene Vermes (Hyman 1951). Potts (1932) jej však povýšil na samostatný kmen. V současné době většina nematodologů považuje hlístice za kmen. Nyní jsou Nematoda na základě molekulárních dat řazena do skupiny Ecdysozoa Aguinaldo a kol., 1997, jejíž příslušníky charakterizuje chitinová kutikula, která je během života nejméně jednou svlékána. Tato skupina zahrnuje také další kmene: Nematomorpha, Tardigrada, Priapulida, Loricifera, Kinorhyncha, Onychophora a Arthropoda. Morfologické vlastnosti a molekulární fylogenetika nedávno potvrdily příbuznost hlístic se strunovci (Nematomorpha), s nimiž dohromady tvoří skupinu Nematoida. Sesterským taxonem skupiny Nematoida je Scalidophora, jež zahrnuje skupiny Loricifera, Priapulida a Kinorhyncha. Na bázi skupiny Ecdysozoa se vyskytuje skupina Panarthropoda, která obsahuje Tardigrada, Onychophora a Arthropoda (Aguinaldo a kol. 1997, Dunn a kol. 2008).

Systém hlístic je velmi komplikovaný a není jisté, zda odpovídá přirozeným vztahům jednotlivých skupin, na čemž má svůj podíl i absence fosilních vzorků (Conway Morris 1981, 1993). Tradiční klasifikace kmene Nematoda je založená na morfologických znacích a biologických vlastnostech. Nejběžněji používané morfologické znaky jsou ústní a faryngeální struktury, ale i další morfologické charakteristiky jako stavba kutikuly, pysků, střeva, reprodukčního systému, smyslových orgánů a zadní části těla (Dorris a kol. 1999). Před příchodem molekulární fylogenetiky byly systematické studie tohoto kmene velmi limitovány: (i) velkým počtem druhů a morfologickou diverzitou, (ii) omezením světelné mikroskopie zkoumající morfologii hlístic, (iii) nevyhnutelnou specializací systematiků (Blaxter 2003).

Většinou byly hlístice rozdělovány do dvou skupin Adenophorea a Secernentea, a to podle absence nebo přítomnosti fasmidů (senzorické žlázy vyúsťující na povrch u zadního konce těla). Toto členění se udrželo v mnoha dřívějších klasifikacích (Chitwood a Chitwood 1933, Chitwood 1937) a často i v současné době (např. Gibbons 2010). Maggenti (1963) a De Conick (1965) naznačili nejednotnost třídy Adenophorea a následně Andrassy (1976) tuto skupinu rozdělil do dvou taxonů, Torquentia a Penetrantia. První taxonomický systém založený na kladistických principech byl představen Lorenzenem (1981). Jeho analýza

podpořila parafylii třídy Adenophorea, ale zároveň poukázala na nedostatek informativních morfologických vlastností, jež by tento výsledek učinily hodnověrným.

Až molekulárně fylogenetické analýzy definitivně potvrdily parafylii třídy Adenophorea (Blaxter a kol. 1998). Secernentea se podle molekulárních dat vyvinula ze skupiny Adenophorea a dle některých analytických kritérií vykazuje monofylii (Blaxter a kol. 2000). Adenophorea zahrnuje řadu mořských, sladkovodních a půdních hlístic, ale relativně málo parazitů zvířat a rostlin, zatímco zástupci Secernentea většinou obývají suchozemské prostředí a obsahují parazitické a volně žijící druhy (Blaxter 2003). Obr. 1 zobrazuje historický versus současný názor na monofylii skupin Adenophorea a Secernentea.

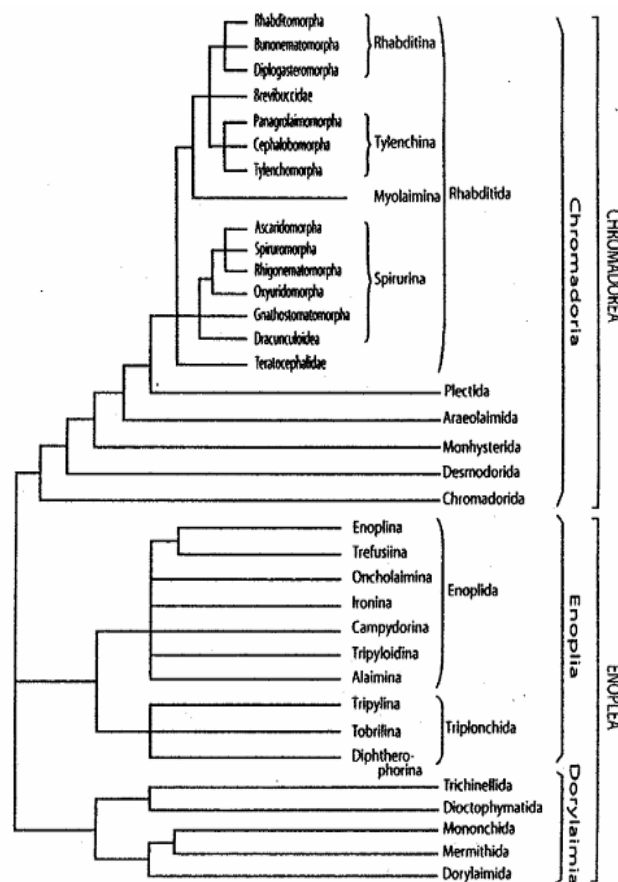


Obr. 1. Historický názor na monofylii tříd Adenophorea a Secernentea versus současné výsledky podpořené molekulárními daty: parafylie třídy Adenophorea, jež dává vznik monofyletické třídě Secernentea.

Hlístice byly na základě molekulárních analýz genu pro malou ribozomální podjednotku nejprve rozděleny do pěti větví: označených jako “clade” I-V (Blaxter a kol. 1998), které byly následně pojmenovány: I – Dorylaimia, II – Enoplia a C + S (Chromadorida + Secernentea) – Chromadoria obsahující skupiny III, IV a V (De Ley a Blaxter 2002, Blaxter 2003, Mitreva a kol. 2005). “Clade” I a II byly později sloučeny do jedné skupiny z důvodu nejasné divergence. V současné době jsou hlístice řazeny do dvou skupin: Chromadorea a Enoplea (De Ley a Blaxter 2004, Meldal a kol. 2007) (viz Obr. 2). Obě skupiny jsou biologicky rozmanité a zahrnují mořské a terestrické formy a v obou se vyskytují parazitické taxony (Blaxter 2003). Anderson (1984) naznačuje několikanásobný, navzájem nezávislý vznik rostlinného i zvířecího parazitismu a molekulární analýzy tuto myšlenku potvrzují. Blaxter a kol. (2000) tvrdí, že nezávislý vznik zvířecího parazitismu proběhl nejméně šestkrát.

Skupina Enoplea zahrnuje dva taxony: Dorylaimia a Enoplia. Uvnitř taxonu Dorylaimia jsou umístěny skupiny Dorylaimida (volně žijící mikrobivoři a rostlinní paraziti), Mermithida (paraziti hmyzu), Mononchida (volně žijící predátoři), Diectophymatida (paraziti obratlovců) a Trichinellida (paraziti všech hlavních živočišných taxonů). Taxon Enoplia neobsahuje žádné známé zvířecí parazity, nicméně dosud velmi nízký počet zástupců popsaných z mořských bezobratlých nevyklučuje, že i zde mohou být cizopasně taxony (Blaxter 2003, De Ley a Blaxter 2004, Meldal a kol. 2007).

Skupina Chromadorea/Chromadoria zahrnuje velmi rozmanité volně žijící a terestrické formy, ale i mnoho parazitických skupin původní třídy Secernentea. Součástí této větve je skupina Rhabditida, dělí se na skupinu Spirurina s parazity zvířat včetně askaridních, spiruridních a oxyuridních parazitů obratlovců a oxyuridních a rhigonematidních parazitů členovců. Uvnitř skupiny Tylenchina se nalézají zástupci živící se rostlinami a houbami, paraziti obratlovců i volně žijící hlístice. Na brouky vázaná velká skupina nematodů tvoří skupinu Rhabditina (Blaxter 2003, De Ley a Blaxter 2004).



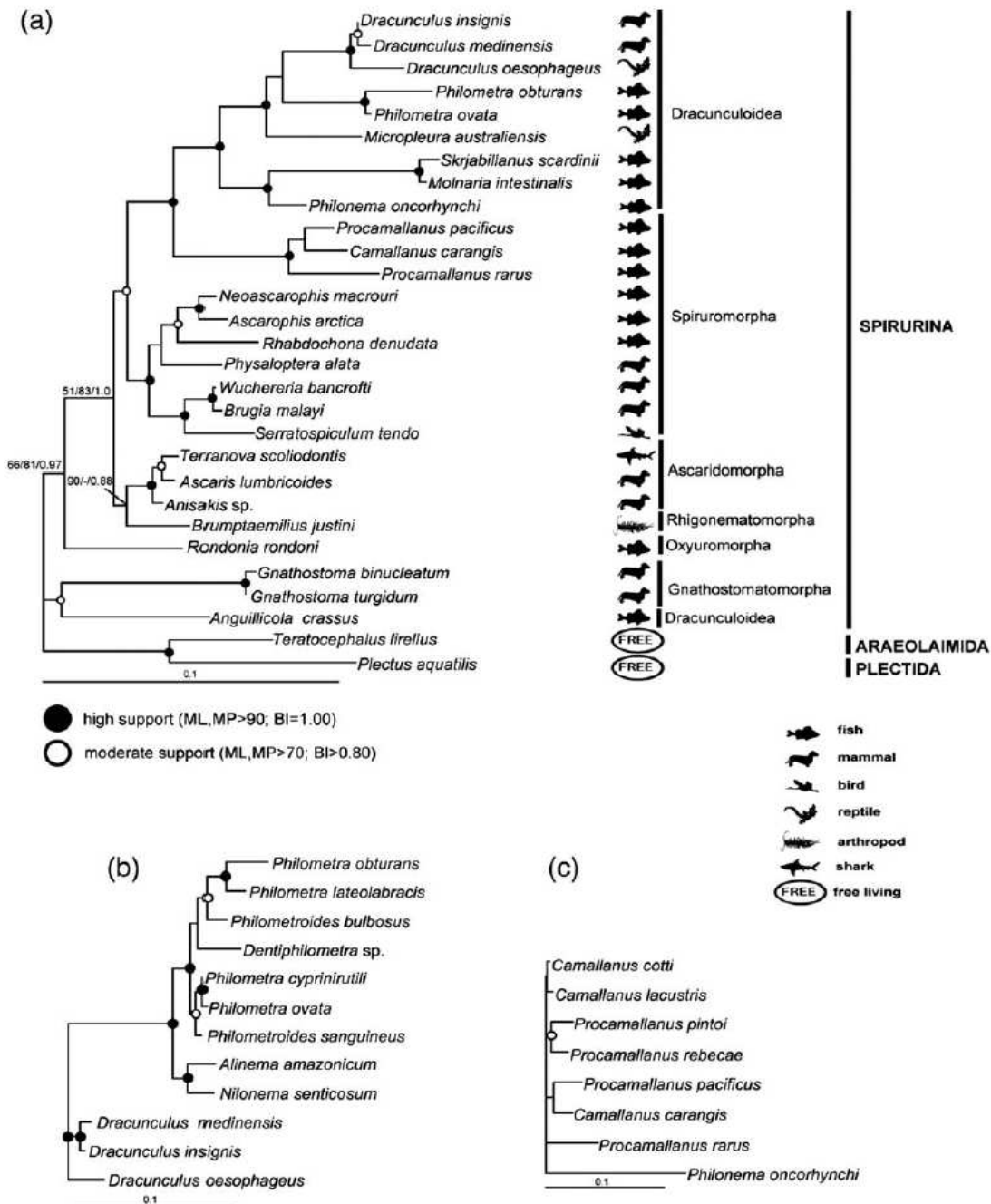
Obr. 2. Klasifikace kmene Nematoda založená na molekulární analýze jaderného genu pro malou ribozomální podjednotku. Strom byl získán sumarizováním výsledků z MP a NJ analýz (podle De Ley a Blaxtera 2004).

1.3. Klasifikace spiruridních hlístic

Řád Spirurida byl ustanoven v roce 1933 Chitwoodem a v jeho systému byl součástí podtřídy Secernentea a třídy Nematoda. Podle Chabauda (1974) se tento řád dělí na dva podřády: Camallanina a Spirurina. Podřád Camallanina obsahuje nadčeledi Camallanoidea a Dracunculoidea, zatímco podřád Spirurina zahrnuje deset nadčeledí (Acuarioidea, Aproctoidea, Diplostriaenoidea, Filarioidea, Gnathostomatoidea, Habronematoidea, Physalopteroidea, Rictularioidea, Spiruroidea a Thelazioidea) (Chabaud 1974). Prakticky všechny klasifikační systémy byly založeny výhradně na morfologii a vývojových cyklech spiruridních hlístic (Chitwood 1933, 1950, Yamaguti 1961, Ivaškin a kol. 1971, Chabaud 1974, 1975) a často se navzájem dosti lišily. V současné taxonomii, vycházející z morfologie a biologie, zahrnuje řád Spirurida 25 (Anderson 2000) nebo 28 (Moravec a kol. 1998) čeledí.

Koncem devadesátých let minulého století se objevily první rozsáhlé molekulárně-fylogenetické analýzy (Blaxter a kol. 1998), které spiruridní hlístice umístily do samostatné větve, označované jako “clade III” (Blaxter a kol. 1998, Nadler a kol. 2007) a později nazvané podřád Spirurina (De Ley a Blaxter 2002), jež zahrnuje skupiny Ascaridomorpha, Gnathostomatomorpha, Oxyuridomorpha, Rhigonematomorpha, Spiruromorpha a Dracunculoidea jako *incertae sedis*. Tyto skupiny většinou odpovídají morfologicky ustanoveným řádům Ascaridida (Ascaridomorpha), Oxyurida (Oxyuromorpha), Rhigonematida (Rhigonematomorpha) a Spirurida (Gnathostomatomorpha, Spiruromorpha, Dracunculoidea). Podle De Ley a Blaxtera (2002, 2004) Spirurina zahrnuje 21 nadčeledí, z nichž 9 parazituje u ryb (Moravec 2007). Další studie ale naznačují, že uspořádání této skupiny se bude s přibývajícimi molekulárními daty dále měnit (Wijová a kol. 2006, Nadler a kol. 2007).

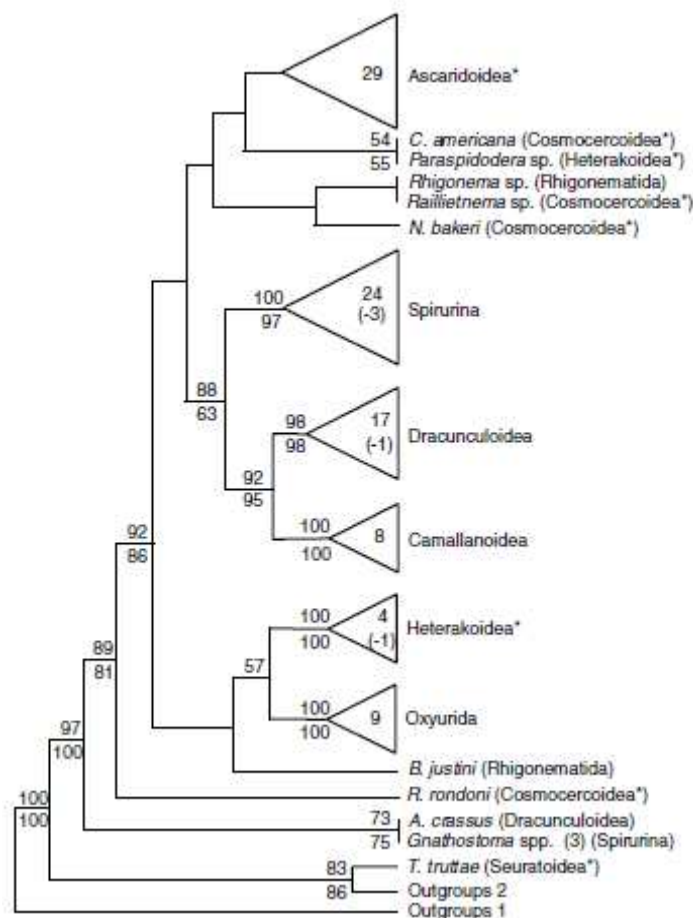
Wijová se ve své bakalářské a následné magisterské práci zaměřila nejprve na drakunkuloidní hlístice a jako první získala sekvenci malé ribozomální podjednotky významného lidského parazita *Dracunculus medinensis* a umístila jej do systému nematodů. K dalšímu neméně důležitému výsledku patří odhalení parafylie nadčeledi Dracunculoidea a následné vyčlenění nadčeledi Anguilliculoidea, která tvoří sesterskou skupinu k čeledi Gnathostomatidae (skupina Gnathostomatomorpha) na bázi podřádu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002) (viz Obr. 3) (Wijová 2004, 2006, Wijová a kol. 2005, 2006, Moravec 2006).



Obr. 3. Fylogeneze podřádu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002) (a) a čeledí Philometridae (b) a Camallanidae (c) založené na analýze SSU rRNA sekvencí metodami maximum likelihood, maximum parsimony a Bayesovskou inferencí (Wijová a kol. 2006).

Nejnovější molekulární studie zahrnující velký počet druhů odhalily parafylii mnoha skupin uvnitř podřádu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002) a dokonce i parafylii samotného “clade III” (viz Obr. 4) (Nadler a kol. 2007). Nejedná se ale o překvapivý vývoj a Wijová a kol. (2006) i Nadler a kol. (2007) dodávají, že pro vyřešení vztahů uvnitř této

skupiny je třeba dále rozšiřovat počet zástupců, stejně jako sekvenovat další geny pro získání statisticky lépe podpořených závěrů.



Obr. 4. Taxonomie “clade III” (podřád Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002)). Striktní konsensus 167 nejlepších stromů odvozený z metody maximální parsimonie (PAUP TBR branch swapping). Čísla v trojúhelnících označují počty druhů taxonu reprezentujících danou větev. Číslo v závorkách vyjadřuje počet druhů, které nejsou v této větvi. Hvězdičky uvádějí taxony představující Ascaridida (podle Nadlera a kol. 2007).

1. 4. Charakteristika řádu Spirurida Chitwood, 1933

Chabaud (1974) stejně jako Anderson (2000) rozdělují spiruridní hlístice do dvou podřádů: Camallanina a Spirurina. Mezi typické morfologické vlastnosti této skupiny patří bilaterální symetrie přední části těla. Hlavový konec je často opatřen dvěma laterálními pysky (pseudolabia), jež mohou být někdy redukovány nebo mohou úplně chybět. Kaudální papily u samců nalezneme vždy ve ventrální nebo ventrolaterální pozici. Jícen (oesophagus) je rozdělen do dvou částí: přední svalnatá část bývá kratší než zadní žlaznatá, nicméně toto dělení nemusí být často zřetelné. Preanální přísavka není vyvinuta. Samci nesou obvykle dvě spikuly nestejně délky, ale tyto mohou rovněž chybět (Chabaud 1974, Moravec 1994, 2004a).

Dospělci cizopasí v zažívacím traktu nebo tkáních a tělních dutinách obratlovců (Moravec 1994, 2004a). Ontogenetický vývoj u této skupiny zahrnuje mezihostitele a často také paratenické hostitele. Samice většiny spiruridních hlístic produkují vajíčka obsahující plně vyvinutou larvu prvního stádia, která se vyvíjí do třetího infekčního stádia ve tkáních mezihostitele, jímž bývá obvykle členovec. Ve vodním prostředí jsou mezihostiteli korýši a larvy hmyzu. Přenos v terestrickém prostředí zajišťuje suchozemský hmyz a korýši (Anderson 2000). Vývojové cykly rybích druhů jsou známy jen u malého počtu zástupců a dostupná data se týkají druhů parazitujících ve sladkovodních rybách. Téměř nic není známo o vývoji těchto parazitů a o druzích cizopasících v Jižní Americe, Africe, jižní Asii, Austrálii a v mořských rybách (Moravec 2007).

1.4.1. Podřád Camallanina Chitwood, 1937

Zástupci tohoto podřádu tvoří podle Moravce (2006) tři nadčeledi: Anguillicoloidea, Camallanoidea a Dracunculoidea. Nadčeď Anguillicoloidea s jedinou čeledí Anguillicolidae představuje malou skupinu druhů cizopasících v plovacím měchýři úhořů rodu *Anguilla*. Nadčeď Camallanoidea obsahuje jedinou čeď Camallanidae na rozdíl od nadčeledi Dracunculoidea, která zahrnuje osm čeledí, z nichž s výjimkou Dracunculidae všechny zahrnují výhradně parazity ryb: Daniconematidae, Guyanemidae, Lucionematidae, Micropleuridae, Philometridae, Skrjabillanidae a Tetanonematidae.

Hlavními morfologickými znaky jsou většinou jednojaderné jícnové žlázy (kromě rodu *Philonema* a několika dalších rodů) (Moravec 2004b, 2006). Jícen se dělí na svalnatou a žlznatou část nebo bývá svalnatý po celé délce. Pseudolabia chybějí. Larvy nemají cefalické háčky, kaudální část těla je zpravidla dlouhá a zašpičatělá, obvykle s výraznými fasmidy obsahujícími široké dutiny a nápadné otvory (Chabaud 1974, Moravec 2004a). Samice drakunkuloidních hlístic mohou dorůstat délky mnoha desítek centimetrů a tím se velmi liší od samců, jejichž velikost se obvykle pohybuje jen kolem několika milimetrů.

Jde o parazity střeva studenokrevných obratlovců a různých orgánů všech tříd obratlovců (Chabaud 1974). Zástupci nadčeledi Camallanoidea cizopasí ve střevě, zatímco druhy nadčeledi Dracunculoidea nalezneme hlavně v hlubších tkáních a dutinách jejich hostitelů (Anderson 2000). Mezihostiteli jsou většinou klanonožci (Copepoda), zřídka kapřivci (Branchiura) nebo lasturnatky (Ostracoda) (Moravec 2004b).

Některé druhy drakunkuloidních hlístic patří k významným patogenům člověka (známý *Dracunculus medinensis*), hospodářských zvířat a lovné zvěře (zástupci rodů *Avioserpens* a *Dracunculus*), ale i sladkovodních, brakických a mořských ryb. Jsou známi jako původci vážných onemocnění ryb s ekonomickým významem, kde mohou působit masový úhyn u volně žijících i uměle chovaných ryb (například angvilikolóza úhořů, filometroidóza kaprů, filonemóza lososů). Častá destrukce gonád způsobená zástupci rodu *Philometra* u mořských okounovitých ryb může značně snížit reprodukci těchto ryb nebo dokonce způsobit jejich plnou parazitickou kastraci (Ramachandran 1975, Sakaguchi a kol. 1987, Moravec a kol. 2003, Moravec 2004b).

1.4.2. Podřád Spirurina Chitwood, 1937

Podřád Spirurina zahrnuje deset nadčeledí, z nichž zástupci čtyř (Gnathostomatoidea, Habronematoidea, Physalopteroidea a Thelazioidea) parazitují u ryb žijících ve sladkých, brakických a mořských vodách, zatímco šest zbývajících nadčeledí reprezentují paraziti obojživelníků, plazů, ptáků a savců včetně člověka. Zmínění rybí cizopasnici náleží do čtyř čeledí: Gnathostomatidae (Gnathostomatoidea), Physalopteridae (Physalopteroidea), Cystidicolidae (Habronematoidea) a Rhabdochonidae (Thelazioidea) (Moravec 2007).

K základním morfologickým vlastnostem této skupiny patří přítomnost vícejaderných jícnových žláz. Jícen je rozdělen na přední svalnatou část a delší zadní žlaznatou část, toto dělení však může být u některých zástupců nezřetelné. Larvy prvního stádia charakterizují cefalické háčky a trny a nevýrazné pórovité fasmidy (Chabaud 1974, Moravec 2004a, 2007). Hlavový konec dospělců bývá opatřen malými pseudolabii, která mohou být někdy redukována. Samci mají dvě spikuly. Oviparní samice uvolňují zralá vajíčka, která u většiny druhů obsahují plně vyvinutou larvu prvního stádia, jež se ve vnějším prostředí spontánně nelíhne. Vajíčka některých zástupců spirurinních hlístic bývají vybavena polárními filamenty nebo polárními či ekvatoriálními zduženinami (tzv. plováky). Sexuální dimorfismus není příliš výrazný a velikost gravidních samic se pohybuje od jednoho do několika centimetrů (Moravec 2007).

Vývojové cykly spirurinních hlístic se vyznačují velkou rozmanitostí. Mezihostiteli jsou bezobratlí (u nadčeledi Gnathostomatoidea klanonožci – Copepoda) (Chabaud 1974, Moravec 2007). Ontogenetický vývoj rybích parazitů zahrnuje korýše a vodní hmyz jako mezihostitele (Anderson 2000). Dochází zde často k předčasnému vývoji nebo dokonce dospívání v mezihostiteli či paratenickému nebo postcyklickému parazitismu (Moravec 1994).

Zástupci tohoto podřádu parazitují ve střevě a tkáních všech tříd obratlovců (Anderson 2000). Rybí paraziti se někdy vyskytují u svých hostitelů ve velkých počtech, negativně ovlivňují jejich zdravotní stav a snižují jejich obranyschopnost proti sekundárním infekcím. Mezi významné patogeny ryb patří například *Cystidicola farionis* Fischer, 1798, parazit plovacího měchýře lososovitých ryb, nebo *Spinitectus inermis* (Zeder, 1800) a *S. carolini* Holl, 1928, cizopasníci zažívacího traktu evropských úhořů a severoamerických ryb (Kinkelin a kol. 1973, Bauer a kol. 1977, Moravec 2007).

2. CÍLE PRÁCE

1. U zástupců hlístic (Nematoda) podřádu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002) se zaměřením na zástupce čeledí Rhabdochonidae, Cystidicolidae a Philometridae cizopasících u ryb získat sekvence jaderného genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA).
2. Získané sekvence použít ke konstrukci fylogenetických stromů.
3. Posoudit fylogenetické vztahy jednotlivých čeledí v rámci této skupiny hlístic a porovnat je se současnou klasifikací založenou na morfologii, včetně posouzení současného složení jednotlivých rodů.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Materiál

Hlístice použité k analýze byly získány z ryb (vyjma dvou vzorků pocházejících z želvy a z jepičích nymf) během výzkumných cest školitele a od jeho zahraničních spolupracovníků, ale i dalších zaměstnanců Parazitologického ústavu BC AV ČR. Přehled zpracovaného materiálu je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1. Materiál použitý k izolaci DNA

(druhy, u nichž se podařilo získat sekvence jsou zvýrazněny tučně)

Druh/Čeled'/ Lokalizace/Hostitel (pokud není jinak uvedeno, jde o sladkovodní nebo mořské ryby)/Lokalita
ANISAKIDAE
<i>Goezia spinulosa</i> (Diesing, 1839) žaludek <i>Arapaima gigas</i> , Mexiana, Amazonia, Brazílie, 2008, F. Moravec
CAMALLANIDAE
<i>Camallanus hypophthalmichthys</i> Dogel et Akhmerov, 1959 střevo <i>Aristichthys nobilis</i> , Liangzi Lake, Čína, 2005, S. Wu
<i>Camallanus tridentatus</i> (Drasche, 1884) střevo <i>Arapaima gigas</i> , Mexiana, Amazonia, Brazílie, 2008, F. Moravec
<i>Procamallanus (Procamallanus) fulvidraconis</i> Li, 1935 žaludek <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> , Liangzi Lake, Čína, 2005, S. Wu
<i>Procamallanus (Procamallanus) laeviconchus</i> (Wedl, 1862) žaludek <i>Synodontis schall</i> , Sudan, 2006, T. Scholz
<i>Procamallanus (Procamallanus) sigani</i> Moravec et Justine, 2010 střevo <i>Siganus lineatus</i> , Nová Kaledonie, 2006, J.-L. Justine
<i>Procamallanus (Spirocamallanus) lethrini</i> Moravec et Justine, 2010 střevo <i>Lethrinus genivittatus</i> , Nová Kaledonie, 2006, J.-L. Justine
<i>Procamallanus (Spirocamallanus) rarus</i> (Travassos, Artigas et Pereira, 1928) střevo <i>Calophysus macropterus</i> , Peru, 2005, T. Scholz + R. Kuchta
CUCULLANIDAE
<i>Cucullanus baylisi</i> Campana-Rouget, 1961 střevo <i>Synodontis</i> sp., Sudan, 2006, T. Scholz
CYSTIDICOLIDAE
<i>Ascarophis (Ascarophis) longiovata</i> Moravec et Klimpel, 2008 žaludek <i>Coryphenoides mediterraneus</i> , Atlantický oceán (Middle Ridge), 2004, S. Klimpel
<i>Ascarophis (Dentiascarophis) adioryx</i> Machida, 1981 žaludek <i>Sargocentron spiniferum</i> , Nová Kaledonie, 2007, J.-L. Justine
<i>Comephoronema macrochiri</i> Moravec et Klimpel, 2007 žaludek <i>Halosauropsis macrochir</i> , Atlantický oceán (Middle Ridge), 2005, S. Klimpel
<i>Cystidicola farionis</i> Fischer, 1798

plovací měchýř *Salmo trutta fario* × *Salmo marmorata*, řeka Adige, Itálie, 2006, A. Gustinelli

Metabronema magnum (Taylor 1925)

plovací měchýř *Gnathonodon speciosus*, Nová Kaledonie, 2006, J.-L. Justine

Neoscarophis longispicula Moravec et Klimpel, 2008

žaludek *Coryphenoides mediterraneus*, Atlantický oceán (Middle Ridge), 2004, S. Klimpel

Salmonema ephemeridarum (Linstow, 1872) larvy

dutina tělní jepičích nymf *Ephemera danica*, potok ve Velkém Březnu (severní Čechy), ČR, 2008, E. Černotíková

Spinitectus oviflagellis Fourment, 1884

pylorické přívěsky *Macrourus berglax*, Irmingerské moře, Grónsko, 2002, S. Klimpel

Spinitectus tabascoensis Moravec, García-Magaña et Salgado-Maldonado, 2002

střevo *Ictalurus furcatus*, Río Lacantún, Chiapas, Mexiko, 2007, F. Moravec

DANICONEMATIDAE

Mexiconema africanum Moravec et Jirků, 2009

dutina tělní *Auchenoglanis occidentalis*, jezero Turkana, Keňa, 2009, M. Jirků

DRACUNCULIDAE

Dracunculus globocephalus Mackin, 1927

dutina tělní želvy *Chelydra serpentina*, Westhampton Lake, Richmond, Virginia, USA, 1980, T. Platt

GNATHOSTOMATIDAE

Echinocephalus overstreeti Deardorff et Ko, 1983

střevo *Taeniura meyeni*, Nová Kaledonie, 2003, J.-L. Justine

Echinocephalus sinensis Ko, 1975

střevo *Aetobatus* cf. *narinari*, Nová Kaledonie, 2003, J.-L. Justine

GUYANEMIDAE

Guyanema longispiculum Moravec, Prouza et Royero, 1996

dutina tělní sladkovodní ryby *Loricariichthys brunneus*, řeka Mercedes, Venezuela, 1992, A. Prouza

Ichthyofilaria argentinensis Incorvaia, 1999

plovací měchýř *Merluccius hubbsi*, Argentina, 2001, J. Timi

LUCIONEMATIDAE

Lucionema balatonense Moravec, Molnár et Székely, 1998

plovací měchýř *Sander lucioperca*, Balaton, Maďarsko, 2008, C. Székely

PHILOMETRIDAE

Afrophilometra hydrocyoni (Fahmy, Mandour et El-Nafar, 1976)

ploutve *Hydrocynus forskahlii*, jezero Turkana, Keňa, 2009, M. Jirků

Buckleyella buckleyi Rasheed, 1963

mezenterium *Scomberoides tala*, pobřeží Pákistánu (Karachi) (Arabské moře), 1963, S. Rasheed

Carangiema americanum Moravec, Montoya-Mendoza et Salgado-Maldonado, 2008

podkožní tkáň mořské ryby *Caranx hippos*, Gulf of Mexico (Veracruz), 2005, J. Montoya-Mendoza

Carangiema americanum Moravec, Montoya-Mendoza et Salgado-Maldonado, 2008

podkoží *Caranx hippos*, Florida, Mexický záliv, USA, 2009, M. Bakenhaster

Philometra bagri Khalil, 1965

podkoží hlavy *Bagrus bajad*, jezero Turkana, Keňa, 2009, M. Jirků

Philometra brevispicula Moravec et Bakenhaster, 2010

epitel dutiny ústní mořské ryby *Lutjanus griseus*, Florida, Mexický záliv, USA, 2009, M. Bakenhaster

Philometra diplectri Moravec et Bakenhaster, 2010

podkoží úst *Diplectrum formosum*, Florida, Mexický záliv, USA, 2009, M. Bakenhaster

Philometra filiformis Stossich, 1896

vaječník *Pagellus erythrinus*, Marmarské moře, Turecko, 2003, E. Genc

Philometra filiformis (Stossich, 1896)
gonády *Pagellus erythrinus*, Středozemní moře u Sicílie, Itálie, 2008, G. Gaglio

Philometra floridensis Moravec, Fajer-Avila et Bakenhaster, 2009
vaječník *Sciaenops ocellatus*, Mexický záliv u Floridy, USA, 2008, M. Bakenhaster

Philometra gymnosardae Moravec, 2006
dutina tělní tuňáka *Gymnosarda unicolor*, Maledivy, 2005, R. Konečný

Philometra inimici Yamaguti, 1935
vaječník *Inimicus japonicus*, Japonské moře, Japonsko, 1987, K. Nagasawa

Philometra kobuleji Molnár et Fernando, 1975
dutina tělní *Hypentelium nigricans*, Guelph Reservoir, Ontario, Kanada, 1979, F. Moravec

Philometra lati Moravec et Jirků, 2009
dutina tělní *Lates niloticus*, jezero Turkana, Keňa, 2009, M. Jirků

Philometra lethrini Moravec et Justine, 2008
gonády *Lethrinus miniatur*, Nová Kaledonie, 2006, J.-L. Justine

Philometra morii Moravec, Bakenhaster et Fajer-Avila, 2010
tkáň ústní dutiny *Epinephelus morio*, Mexický záliv, Florida, USA, 2009, M. Bakenhaster

Philometra obladae Moravec, Gaglio, Panebianco et Giannetto, 2008
dutina tělní mořské ryby *Oblada melanura*, Středozemní moře u Sicílie, Itálie, 2008, G. Gaglio

Philometra ocularis Moravec, Ogawa, Suzuki, Miyazaki et Donai, 2002
hlava mořské ryby *Epinephelus areolatus*, Nová Kaledonie, 2006, K. Ogawa

Philometra rischta Skrjabin, 1923
pod kůží *Alburnus alburnus*, řeka Tisa, Maďarsko, 2005, M. Oros

Philometra saltatrix Ramachandran, 1973
gonády *Pomatomus saltatrix*, Toskánské moře (Pisa), Itálie, 2007, M. Magi

Philometra saltatrix Ramachandran, 1973
testis *Pomatomus saltatrix*, pobřeží Jižní Karolíny, USA, 2007, F. Moravec

Philometra sebastici Yamaguti, 1941
srdce *Sebastiscus japonicus*, Kyushu, Japonsko, 1997, T. Yoshinaga

Philometra serranellicabrillae Janiszewska, 1949
vaječník *Serranus cabrilla*, Korsika, 2008, C. Levron

Philometra sp. 1
dutina tělní *Arothron immaculatus*, Indonézie (Pelabuhan Ratu, Java), 2001, H. Palm

Philometra sp. 2
dutina tělní *Lobotes surinamensis*, Indonézie (Pelabuhan Ratu, Java), 2001, H. Palm

***Philometra* sp. 3**
podkoží úst a dutin *Mycteroperca microlepis*, Florida, Mexický záliv, USA, 2009, M. Bakenhaster

Philometra sp. 4
svalovina *Psettodes erumei*, Indonézie (Palabuhan Ratu, Java), 2001, H. Palm

Philometra sp. 5
dutina tělní *Pterogobius zonoleucus*, Japonské moře, Japonsko, 2010, K. Nagasawa

Philometra spicariae Moravec Gaglio, Giannetto et Marino., 2010
dutina tělní *Spicara smaris*, Ionské moře u Sicílie, Itálie, 2009, G. Gaglio

Philometra spiriformis Moravec, Charo-Karisa et Jirků, 2009
skřele *Lates niloticus*, jezero Turkana, Keňa, 2008, M. Jirků

Philometroides aphanonaris Moravec, Crosby, de Buron, González-Solís et Roumillat, 2008
dutina ústní *Micropterus salmoides*, Santee River, Jižní Karolína, USA, 2007, F. Moravec

Philometroides barbi Moravec, Šimková, Hanzelová, Špakulová et Cakić, 2005

ploutev *Barbus meridionalis*, Bulharsko, 2005, A. Šimková

Philometroides fulvidraconi Yu, Wu et Wang, 1993
dutina tělní *Pelteobagrus fulvidraco*, Čína, 1999, S. Wu

Philometroides grandipapillatus Moravec et Bakenhaster, 2010
ploutve *Caranx hippos*, Florida, Mexický záliv, USA, 2009, M. Bakenhaster

Philometroides huronensis Uhazy, 1976
ploutve *Catostomus commersonii*, Huronské jezero, Kanada, 1979, F. Moravec

Philometroides wellborni Moravec, Crosby, de Buron, González-Solís et Roumillat, 2008
orbit *Lepomis auritus*, Santee River, Jižní Karolína, USA, 2007, F. Moravec

Rumai rumai Travassos, 1960
tkáň dutiny ústní *Arapaima gigas*, Mexiana, Amazonia, Brazílie, 2008, F. Moravec

PHYSALOPTERIDAE

Heliconema longissimum (Ortlepp, 1923)
žaludek *Anguilla* sp., Manoray River, Madagaskar, 1998, H. Taraschewski

Heliconema longissimum (Ortlepp, 1923)
žaludek *Anguilla japonica*, Misho Cove, Japonsko, 2010, K. Nagasawa

QUIMPERIIDAE

Paraquimperia africana Moravec, Boomker et Taraschewski, 2000
střevo *Anguilla marmorata*, Fish River, JAR, 2008, H. Taraschewski

RHABDOCHONIDAE

Rhabdochona cotti Gustafson, 1949
střevo *Cottus caeruleomentus*, Fishing Creek, Maryland, 2005, P. Muzzal

Rhabdochona hellichi hellichi (Šrámek, 1901)
střevo *Barbus barbus*, Labe u Děčína, ČR, 2005, F. Moravec

Rhabdochona hellichi turkestanica (Skrjabin, 1917)
střevo *Schizothorax* sp., Sikkim, Indie, 2009, T. Scholz

Rhabdochona hospeti Thapar, 1950
střevo *Tor* sp., Sikkim, Indie, 2009, T. Scholz

Rhabdochona kidderi Pearse, 1936
střevo *Rhamdia guatemalensis*, Cenote Ixin-há, Yucatan, Mexiko, 2002, T. Scholz

Rhabdochona mazeedi Prasad et Sahay, 1965
střevo sladkovodní ryby *Clupisoma garuui*, Mukutmamipur, W. Bengal, Indie, 2009, T. Scholz

Rhabdochona zacconis Yamaguti, 1935
střevo *Tribolodon hakonensis*, řeka Takahara, Japonsko, 2010, K. Nagasawa

SKRJABILLANIDAE

Esocinema bohemicum Moravec 1977
stěna plovacího měchýře *Esox lucius*, delta řeky Volhy, Rusko, 2006, S.G. Sokolov

3.2. Metodika

3.2.1. Izolace DNA

Materiál použitý k izolaci pocházel z dospělých jedinců (kromě jednoho vzorku larválního stádia získaného z jepice) fixovaných v 70-99% etanolu, ale i ve formalinu,

z něhož byla většina převedena do etanolu. Nižší počet získaných sekvencí ve srovnání s množstvím analyzovaných vzorků byl způsoben tím, že byly použity též některé vzorky hlístic fixovaných 4 % formalinem, který je příčinou fragmentace DNA, což výrazně ztěžuje amplifikaci genu při PCR. Formalin se užívá především pro fixaci vzorků určených k morfologickému studiu. Pro molekulární studia se většinou používá jako fixáž čistý 70-99% etanol.

Celková DNA byla extrahována pomocí metody izolace fenol – chloroformem. Vzorky hlístic byly zbaveny etanolu a homogenizovány s malým množstvím zirkonium-křemičitanových kuliček (silica beads o průměru 0,5 mm), které usnadnily rozmělnění červů, ve 200 µl lyzačního činidla SET (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris - pH=8.0). K homogenizátu bylo přidáno 20 µl proteinázy K (20 mg/ml) a směs byla inkubována přes noc při teplotě 56°C. Po inkubaci byly kuličky odstraněny a homogenizát byl smíchán s fenolem v poměru 1 : 1 a protřepáván 10 minut. Poté byla směs centrifugována při 13 000 rpm (otáčky za minutu) 10 minut při teplotě 21°C. Po centrifugaci byla odsáta vrchní fáze obsahující DNA a celý postup promývání byl zopakován. Při třetím promývání byl přidán k vzorkům fenol společně s chloroformem v poměru 1 díl fenolu : 1 díl chloroformu : 2 díly promývané směsi obsahující DNA. Celá směs byla 10 minut třepána a 10 minut centrifugována při 13 000 rpm a při teplotě 21°C. Po centrifugaci byla opět odsáta vrchní fáze vzorků a k ní byly přidány 2 objemy 96% etanolu. Vzorky pak byly chlazeny 20 až 30 minut při teplotě -80°C nebo 1-2 hodiny při teplotě -20°C. Po zchlazení byly vzorky znovu centrifugovány 10 minut při teplotě 4°C a 13 000 rpm. Při centrifugaci se ve vzorcích vytvořily pelety promyté DNA. Pelety byly vysušeny při pokojové teplotě a poté rozpuštěny v 50 µl bidestilované vody (Sambrook a Russell 2001).

3.2.2. PCR amplifikace

Úsek malé ribozomální podjednotky (SSU) byl amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití primerů pro SSU (Wijová a kol. 2004, 2006), a to buď vcelku: forward primer: *PhilonemaF* 5'-GCC TAT AAT GGT GAA ACC GCG AAC-3' a revers primer: *PhilPCRr* 5'-CCG GTT CAA GCC ACT GCG ATT A-3', nebo odděleně ve třech menších částečně se překrývajících částech: 1. fragment: forward primer: *PhilonemaF* 5'-GCC TAT AAT GGT GAA ACC GCG AAC-3' a revers primer: *ameb620r* 5'-GGA ATT ACC GCG GGT GCT GGC-3', 2. fragment: forward primer: *WF400* 5'-GCG CAA ATT ACC CAC TCT-3' a revers primer: *WR800* 5'-GGT ATC GTT TAC GGT CAG-3', 3.

fragment: forward primer ameb620f 5'-GCC AGC ACC CGC GGT AAT TCC-3' a revers primer PhilPCRR 5'-CCG GTT CAA GCC ACT GCG ATT A-3'. PCR reakce obsahovala ve 25 μ l: 2,5 μ l 10x Taq PCR bufferu, 0,25 μ l Taq DNA polymerázy (1 U/ μ l), 0,2 μ l 10 mM dNTP (Top-Bio), 0,5 μ l (25 nmol) každého primeru, 1 μ l (50-200 ng/ μ l) DNA, 20,05 μ l ddH₂O. DNA byla amplifikována v cycleru MJ Mini (Bio-Rad). Amplifikační program se skládal z počáteční denaturace 5 minut při 94°C, následované 35 cykly zahrnující tyto části 94°C/40 sekund, 55°C/40 sekund, 72°C/2 minuty, a závěrečné elongace 72°C/10 minut.

Elektroforéza byla použita ke kontrole úspěšnosti izolace genomové DNA z tkáně a ke kontrole velikosti fragmentů DNA po PCR amplifikaci a byla prováděna na 1% TAE agarózovém gelu. K určení velikostí fragmentů byl použit 2-Log DNA ladder (New England Biolabs, Inc.) sloužící jako molekulární marker. Produkty byly detekovány na UV transiluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Amplifikované úseky požadované velikosti byly z gelu vyříznuty a izolovány kitem QIAquick Gel[®] Extraction Kit (QIAGEN) podle přiloženého manuálu.

U vzorků, u nichž nevznikaly nespecifické produkty, byla provedena purifikace enzymatickým čištěním. Na každých 15 μ l PCR produktu bylo přidáno 1 μ l Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ μ l); 1,5 μ l Exonuclease I (1 U/ μ l) naředěné v poměru 1 : 10 v 50 mM Tris HCl (pH 8,8); oba tyto produkty jsou od firmy USD Corporation. Celá reakce byla inkubována 30 minut při 37°C a dalších 15 minut při 80°C. Purifikovaný a enzymaticky čistý PCR produkt byl použit přímo k sekvenování.

3.2.3. Klonování amplifikovaných PCR produktů

Vyčištěné PCR produkty byly zaklonovány pomocí pGEM-T Easy Vector System II (Promega). Ligační směs obsahovala 0,5 μ l pGEM-T Easy plazmidu (50 ng/ μ l), 1,5 μ l PCR produktu, 0,5 μ l T4 DNA ligázy (3 U/ μ l) a 2,5 μ l 10x ligačního pufru. Celá směs byla důkladně promíchána a inkubována přes noc při 4°C.

Kompetentní buňky *E. coli* DH5 α byly pomalu rozmrazeny na ledu. Celkem 30 μ l buněk bylo přidáno ke každé ligační směsi a inkubováno na ledu 10 až 30 minut. Pak byla celá směs s buňkami vystavena teplotnímu šoku 42°C po dobu 45 sekund a poté vrácena zpět na led na dobu 2 minut. Následně bylo přidáno 250 μ l SOC média vytemperovaného na pokojovou teplotu a transformované buňky byly nanесeny na LB agarózové plotny obsahující ampicilin (100 μ g/ml), 40 μ l X-galu (40 mg/ml) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid, Serva) a 4 μ l IPTG (2% isopropylthiogalaktosid) rozprostřeného po celém

povrchu plotny. Plotny byly umístěny do termálního boxu a buňky zde rostly při teplotě 37°C po dobu 15 až 17 hodin (Sambrook a Russell 2001). Po inkubaci na plotnách narostly bílé a modré kolonie. Bílé kolonie byly posbírány a umístěny do 3 ml LB média obsahujícího ampicilin (50 µg/ml). LB média s buňkami byla inkubována s třepáním (200 rpm) ve 37°C 13-15 hodin. Plasmidy DNA byly izolovány QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (QIAGEN) podle instrukcí v manuálu.

3.2.4. Restrikční analýza

Přítomnost inzertů v plasmidech byla určována restrikční analýzou. Reakce obsahovala 1 µl enzymu EcoR I (15 U/µl), 2 µl EcoR I Buffer, 12 µl bidestilované vody a 5 µl plasmidové DNA. Reakční směs byla promíchána a inkubována při 37°C 1 hodinu. Elektroforéza byla použita ke kontrole, zda plasmidy obsahují DNA inzerty požadované délky.

3.2.5. Sekvenování

Pro správné provedení reakce bylo nutné znát koncentraci PCR produktu. Ta byla vypočítána podle absorbance zjištěné při spektrofotometrii (BioPhotometr Eppendorf). Sekvenační směs obsahovala 500 nM primeru, 300-390 ng přečištěného PCR produktu a byla doplněna do celkového objemu 7,5 µl bidestilovanou vodou. V případě sekvenace plasmidu byl použit primer M13R nebo M13F, pokud byla DNA sekvenována z PCR produktu, byl vybrán jeden z primerů použitý v amplifikační reakci. Genové fragmenty byly sekvenovány pomocí ABI PRISM[®] BIG DYE[®] Terminator v 3.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sekvenční reakce a sekvenace byly provedeny v laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR. Použité sekvenační primery jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Přehled použitých primerů.

Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Směr
PhilonemaF	GCC TAT AAT GGT GAA ACC GCG AAC	→
PhilPCRr	CCG GTT CAA GCC ACT GCG ATT A	←
WF400	GCG CAA ATT ACC CAC TCT	→
WR400	CAA CTT CAT GCG GCT GAA	←
ameb620f	GCC AGC ACC CGC GGT AAT TCC	→
ameb620r	GGA ATT ACC GCG GGT GCT GGC	←
WF760	GCC TGA ATA CTC GTG CAT	→
WR800	GGT ATC GTT TAC GGT CAG	←
Phil1200F	CCG TGA GGA TTG ACA GAT TGA GAG C	→

Phil1200R	CCG CGG CTG CTG GCA CCA GAC TT	←
WF1550	CCT AGT AAG TGT GAG TCA	→
WR1600	CAG ACT CAC CAA TTG ACG	←

3.2.6. Analýza sekvencí

Při práci s molekulárními daty byly použity programy DNASTAR ver. 5.06 (DNA STAR, Inc.). Program EditSeq sloužil jako textový editor sekvencí; v programu SeqManII byly komplementární sekvence spojeny, upraveny a byla z nich vytvořena konsenzuální sekvence. Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena vyhledáním homologních sekvencí algoritmem BLAST v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Alignment byl vytvořen metodou iterativního vylepšování alignmentu algoritmem L-INS-i (local alignment with affine gap costs) v programu Mafft (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences) ver. 6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>) (Katoh a kol. 2005). Úpravy alignmentu byly provedeny v programu BioEdit ver. 7.0.5.2 (Hall 1999).

K nově získaným sekvencím bylo přidáno celkem 138 sekvencí převzatých z genové banky, z nichž 79 sekvencí zastupovalo “clade III” (podřád Spirurina ustanovený na základě molekulárních dat podle De Ley a Blaxtera (2002)) z morfologicky ustanovených řádů Spirurida, Ascaridida, Rhigonematida a Oxyurida (viz Tabulka 3). Jako outgroup byli použiti zástupci příbuzných skupin: Areolaimida (*Anaplectus* sp., *Plectus aquatilis*, *Tylocephalus auriculatus*) a Rhabditida (*Brevibucca* sp., *Myolaimus* sp.). V analýze zabývající se umístěním “clade III” v rámci nematod byly zahrnuty dva nově osekvenované druhy ze skupiny Ascaridida a k nim bylo vybráno 51 zástupců ostatních skupin taxonu Chromadorea (z nichž 10 zástupců je součástí “clade III”) podle Meldal a kol. (2007) (viz Tabulka 3). Jako outgroup byli použiti zástupci příbuzných skupin Dorylaimia: Dorylaimida (*Aporcelameillus obtusicaudatus*), Mononchida (*Prionchulus muscorum*), Trichocephalida (*Trichinella spiralis*) a Enoplia: Enoplida (*Alaimus* sp.).

Tabulka 3. Přehled sekvencí SSU rDNA použitých z genové banky (GenBank)

Řád	Čeleď	Druh	A. N.
AREOLAIMIDA	AXONOLAIMIDAE	<i>Axonolaimus helgolandicus</i>	AY854232
	PLECTIDAE	<i>Anaplectus</i> sp.	AJ966473
	PLECTIDAE	<i>Plectus aquatilis</i>	AF036602
	PLECTIDAE	<i>Tylocephalus auriculatus</i>	AF202155
ASCARIDIDA	ANISAKIDAE	<i>Terranova scoliodontis</i>	DQ442661

	ASCARIDIDAE	<i>Ascaris lumbricoides</i>	U94366
	ASCARIDIDAE	<i>Toxocara canis</i>	U94382
	ASPIRODERIDAE	<i>Paraspidodera</i> sp.	AF083005
	ATRACTIDAE	<i>Rondonia rondoni</i>	DQ442679
	CUCULLANIDAE	<i>Truttaedacnitis truttae</i>	EF180063
		<i>Raillietnema</i> sp.	DQ503461
	HETERAKIDAE	<i>Heterakis gallinarum</i>	DQ503462
	HETERAKIDAE	<i>Heterakis</i> sp.	AF083003
	KATHLANIIDAE	<i>Cruzia americana</i>	U94371
	RAPHIDASCARIDIDAE	<i>Goezia pelagia</i>	U94372
	TOXOCARIDAE	<i>Toxocara canis</i>	AF036608
DESMODORIDA	DESMODORIDAE	<i>Catanema</i> sp.	Y16912
	DESMODORIDAE	<i>Desmodora ovigera</i>	Y16913
	MICROLAIMIDAE	<i>Calomicrolaimus</i>	AY854218
	MONOPOSTHIIDAE	<i>Monoposthia costata</i>	AY854221
DIPLOGASTERIDA	DIPLOGASTERIDAE	<i>Aduncospiculum halicti</i>	U61759
DORYLAIMIDA	APORCELAIMIDAE	<i>Aporcelaimellus</i>	DQ141212
ENOPLIDA	ALAIMIDAE	<i>Alaimus</i> sp.	AJ966514
CHROMADORIDA	CYATHOLAIMIDAE	<i>Cyatholaimus</i> sp.	AY854213
	CHROMADORIDAE	<i>Dichromadora</i> sp.	AY854209
	CHROMADORIDAE	<i>Chromadora nudicapitata</i>	AY854205
ISOLAIMIDA	ISOLAIMIDAE	<i>Isolaimium</i> sp.	AY919142
MONHYSTERIDA		<i>Cyartonema elegans</i>	AY854203
	COMESOMATIDAE	<i>Sabatieria punctata</i>	AY854236
	LINHOMOETIDAE	<i>Desmolaimus zeelandicus</i>	AY854229
	LINHOMOETIDAE	<i>Terschellingia longicaudata</i>	AY854230
	MONHYSTERIDAE	<i>Tridentulus</i> sp.	AJ966507
	SPHAEROLAIMIDAE	<i>Sphaerolaimus hirsutus</i>	AY854228
	STRONGYLOIDIDAE	<i>Strongyloides ratti</i>	U81581
	XYALIDAE	<i>Daptonema procerus</i>	AF047889
MONONCHIDA	MONONCHIDAE	<i>Prionchulus muscorum</i>	AJ966500
OXYURIDA	HETEROXYNEMATIDAE	<i>Dentostomella</i> sp.	AF036590
	OXYURIDAE	<i>Oxyuris equi</i>	EF180062
RHABDITIDA	BREVIBUCCIDAE	<i>Brevibucca</i> sp.	AF202163
	BUNONEMATIDAE	<i>Bunonema franzi</i>	AJ966477
	CEPHALOBIDAE	<i>Cervidellus alutus</i>	AF202152
	CEPHALOBIDAE	<i>Zeldia punctata</i>	U61760
	MYOLAIMIDAE	<i>Myolaimus</i> sp.	U81585
	PANAGROLAIMIDAE	<i>Panagrolaimus</i> sp.	U81579
	RHABDITIDAE	<i>Caenorhabditis elegans</i>	X03680
	RHABDITIDAE	<i>Rhabditoides inermis</i>	AF082996
	RHABDITIDAE	<i>Rhabditis myriophila</i>	U81588
	RHABDITIDAE	<i>Teratorhabditis synpapillata</i>	AF083015
	TERATOCEPHALIDAE	<i>Teratocephalus lirellus</i>	AF036607
RHIGONEMATIDA		<i>Brumptaemilius justini</i>	AF036589
	RHIGONEMATIDAE	<i>Rhigonema thysanophora</i>	EF180067
SPIRURIDA	ACUARIIDAE	<i>Echinuria borealis</i>	EF180064
	ACUARIIDAE	<i>Synhimantus laticeps</i>	EU004818
	ANGUILLICOLIDAE	<i>Anguillicoloides crassus</i>	DQ49022

CAMALLANIDAE	<i>Camallanus cotti</i>	EF180071
CAMALLANIDAE	<i>Camallanus lacustris</i>	DQ442663
CAMALLANIDAE	<i>Camallanus oxycephalus</i>	DQ503463
CAMALLANIDAE	<i>Camallanus</i> sp.	DQ442664
CAMALLANIDAE	<i>Procamallanus pacificus</i>	DQ442665
CAMALLANIDAE	<i>Procamallanus pintoi</i>	DQ442666
CAMALLANIDAE	<i>Procamallanus rebecca</i>	DQ442667
CAMALLANIDAE	<i>Spirocamallanus istiblenni</i>	EF180076
CAMALLANIDAE	<i>Spirocamallanus rarus</i>	DQ494195
CYSTIDICOLIDAE	<i>Ascarophis arctica</i>	DQ094172
CYSTIDICOLIDAE	<i>Neoscarophis macrouri</i>	DQ442660
CYSTIDICOLIDAE	<i>Spinitectus carolini</i>	DQ503464
DIPLOTRIAENIDAE	<i>Serratospiculum tendo</i>	AY702704
DRACUNCULIDAE	<i>Dracunculus insignis</i>	AY947719
DRACUNCULIDAE	<i>Dracunculus medinensis</i>	AY852268
DRACUNCULIDAE	<i>Dracunculus oesophageus</i>	AY852269
GNATHOSTOMATIDAE	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Z96946
GNATHOSTOMATIDAE	<i>Gnathostoma turgidum</i>	Z96948
HABRONEMATIDAE	<i>Cyrnea mansioni</i>	AY702701
MICROPLEURIDAE	<i>Micropleura australiensis</i>	DQ442678
ONCHOCERCIDAE	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	DQ094171
ONCHOCERCIDAE	<i>Brugia malayi</i>	AF036588
ONCHOCERCIDAE	<i>Dirofilaria immitis</i>	AF036638
ONCHOCERCIDAE	<i>Loa loa</i>	DQ094173
ONCHOCERCIDAE	<i>Onchocercidae</i> gen. sp.	DQ103704
ONCHOCERCIDAE	<i>Subanguina radiccicola</i>	AF202164
PHILOMETRIDAE	<i>Alinema amazonicum</i>	DQ442672
PHILOMETRIDAE	<i>Clavinema parasiluri</i>	DQ076682
PHILOMETRIDAE	<i>Dentiphilometra monoapteri</i>	DQ076685
PHILOMETRIDAE	<i>Dentiphilometra</i> sp.	DQ442673
PHILOMETRIDAE	<i>Margolisianum bulbosum</i>	AB185161
PHILOMETRIDAE	<i>Nilonema senticosum</i>	DQ442671
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra clavaeiceps</i>	DQ076686
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra cyprinirutili</i>	DQ442675
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra fujimotoi</i>	DQ076680
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra lateolabraxis</i>	FJ161972
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra madai</i>	FJ161974
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra nemipteri</i>	FJ161975
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra obturans</i>	AY852267
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra ovata</i>	DQ442677
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra sawara</i>	FJ161973
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra sciaenae</i>	FJ161971
PHILOMETRIDAE	<i>Philometra</i> sp.	DQ442674
PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides carassii</i>	DQ076683
PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides cyprini</i>	DQ076688
PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides fulvidraconi</i>	DQ076684
PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides ganzhounensis</i>	DQ076681
PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides pseudorasbori</i>	DQ076687
PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides sanguineus</i>	DQ442676

	PHILOMETRIDAE	<i>Philometroides seriolae</i>	FJ155811
	PHILOMETRIDAE	<i>Philonema oncorhynchi</i>	DQ442670
	PHILOMETRIDAE	<i>Philonema</i> sp.	U81574
	PHYSALOPTERIDAE	<i>Physaloptera alata</i>	AY702703
	PHYSALOPTERIDAE	<i>Physaloptera</i> sp.	EF180065
	PHYSALOPTERIDAE	<i>Turgida torresi</i>	EF180069
	PHYSALOPTERIDAE	<i>Turgida turgida</i>	DQ503459
	RHABDOCHONIDAE	<i>Rhabdochona denudata</i>	DQ442659
	SKRJABILLANIDAE	<i>Molnaria intestinalis</i>	DQ442668
	SKRJABILLANIDAE	<i>Skrjabillanus scardinii</i>	DQ442669
	TETRAMERIDAE	<i>Tetrameres fissipina</i>	EF180077
	THELAZIIDAE	<i>Spirocerca lupi</i>	AY751497
	THELAZIIDAE	<i>Thelazia lacrymalis</i>	DQ503458
STRONGYLIDA	HELIGMONELLIDAE	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	AF036597
	STRONGYLIDAE	<i>Strongylus equinus</i>	DQ094176
TRICHOCEPHALIDA	TRICHINELLIDAE	<i>Trichinella spiralis</i>	U60231
TYLENCHIDA	APHELENCHIDAE	<i>Aphelenchus avenae</i>	AF036586
	BELONOLAIMIDAE	<i>Geocenamus quadriifer</i>	AY993977
	CRICONEMATIDAE	<i>Criconema</i> sp.	AJ966480
	HOPLOLAIMIDAE	<i>Scutellonema bradys</i>	AJ966504
	MELOIDOGYNIDAE	<i>Meloidogyne incognita</i>	U81578
	PRATYLENCHIDAE	<i>Pratylenchus thornei</i>	AJ966499
	TYLENCHIDAE	<i>Boleodorus thylactus</i>	AY993976
	TYLENCHIDAE	<i>Tylenchidae</i> gen. sp.	AY854241

3. 2.7. Fylogenetické analýzy

Bylo vytvořeno šest datasetů zaměřených na jednotlivé skupiny hlístic. Dataset zabývající se vztahy uvnitř čeledi Philometridae byl doplněn o kratší sekvence (~ 950 bp) z GenBank. K datasetu Spirurina byly přidány 3 sekvence z nadčeledi Filaroidea z GeneBank. Všechny datasety byly analyzovány metodami maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood, ML) a Bayesiánské inference (Bayesian inference, BI).

Evoluční modely byly vybrány na základě Akaike information criterion v programu ModelTest ver. 3.7 (Posada a Crandall 1998) s cílem určení partikulárního modelu pro evoluci sekvencí, který by nejlépe odpovídal analyzovaným datům. Jako nejvhodnější byl vybrán model GTR+ Γ +I (*general-time-reversible*) s gamma distribuovanou rychlostí evoluce jednotlivých míst v alignmentu a započítáním množství neměnných pozic.

ML stromy byly zkonstruovány programem PHYML 2.4.2 (Guindon a Gascuel 2003) s neparametrickou bootstrapovou analýzou pro 1000 a 500 replikací.

Bayesiánská analýza byla provedena programem MrBayes ver. 3.1.2 (Huelsenbeck a kol. 2001). Posteriorní pravděpodobnosti (posterior probabilities) byly odhadnuty v závislosti

na různém počtu generací, a to pro 10 000 000 a 5 000 000 generací. Velikost burn-in periody byla určena dle konvergence dvou nezávislých MCMCMC řetězců (standard deviation of split frequencies).

K vizualizaci výsledných topologií byl použit program TreeView ver. 1.6.6 (Page 1996).

4. VÝSLEDKY

4.1. Sekvenční analýza

Byly získány částečné sekvence SSU rDNA 38 zástupců těchto čeledí (viz Tabulka 4). Řád Ascaridida: čeleď Anisakidae-1 sekvence, Cucullanidae-1 sekvence a Quimperiidae-1 sekvence a řád Spirurida: čeleď Camallanidae-6 sekvencí, Cystidicolidae-6 sekvencí, Daniconematidae-1 sekvence, Philometridae-15 sekvencí, Physalopteridae-2 sekvence, Rhabdochonidae-4 sekvence, Skrjabillanidae-1 sekvence. Délky sekvencí se pohybovaly v rozmezí 1629–1920 bp (Tabulka 4).

Tabulka 4. Přehled získaných sekvencí a jejich délky [bp].

Druh/Čeleď	Délka sekvence
ANISAKIDAE	
<i>Goezia spinulosa</i>	1636
CAMALLANIDAE	
<i>Camallanus hypophthalmichthys</i>	1666
<i>Procamallanus (Procamallanus) fulvidraconis</i>	1667
<i>Procamallanus (Procamallanus) laeviconchus</i>	1667
<i>Procamallanus (Procamallanus) sigani</i>	1663
<i>Procamallanus (Spirocamallanus) lethrini</i>	1663
<i>Procamallanus (Spirocamallanus) rarus</i>	1656
CUCULLANIDAE	
<i>Cucullanus baylisi</i>	1629
CYSTIDICOLIDAE	
<i>Ascarophis (Dentiascarophis) adioryx</i>	1665
<i>Cystidicola farionis</i>	1639
<i>Metabronema magnum</i>	1644
<i>Neoascarophis longispicula</i>	1636
<i>Salmonema ephemeridarum</i>	1638
<i>Spinitectus tabascoensis</i>	1655
DANICONEMATIDAE	
<i>Mexiconema africanum</i>	1759
PHILOMETRIDAE	
<i>Afrophilometra hydrocyoni</i>	1656
<i>Carangiema americanum</i>	1705
<i>Philometra bagri</i>	1673
<i>Philometra brevispicula</i>	1787
<i>Philometra diplectri</i>	1734
<i>Philometra floridensis</i>	1770
<i>Philometra gymnosardae</i>	1667
<i>Philometra lati</i>	1739
<i>Philometra morii</i>	1713
<i>Philometra ocularis</i>	1739
<i>Philometra saltatrix</i>	1648
<i>Philometra</i> sp. 3	1739
<i>Philometra spiriformis</i>	1654

<i>Philometroides grandipapillatus</i>	1755
<i>Rumai rumai</i>	1706
PHYSALOPTERIDAE	
<i>Heliconema longissimum</i> (Japonsko)	1644
<i>Heliconema longissimum</i> (Madagaskar)	1644
QUIMPERIIDAE	
<i>Paraquimperia africana</i>	1630
RHABDOCHONIDAE	
<i>Rhabdochona (Rhabdochona) hellichi hellichi</i>	1644
<i>Rhabdochona (Rhabdochona) hellichi turkestanica</i>	1643
<i>Rhabdochona (Rhabdochona) hospeti</i>	1643
<i>Rhabdochona (Globochona) mazeedi</i>	1643
SKRJABILLANIDAE	
<i>Esocinema bohemicum</i>	1920

4.2. Fylogenetická analýza

K nově získaným sekvencím byly přidány sekvence vybraných druhů hlístic z genové banky, z nichž bylo vytvořeno šest fylogenetických stromů metodou Baesiánské inference (BI) se skutečnou délkou větví doplněných o bootstrapové podpory jednotlivých uzlů z ML analýzy. Tato studie se zaměřila na prozkoumání příbuzenských vztahů uvnitř “clade III” (podřád Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002)) (Obr. 5), nadčeledi Dracunculoidea (Obr. 7), čeledi Philometridae (Obr. 8), čeledi Camallanidae (Obr. 8), podřádu Spirurina Chitwood, 1937 (Obr. 9), ale i na umístění samotného “clade III” ve skupině Chromadoria (Obr. 6).

Nejrozsáhlejší analýza zahrnuje 109 taxonů, ze kterých 104 druhy reprezentují zástupce “clade III” (Obr. 5). Na bázi tohoto stromu se objevuje nadčeleď Seuratoidea zastupující na jedné větvi čeleď Quimperiidae (*Paraquimperia africana*) a na druhé větvi čeleď Cucullanidae (*Cucullanus baylisi* a *Truttaedacnitis truttae*). Poloha čeledi Quimperiidae, která tvoří sesterskou skupinu k dobře podpořenému klastru zbývajících zástupců Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002), je podpořena jen velmi nízkou posteriorní pravděpodobností i nízkým bootstrapem. Z důvodu nepřibuznosti této skupiny se skupinou Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002) a tedy možné parafylie celého “clade III” byl sestromen strom, do něhož byli zahrnuti vybraní zástupci skupiny Chromadoria (Obr. 6). V této analýze se “clade III” jeví jako monofyletický, ale statistická podpora uzlů spojujících tyto skupiny je stále relativně nízká.

Podle předchozí analýzy “clade III” (Obr. 5) se na tomto fylogenetickém stromě nachází jediný monofyletický řád, a to řád Oxyurida, ostatní řády (Ascaridida, Rhigonematida a Spirurida) jsou parafyletické. Zástupci řádu Spirurida (vyjma třech druhů ze dvou nadčeledí), řádu Ascaridida (kromě čtyř zástupců ze třech nadčeledí), řádu Rhigonematida a

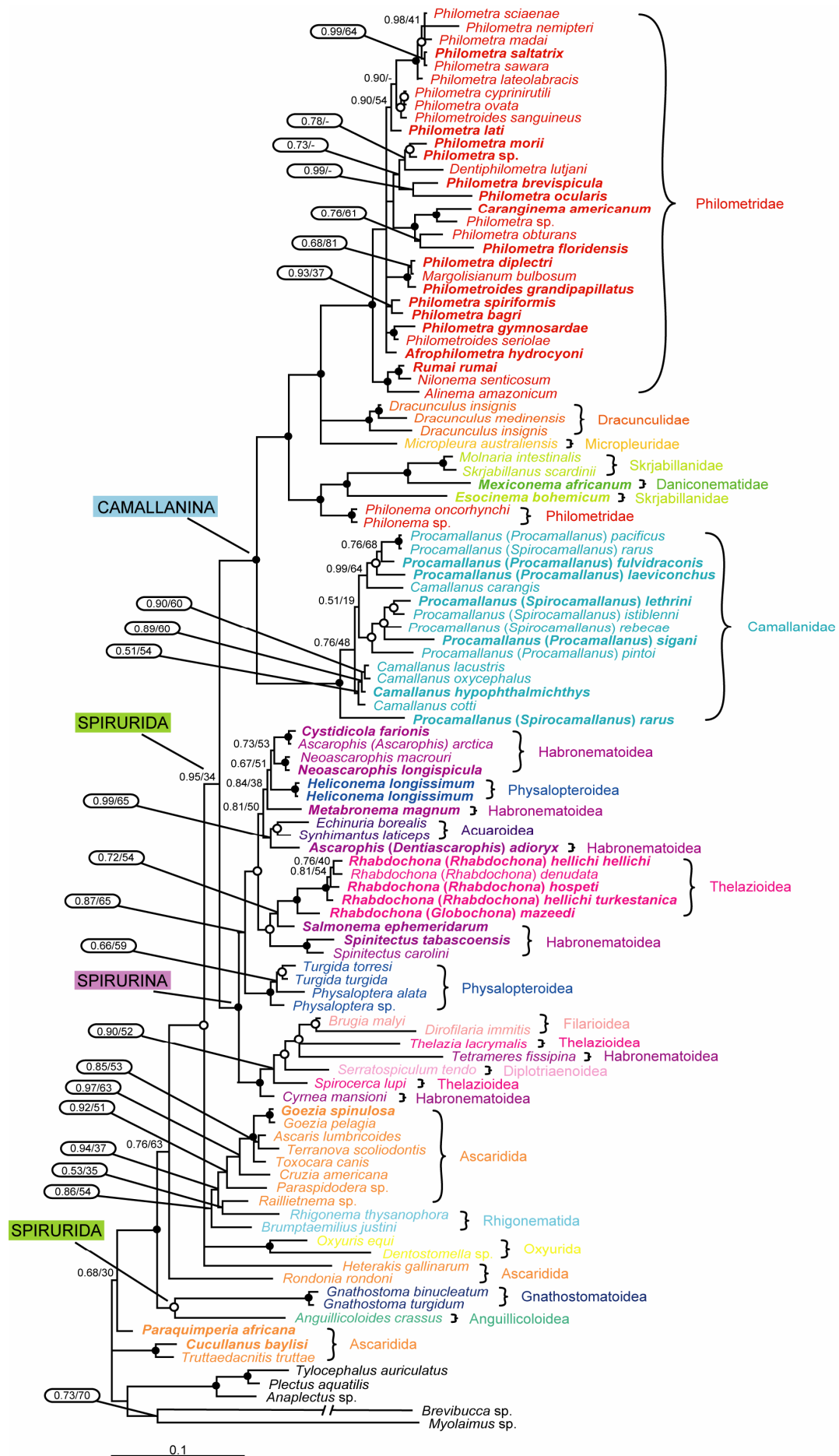
řádu Oxyurida tvoří ve střední části stromu polytomii. Většina druhů řádu Spirurida se řadí do klastru na vrchní části stromu a dělí se zde do dvou morfologicky i molekulárně definovaných podřádů Camallanina a Spirurina Chitwood, 1937. Zástupci nadčeledí Anguilliculoidea (Camallanina) a Gnathostomatoidea (Spirurina) jsou umístěni na vzdálené větvi tvořící velmi dobře podpořenou sesterskou skupinu ke všem zmíněným řádům (viz výše), která se před doplněním datasetu o druhy z nadčeledi Seuratoidea nacházela na bázi celého “clade III” (viz Wijová a kol. 2006).

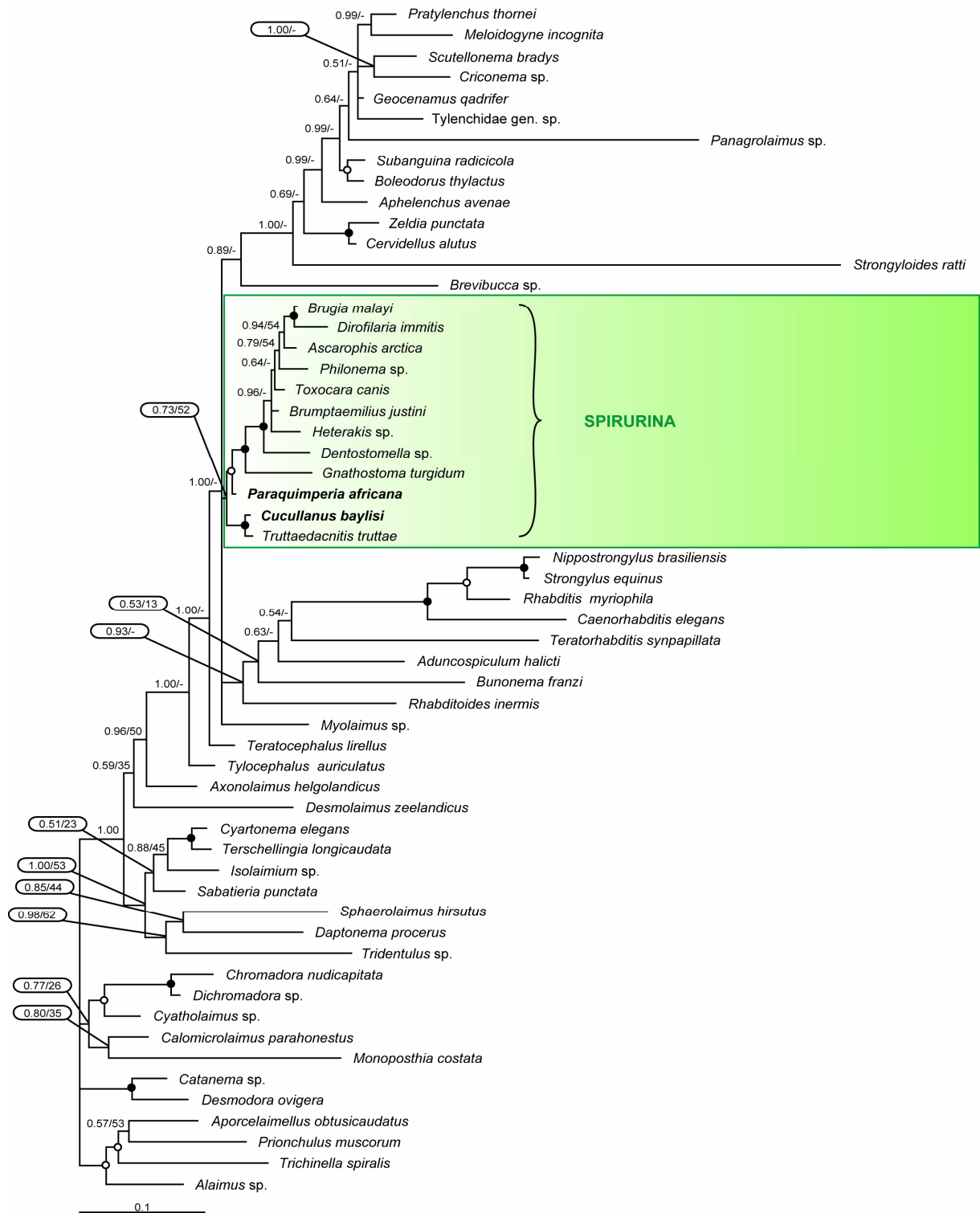
Monofylie nadčeledi Dracunculoidea je po povýšení čeledi Anguilliculoidea na nadčeď silně podpořena. Sesterskou skupinu k Dracunculoidea tvoří nadčeď Camallanoidea (čeď Camallanidae), která je rovněž monofyletická s dobrou statistickou podporou. Dracunculoidea zahrnuje monofyletické čeledi Dracunculidae, Micropleuridae, Daniconematidae a parafyletické Philometridae a Skrjabillanidae. Silně podpořená část Philometridae tvoří sesterskou skupinu k čeledím Dracunculidae a Micropleuridae s nejasnými vztahy. Obrázek 7 zobrazuje fylogenetický strom sestrojený z datasetu obsahujícím pouze zástupce Dracunculoidea a přináší tak detailnější pohled na příbuzenské vztahy uvnitř tohoto taxonu. Polytomie je eliminována a *Micropleura australiensis* (Micropleuridae) zde tvoří sesterskou skupinu k čeledi Dracunculidae. Sesterskou skupinu ke třem zmíněným čeledím tvoří skupina zahrnující Skrjabillanidae, Daniconematidae a část Philometridae (*Philonema* sp.). *Mexiconema africanum* (Daniconematidae) se včleňuje mezi zástupce skrjabillanidů a tvoří sesterskou skupinu k druhům *Micropleura australiensis* a *Skrjabillanus scardinii*. Tyto tři druhy jsou umístěny na jedné větvi s částí čeledi Philometridae zastoupené dvěma druhy (*Philonema* sp. a *Philonema oncorhynchi*), jež tvoří k zmíněným dvěma čeledím sesterskou skupinu.

Vztahy dvou v analýzách nejvíce zastoupených čeledí Philometridae a Camallanidae ilustrují fylogenetické stromy na Obr. 7 a 8: čeď Philometridae byla v první analýze zkoumána v rámci celé nadčeledi Dracunculoidea (Obr. 7). Druhý fylogenetický strom se zaměřuje pouze na tuto čeď (Obr. 8). Obě tyto analýzy podporují výsledky z předchozí studie (Wijová a kol. 2006). Rody *Philometra*, *Philometroides* a *Dentiphilometra*, i přes doplnění datasetu o další druhy, zde zůstávají parafyletické. Dobře statisticky podpořená větev s dvěma jihoamerickými druhy (*Nilonema senticosum* a *Alinema amazonicum*) oddělující se od ostatních druhů je doplněna dalším *Rumai rumai*, který se nachází na společné větvi s *Nilonema*. Z fylogenetického stromu zkoumajícího vztahy uvnitř čeledi Camallanidae je patrné, že rody *Camallanus* a *Procamallanus*, ale i podrody *Procamallanus* a *Spirocamallanus* jsou parafyletické (Obr. 8).

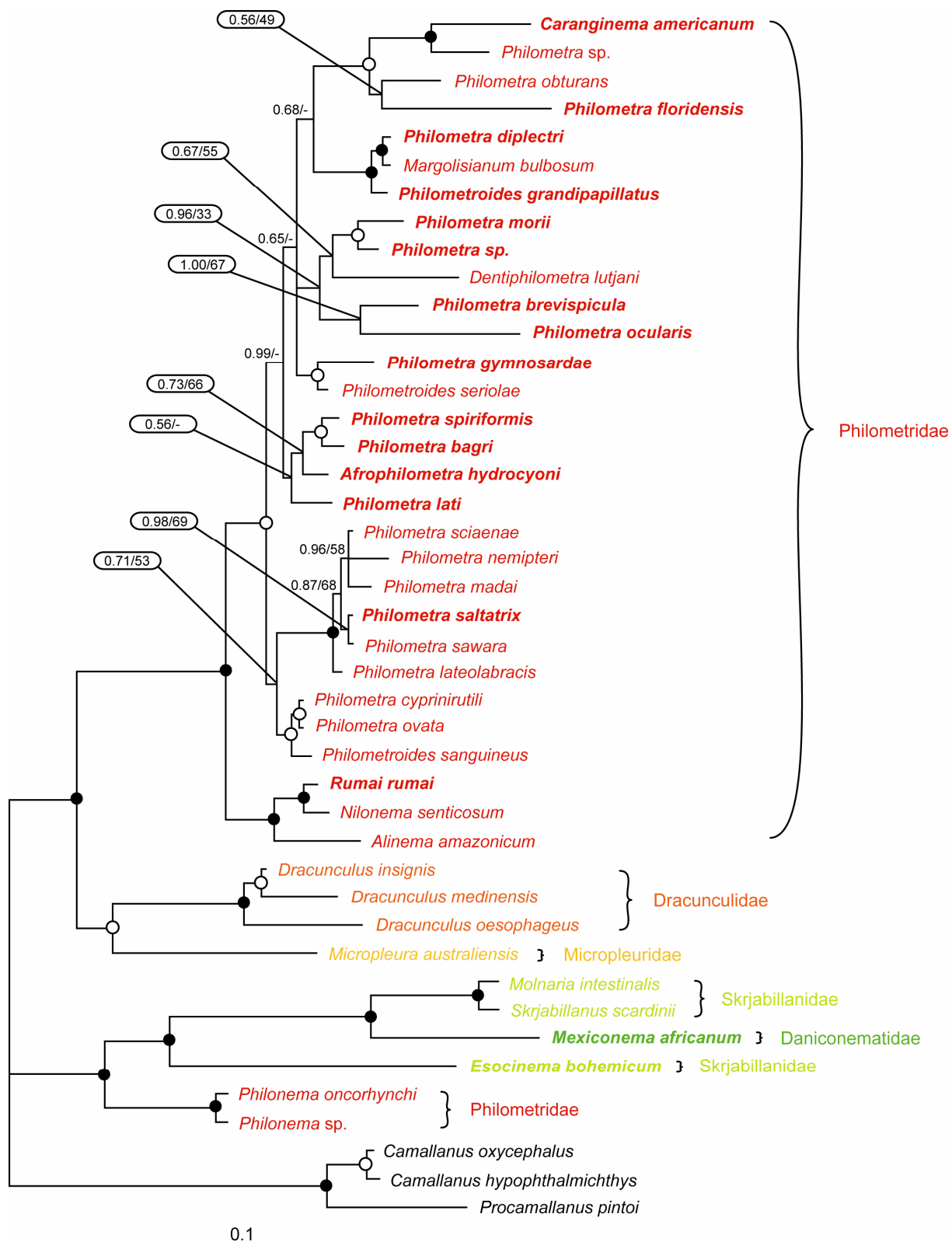
Sesterskou skupinu podřádu Camallanina tvoří morfologicky definovaný podřád Spirurina Chitwood, 1937. Toto štěpení je podpořeno v jedné analýze vysokou posteriorní pravděpodobností (0,95), zatímco ML analýza vykazuje nízký bootstrap (34). Podřád Spirurina Chitwood, 1937 se rozděluje do dvou stabilních větví, z nichž první je tvořena jednou monofyletickou nadčeledí Acuaroidea (čeleď Acuaridae) a třemi parafyletickými nadčeleděmi Habronematoidea, Physalopteroidea (čeleď Physaloperidae) a Thelazioidea. Zajímavým výsledkem je, že se část nadčeledi Physalopteroidea (s druhem *Heliconema longissimum*) odštěpuje od příbuzných rodů (*Physaloptera* sp., *Turgida* sp.) nacházejících se na bázi této větve a včleňuje se mezi Habronematoidea a Acuaroidea. Druhá větev zahrnuje zástupce parafyletických nadčeledí Filarioidea (čeleď Onchocercidae) (Obr. 9), Thelazioidea, Habronematoidea a nadčed' Diplotriaeoidea (čeleď Diplotriaeidae) s jediným druhem. Obr. 9 ilustruje parafylii čeledi Cystidicolidae a Thelaziidae, monofylii čeledi Rhabdochonidae a čeledi Tetrameridae a Habronematidae, které jsou zastoupeny pouze jedním druhem. Výsledky analýzy dokazují, že rody *Neoascarophis*, *Spinitectus* (Cystidicolidae), *Rhabdochona* (Rhabdochonidae) a druh *Heliconema longissimum* (Physaloperidae) jsou monofyletické a dobře podpořené na rozdíl od rodu *Ascarophis*, jež je parafyletický.

Obr. 5. Fylogenetický strom “clade III” (podřád Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002)) sestavený Bayesiánskou inferencí (BI) vypočítaný z $7,5 \times 10^6$ generací. Podpory uzlů udávají posteriorní pravděpodobnost pro 1×10^7 generací (počet odstraněných generací – burn-in = $2,5 \times 10^6$)/hodnoty bootstrapu z analýzy ML (počet opakování 1000). Nově získané sekvence jsou označeny tučně. Označení – ukazuje, kde se topologie BI a ML neshodují. Plné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI=1.0 a ML>90. Prázdné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI>80 a ML>70. Větev, na které se nachází *Brevibucca* sp., je zkrácena o dvě třetiny.

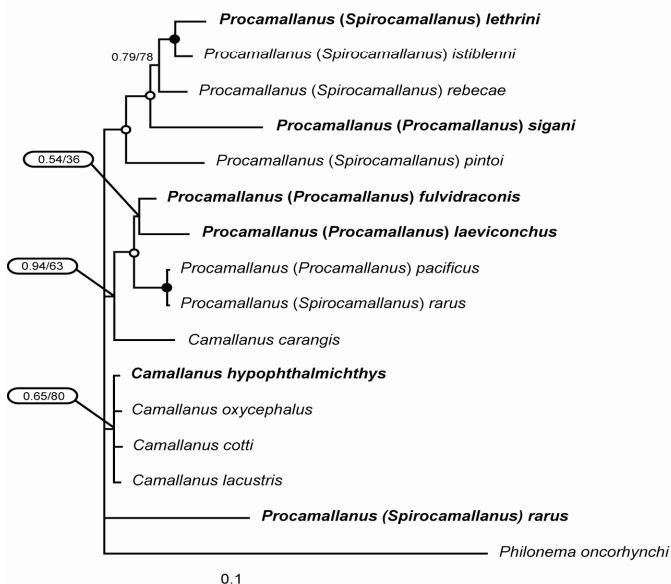
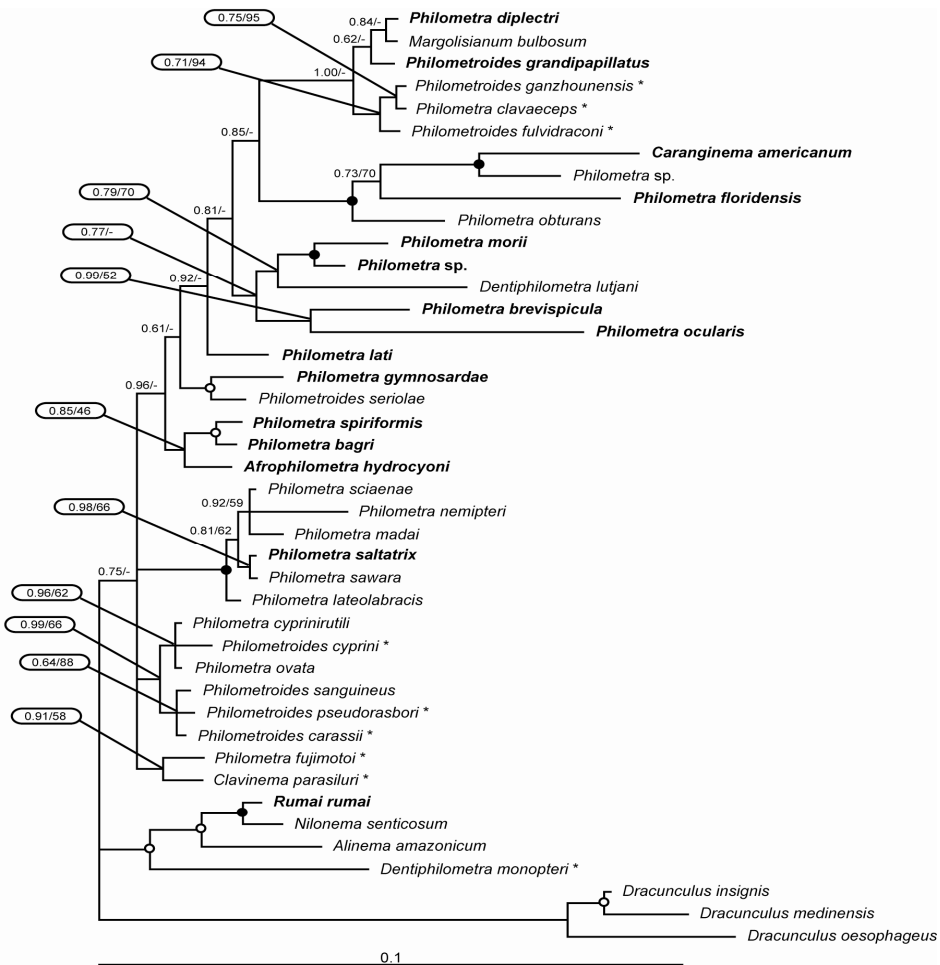




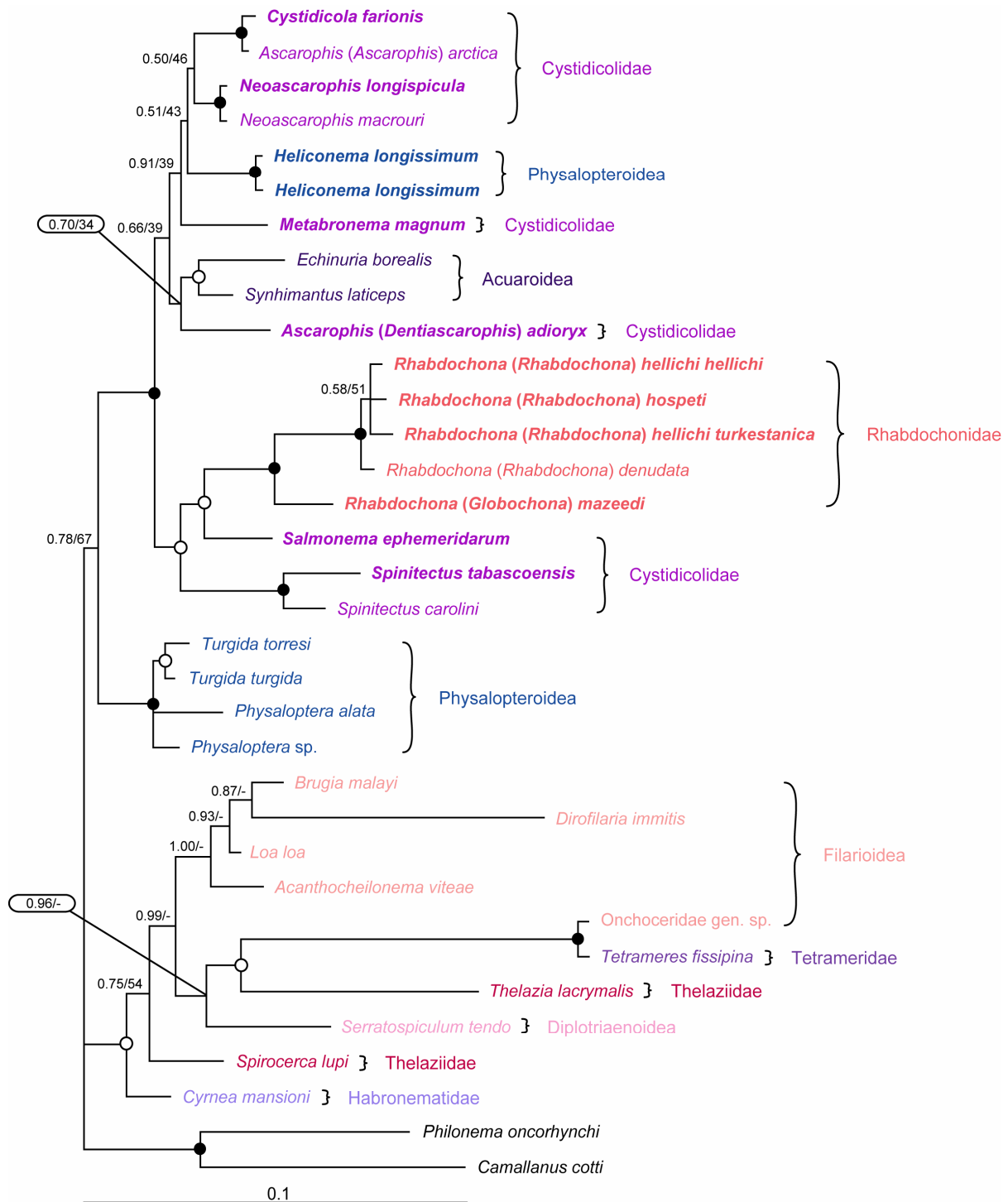
Obr. 6. Phylogenetický strom skupiny Chromadorea sestavený Bayesiánskou inferencí (BI) vypočítaný z 4×10^6 generací. Podpory uzlů udávají posteriorní pravděpodobnost pro 5×10^6 generací (počet odstraněných generací – burn-in = 1×10^6)/hodnoty bootstrapu z analýzy ML (počet opakování 500). Nově získané sekvence jsou označeny tučně. Označení – ukazuje, kde se topologie BI a ML neshodují. Plné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI=1.0 a ML>90. Prázdné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI>80 a ML>70.



Obr. 7. Fylogenetický strom nadčeledi Dracunculoidea sestavený Bayesiánskou inferencí (BI) vypočítaný z 3×10^6 generací. Podpory uzlů posteriorní pravděpodobnost pro 5×10^6 generací (počet odstraněných generací – burn-in = 2×10^6)/hodnoty bootstrapu z analýzy ML (počet opakování 500). Nově získané sekvence jsou označeny tučně. Označení – ukazuje, kde se topologie BI a ML neshodují. Plné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI=1.0 a ML>90. Prázdné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI>80 a ML>70.



Obr. 8. Fylogenetické stromy čeledí Philometridae a Camallanidae sestavené Bayesiánskou inferencí (BI) vypočítané z $3,5 \times 10^6$ a 3×10^6 generací. Podpory uzlů udávají posteriorní pravděpodobnost pro 5×10^6 generací (počet odstraněných generací – burn-in = $1,5 \times 10^6$ a 2×10^6)/hodnoty bootstrapu z analýzy ML (počet opakování 500). Nově získané sekvence jsou označeny tučně. Označení – ukazuje, kde se topologie BI a ML neshodují. Plné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI=1.0 a ML>90. Prázdné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI>80 a ML>70. Hvězdičky označují krátké sekvence.



Obr. 9. Fylogenetický strom podřádu Spirurina Chitwood, 1937 sestavený Bayesiánskou inferencí (BI) vypočítaný z 3×10^6 generací. Podpory uzlů udávají posteriorní pravděpodobnost pro 5×10^6 generací (počet odstraněných generací – burn-in = 2×10^6)/hodnoty bootstrapu z analýzy ML (počet opakování 500). Nově získané sekvence jsou označeny tučně. Označení – ukazuje, kde se topologie BI a ML neshodují. Plné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI=1.0 a ML>90. Prázdné kruhy znázorňují podporu uzlů s BI>80 a ML>70.

5. DISKUSE

Tato práce navazuje na předchozí studie Wijové (Wijová 2004, 2006, Wijová a kol. 2005, 2006), která se zabývala fylogenetickými vztahy drakunkuloidních hlístic v rámci podřádu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002) rovněž na základě srovnání sekvencí genu pro malou ribozomální podjednotku. Mnohé z výsledků této studie podporují její závěry, na druhou stranu ale podstatné rozšíření druhového spektra ukázalo v několika případech na odlišnosti v příbuzenských vztazích některých skupin.

Dosavadní práce zabývající se molekulární fylogenezí hlístic se vyznačují značnou nevyvážeností studovaných vzorků. Zatímco naprostou většinu dosud studovaných hlístic představují skupiny volně žijících druhů a parazitů rostlin, počty osekvenovaných hlístic cizopasících v obratlovcích tvoří jen nepatrnou část (ve skupině označované jako “clade III” v práci Blaxtera a kol. 1998) v recentních molekulárně-fylogenetických studiích, což snižuje jejich použitelnost pro vytváření nových klasifikačních systémů v rámci kmene Nematoda (De Ley a Blaxter 2002, 2004, Holterman a kol. 2006, Nadler a kol. 2007, van Megen a kol. 2009).

Výsledkem této studie je podstatné rozšíření počtu osekvenovaných druhů hlístic cizopasících u obratlovců (převážně ryb), a to celkem o 36 nominálních druhů a poddruhů náležících k 10 čeledím, převážně z nadčeledí Camallanoidea, Dracunculoidea, Habronematoidea a Thelazioidea. Mezi těmito druhy se objevují poprvé zástupci čeledí Daniconematidae (*Mexiconema africanum*) a Quimperidae (*Paraquimperia africana*) a rovněž první druhy dříve nestudovaných rodů *Cystidicola* (*C. farionis*), *Metabronema* (*M. magnum*) a *Salmonema* (*S. ephemeridarum*) z čeledi Cystidicolidae, *Afrophilometra* (*A. hydrocyoni*), *Carangiema* (*C. americanum*) a *Rumai* (*R. rumai*) z čeledi Philometridae a *Esocinema* (*E. bohemicum*) z čeledi Skrjabillanidae. V řadě případů jde o unikátní materiály často teprve nedávno popsanych nových druhů hlístic.

Molekulární fylogenetická analýza na bázi SSU rRNA genů založená na nově získaných sekvencích a sekvencích vybraných druhů z genové banky umožnila nově posoudit řadu příbuzenských vztahů u těchto parazitů. Ze získaných výsledků lze vyvodit, že čeleď Cucullanidae (*Cucullanus baylisi* a *Truttaedacnitis truttae* [= *Cucullanus (Truttaedacnitis) truttae*]) tvoří bazální skupinu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002), jejíž sesterskou skupinou je čeleď Quimperidae (*Paraquimperia africana*). Anderson a kol. (2009) umisťují Cucullanidae a Quimperidae do nadčeledi Seuratoidea, jejíž zástupci se vyznačují některými

archaickými znaky. Podle sovětského systému hlístic jsou tyto skupiny řazeny do podřádu Cucullanata a jsou považovány za mezičlánek mezi Ascaridata a Spirurata (Ivaškin a Chromova 1976). Zástupci Cucullanidae a Quimperiidae cizopasí ve střevě studenokrevných obratlovců (hlavně ryb), ale též obojživelníků a plazů (želv). *Goezia spinulosa* je umístěna na stejné větvi jako *Goezia pelagia*, což potvrzuje zařazení rodu do nadčeledi Ascaridoidea, řádu Ascaridida – podle De Ley a Blaxtera (2004) do čeledi Raphidascarididae (zástupci jsou střevními parazity ryb).

Camallanoidea a Dracunculoidea tvoří monofyletickou skupinu vytvářející dvě zřetelné vývojové linie, což svědčí o vzdálené vzájemné příbuznosti obou skupin. Tyto skupiny mají podobný ontogenetický vývoj – vyznačují se ovoviviparií, mezihostitelem jsou vodní koryši hlavně podřádu Copepoda (buchanky), méně často Branchiura (kapřivci) (Anderson 2000). Pozoruhodným výsledkem, který již naznačili Wijová a kol. (2006), je, že *Philonema* sp. spolu se zástupci čeledí Skrjabillanidae a Daniconematidae tvoří samostatnou skupinu odštěpující se od ostatních Dracunculoidea. Chitwood (1937) zařadil rod *Philonema* do čeledi Philometridae, ale upozornil, že se liší od ostatních rodů mnohojadernými jícnovými žlázami. Ivaškin a kol. (1971) ustanovili samostatnou podčeleď Philoneminae v rámci čeledi Philometridae na základě mnohojaderných jícnových žláz a kónického zadního konce těla. Toto přejímá i Chabaud (1975), avšak později Moravec (2006) přemísťuje rod *Philonema* na základě stavby jícnu a celkové morfologie z čeledi Philometridae do čeledi Micropleuridae, podčeledi Micropleurinae (podčeleď Philoneminae neuznává). Jak však ukazují výsledky molekulárního studia, rody *Philonema* a *Micropleura* tvoří dvě odlišné vývojové linie (Wijová 2006, Wijová a kol. 2006, tato studie), které je možné v systému drakunkuloidních hlístic považovat za dvě odlišné čeledi. K podobným výsledkům dospěl i Nadler a kol. (2007). Je proto možné povýšit podčeleď Philoneminae Ivaškin a kol., 1971 na čeleď Philonemidae a považovat tento taxon za validní.

Velmi důležitým výsledkem je ustanovení fylogenetické pozice rodu *Mexiconema* – jako prvního zástupce čeledi Daniconematidae, která ukazuje, že tyto hlístice patří do stejné vývojové linie jako typičtí zástupci čeledi Skrjabillanidae [*Molnaria* (= *Kalmanmolnaria*) a *Skrjabillanus*], která je umístěna na stejné větvi s čeledí Philonemidae. Naopak zajímavé je postavení rodu *Esocinema*, rovněž ustanoveného v rámci čeledi Skrjabillanidae, který je vzdálenější od typických skrjabilanoidních rodů než *Mexiconema*. Moravec (2006) vyčlenil *Esocinema* do samostatné podčeledi Esocineminae, zatímco nominotypická podčeleď Skrjabillaninae obsahuje rody *Kalmanmolnaria* (syn. *Molnaria*), *Sinoichthyonema* a *Skrjabillanus*. Jde vesměs o tkáňové parazity ryb vyvíjející se přes krevsající kapřivce,

zatímco monofyletická linie Philoneminae má zástupce rovněž cizopasíci ve sladkovodních rybách, ale vývoj probíhá s účastí buchanek.

Z výsledků je patrné, že čeleď Philometridae je monofyletická. Fylogenetické stromy obsahují velký počet molekulárně studovaných druhů (30), z nichž polovina (15) je poprvé uváděna v této práci a zahrnuje i zástupce dříve neuváděných rodů *Afrophilometra*, *Caranginema* a *Rumai*. Zástupci rodů *Philometra* a *Philometroides* jsou parafyletické, což může znamenat, že tyto rody jsou umělé a že neobrážejí skutečné fylogenetické vztahy; nevyskytují se však u linie tvořené rody *Alinema*, *Nilonema*, *Rumai*, vesměs zahrnující druhy vyskytující se výlučně ve sladkovodních rybách Jižní Ameriky (*Alinema*, *Rumai*) nebo Jižní Ameriky a Afriky (*Nilonema*). Na rozdíl od jiných filometer se tyto druhy vyznačují poněkud odlišnou stavbou jícnu a některými specifickými znaky ve stavbě hlavového konce, nebo dokonce přítomností funkční vulvy u *Alinema*, která je u ostatních filometer v dospělosti atrofovaná.

Další linii představují druhy rodů *Philometra* a *Afrophilometra* ze sladkovodních ryb v Africe; přes různou lokalizaci v hostiteli – dutině tělní (*P. lati*), v žaberních obloucích a skřelích (*P. spiriformis*), pod kůží (*P. bagri*) a ploutvích (*A. hydrocyoni*) (Moravec a kol. 2009), a přes fylogeneticky vzdálené hostitele (ryby z řádů Characiformes, Perciformes a Siluriformes) představují tyto hlístice samostatnou vývojovou linii pouze ale v jedné analýze. Ve dvou zbývajících stromech se tato skupina rozpadá. Další skupinu tvoří 3 druhy z evropských sladkovodních ryb čeledi Cyprinidae, z nichž *Philometra cyprinirutili* a *Philometra ovata* jsou cizopasníky dutiny tělní, zatímco *Philometroides sanguineus* je parazit ploutví. Jak již naznačili Wijová a kol. (2006) fylogenetický strom zahrnující zástupce filometer s krátkými sekvencemi ukazuje, že se k této skupině připojují ještě 3 asijské druhy *Philometroides cyprini*, *Philometroides carassii*, *Philometroides pseudorasbori* ze sladkovodních ryb čeledi Cyprinidae. Sesterskou skupinu k nim tvoří dva druhy pocházející také z Asie, *Philometra fujimotoi* ze sladkovodních ryb čeledi Siluriformes a *Clavinema parasiluri* ze sladkovodních ryb čeledi Perciformes.

Skupina tvořená druhy *Philometra lateolabracis*, *P. madai*, *P. nemipteri*, *P. saltatrix*, *P. sawara* a *P. sciaenae* představuje druhy z mořských perciformních ryb, vesměs parazitů gonád, většinou z oblasti Tichého oceánu u Japonska, pouze *P. saltatrix* pochází z východní a západní části Atlantického oceánu u Severní Ameriky a z Evropy (Středozevní moře). Zde jde tedy spíše o stejnou lokalizaci v hostiteli než o geografickou izolaci nebo závislost na typu hostitele, i když další druh rodu *Philometra* z gonád mořských perciformních ryb, *P. floridensis*, je geneticky odlišný a náleží k jiné vývojové linii. Také další dvě hlavní linie jsou

představovány druhy převážně z mořských perciformních ryb, které však cizopasí pod kůží hlavy, v dutině ústní, v ploutvích, ve svalovině a v očních orbitech. Na jedné větvi jsou umístěny druhy *Caranginema americanum* a *Philometra* sp., jejíž sesterskou skupinu tvoří dva druhy *Philometra floridensis* a *P. obturans* (poslední druh z krevního oběhu štik v Evropě). Její sesterská skupina je tvořena druhy *Philometra diplectri*, *Philometroides grandipapillatus* a *Margolisianum bulbosum* (genus et species inquirendae – smíchané druhy *Philometra overstreeti* + *Philometroides paralichthydis* – viz Moravec a de Buron 2006). Všechny tyto druhy se vyskytují v mořských rybách západního Atlantiku. K této skupině se přiřazuje jako sesterská skupina sladkovodních druhů *Philometra clavaiceps*, *Philometroides fulvidraconi* a *P. ganzhounensis* (= *Philometroides pseudaspiei*), vesměs parazitů sladkovodních ryb východní a střední Asie (ruský Dálný Východ, Čína, Mongolsko). Zatímco první druh cizopasí v dutině tělní ryb, oba zbývající v jejich podkožních tkáních. Druhá linie je představována druhy *Philometra morii* a *Philometra* sp. (obě formy představují dva morfologicky blízce příbuzné druhy cizopasí v rybách čeledi Serranidae) a fylogeneticky poněkud vzdálenějším druhem *Dentiphilometra lutjani*, a sesterskou skupinou tvořenou *Philometra brevispicula* a *Philometra ocellaris*. Všechny tyto druhy s výjimkou posledního jsou rozšířeny v oblasti západního Atlantiku (Mexický záliv a Karibské moře), zatímco *P. ocellaris* v Pacifiku (Japonsko, Nová Kaledonie).

Zbývající skupinu tvoří dva druhy, oba z mořských perciformních ryb čeledi Scombridae, z nichž *Philometra gymnosardae* je parazitem dutiny tělní tuňáků v Indickém oceánu (Maledivy), zatímco *Philometroides seriolae* cizopasí ve svalovině ryb rodu *Seriola* v Tichém oceánu (Japonsko). I když v tomto případě by snad mohlo jít o speciaci těchto parazitů v závislosti na hostitelích a jejich geografické izolaci, vzhledem k malému počtu studovaných druhů je spíše pravděpodobné, že jde o náhodnou příbuznost hostitelů těchto hlístic. Je pozoruhodné, že čeleď Philometridae tvoří s čeledí Dracunculidae a Micropleuridae monofyletickou skupinu. Podle fylogenetického stromu a podle typu hostitelů recentních zástupců těchto čeledí (viz Moravec 2006) lze usuzovat, že jako první se od linie vedoucí k Philometridae (vesměs parazitů ryb) odštěpila čeleď Micropleuridae (paraziti žraloků, obojživelníků a plazů, hlavně krokodýlů) a teprve později čeleď Dracunculidae (paraziti teplokrevných obratlovců – ptáků a savců).

Nadčeleď Camallanoidea (s jedinou čeledí Camallanidae) je monofyletická a tvoří sesterskou skupinu k Dracunculoidea. Zatímco všechny sladkovodní druhy rodu *Camallanus* tvoří jednu vývojovou linii, *Camallanus carangis* z mořských ryb ukazuje na příbuznost k jiné linii vedoucí ke sladkovodním a mořským formám rodu *Procamallanus*. Vzhledem

k tomu, že zástupci rodu *Procamallanus* (včetně podrodů *Procamallanus* a *Spirocamallanus*) se objevují v různých vývojových liniích, představovaných druhy z mořských i sladkovodních ryb různých kontinentů, lze předpokládat, že tyto rody, tj. *Camallanus* a *Procamallanus* jsou umělé a neobrážejí příbuzenské vztahy. Překvapující je také odlišné umístění hlístic *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *rarus* pocházejících ze dvou různých hostitelů z Peru. V daném případě může jít o chybnou determinaci jedinců jiného druhu.

Jak podle současného systému hlístic založeného na morfologii (Gibbons 2010), tak i podle molekulárního systému (De Ley a Blaxter 2004) patří námi studované spirurinní hlístice ke třem čeledím: Cystidicolidae (Habronematoidea), Rhabdochonidae (Thelazioidea) a Physalopteridae (Physalopteroidea). Nadler a kol. (2007) však vyčleňují pro Cystidicolidae novou nadčeleď Spiruroidea. Z fylogenetického stromu ale vyplývá, že i když zástupci těchto tří čeledí z ryb jsou umístěni na jedné větvi, další představitelé stejných nadčeledí z ptáků a savců se vyskytují v jiných vývojových liniích, a jsou tudíž parafyletičtí. Je tedy zřejmé, že nadčeledi Habronematoidea, Thelazioidea a Physalopteroidea i dále jmenovaná Spiruroidea jsou umělé taxony, které neodpovídají příbuzenským vztahům. Podle morfologického systému jsou rybí zástupci dosavadní čeledi Physalopteridae řazeni do podčeledi Proleptinae (Moravec a kol. 2007, Anderson a kol. 2009); v budoucnu bude nutné zřejmě tuto podčeleď povýšit na samostatnou čeleď, zatímco další existence nadčeledi Physalopteroidea je zatím nejasná.

Z výsledků analýzy vyplývá, že Proleptinae patří do stejného klastru s Cystidicolidae a Rhabdochonidae z ryb, ale i s Acuarioidea z ptáků. Fylogenetický strom dokládá, že rybí druhy čeledi Cystidicolidae a Rhabdochonidae se vyskytují ve dvou zřetelných liniích, z nichž Rhabdochonidae (*Rhabdochona*) je monofyletická a vyskytuje se jen u jedné z nich, v níž však nalezneme rovněž 3 zástupce rodů (*Salmonema* a *Spinitectus*) řazených doposud k čeledi Cystidicolidae. K této větvi tvoří sesterskou skupinu převážně zástupci Cystidicolidae spolu se zástupci Acuarioidea a rybími Physalopteroidea. Pozoruhodná je vzájemná vzdálenost druhů *Ascarophis arctica* a *Ascarophis adioryx*, a umístění *Metabronema magnum*. Zatímco *Metabronema* a *Cystidicola* zahrnují parazity plovacího měchýře ryb, zástupci *Ascarophis* a *Neoscarophis* jsou parazity zažívacího traktu (žaludku). Zajímavé je i umístění druhu *Salmonema ephemeridarum*, sladkovodního parazita lososovitých ryb, jehož morfologie i biologie se velmi podobá mořským druhům rodu *Ascarophis*. Ve druhé linii pozorujeme výrazné oddělení druhu *Rhabdochona mazeedi* od ostatních studovaných zástupců tohoto rodu, což zřejmě obráží skutečnost, že tento druh náleží k podrodu *Globochona* Moravec, 1975, zatímco ostatní k nominotypickému podrodu *Rhabdochona*. Tato pozice zástupce

podrodu *Globochona* naznačuje, že by tento taxon měl být povýšen na rod. Fylogenetický strom rovněž ukazuje na genetickou odlišnost populací *Rhabdochona hellichi* z evropských palem a z ryb rodu *Schizothorax* z orientální oblasti; obě populace jsou nyní považovány za samostatné poddruhy *R. hellichi hellichi* a *R. hellichi turkestanica* (viz Moravec a kol. 2010), ale mohly by ve skutečnosti představovat samostatné druhy.

V uvedených fylogenetických stromech se nachází větve s nízkou podporou v jedné či obou analýzách, v několika případech se topologie navzájem liší nebo dokonce dochází ke vzniku polytomie. Možným řešením tohoto problému by bylo zahrnutí dalších variabilnějších genů (např. LSU, ITS1 a ITS2) do analýz, které by mohly přinést fylogeneticky relevantní informaci.

6. ZÁVĚRY

1. Byly získány částečné sekvence SSU rDNA 38 zástupců hlístic řádu Ascaridida, čeledí Anisakidae, Cucullanidae a Quimperiidae a řádu Spirurida, čeledí Camallanidae, Cystidicolidae, Daniconematidae, Philometridae, Physalopteridae, Rhabdochonidae a Skrjabillanidae.
2. Výsledky této studie podporují umístění čeledi Cucullanidae na bázi podřádu Spirurina podle De Ley a Blaxtera (2002), které již bylo naznačeno van Megenem a kol. (2009).
3. Získaná data dokládají parafylii čeledi Philometridae, a to na základě postavení rodu *Philonema* (podčeď Philoneminae), který tvoří sesterskou skupinu k čeledi Skrjabillanidae. Z tohoto důvodu by bylo vhodné podčeď povýšit na čeď Philonemidae.
4. Dalším taxonem, jehož zařazení nemusí odpovídat skutečným příbuzenským vztahům, je *Esocinema bohemicum*. Tento druh je dosud řazen na základě celkové morfologie do čeledi Skrjabillanidae podčeďi Esocineminae, avšak molekulární data naznačují, že podčeď Esocineminae by měla být povýšena na samostatnou čeď Esocinemidae, nebo případně čeď Daniconematidae (*Mexiconema africanum*) převedena do čeledi Skrjabillanidae jako podčeď Daniconematinae.
5. Srovnání velkého počtu sekvencí získaných od zástupců čeledi Philometridae podporuje již dříve zmíněnou parafylii rodů *Philometra*, *Philometroides*, *Dentiphilometra* a rovněž validita nově zahrnutých rodů *Afrophilometra* a *Caranginema* není podpořena. Výsledky naznačují, že geografická izolace není příčinou speciace této skupiny parazitů a v minulosti patrně nedošlo ani ke koevoluci s rybími hostiteli. Naopak skupina zahrnující jihoamerické rody *Alinema*, *Nilonema* a *Rumai* je umístěna na samostatné větvi a výrazně se tak odděluje od ostatních zástupců čeledi.
6. Výsledky této práce potvrdily parafylii rodů *Camallanus* a *Procamallanus* čeledi Camallanidae, stejně tak i podrodů *Procamallanus* i *Spirocamallanus*.
7. Molekulární data prokázala parafylii čeledi Physalopteridae a současně odlišné postavení podčeďi Proleptinae (*Heliconema longissimum*) z ryb. Na základě tohoto výsledku by mohla být v budoucnu tato podčeď povýšena na čeď Proleptidae. Parafylie byla zjištěna u čeledi Cystidicolidae a podpořena u nadčeďi Habronematoidea, Thelazioidea, a Filarioidea a čeledi Thelaziidae.

8. Výsledky analýz rovněž dokazují, že rody *Neoascarophis*, *Spinitectus* a *Rhabdochona* jsou monofyletické na rozdíl od parafyletického rodu *Ascarophis*. Dále se podařila potvrdit samostatnost podrodů *Globochona* a *Rhabdochona*, které byly dosud oddělovány pouze na základě morfologických znaků. Tento výsledek také naznačuje, že podrod *Globochona* by měl být povýšen na rod.
9. Tato studie přispívá svými výsledky k vyjasnění vztahů mezi některými čeleděmi a rody uvnitř řádu Ascaridida a zejména řádu Spirurida. Zároveň také dokazuje, že určování druhů nebo rodů a jejich zařazování do příslušných čeledí na základě morfologických znaků nemusí vždy odrazet skutečné příbuzenské vztahy. Pro co nejpřesnější klasifikaci je třeba zkombinovat veškeré dostupné morfologické a biologické údaje s molekulárními daty.
10. Závěrem lze konstatovat, že je třeba získat sekvence variabilnějších genů a pokusit se vyjasnit vztahy uvnitř čeledí Philometridae a Camallanidae, ale i podřádu Spirurina Chitwood, 1937. Dále je nutné pokračovat v získávání sekvencí dalších druhů zejména z dosud molekulárně nestudovaných, morfologicky ustanovených čeledí jako jsou Guyanemidae, Lucionematidae, Tetanonematidae, ale i doplnit sekvence dalších druhů z podčeledi Proleptinae cizopasících u ryb.

7. CITOVANÁ LITERATURA

- Abad et al. 2008: Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26: 909-915.
- Aguinaldo A.M.A., Turbeville J.M., Linford L.M., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A., Lake J.A. 1997: Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387: 489-493.
- Anderson R.C. 1984: The origins of zooparasitic nematodes. *Canadian Journal of Zoology* 62: 317-328.
- Anderson R.C. 2000: Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford (UK), 650 pp.
- Anderson R.C., Chabaud A.G., Willmott S. 2009: Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume. CAB International, Wallingford (UK), 2009, 463 pp.
- Andrássy I. 1976: Evolution as a Basis for the Systematization of Nematodes. Pitman Publishing, London, 287 pp.
- Bauer 1977 O.N., Musselius V.A., Nikolaeva V.M., Strelkov Yu.A. 1977: [Ichthyopathology.] Piščevaja Promyšlennost', Moscow, 431 pp. (rusky)
- Bird A.F., Bird J. 1991: The Structure of Nematodes. 2nd edition. Academic Press, San Diego, California, 316 pp.
- Blaxter M.L. 1998: *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* 282: 2041-2046.
- Blaxter M.L. 2003: Nematoda: Genes, Genomes and the Evolution of Parasitism. *Advances in Parasitology* 54: 102-197.
- Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.P., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. 1998: A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Blaxter M.L., Dorris M., De Ley P. 2000: Patterns and processes in the evolution of animal parasitic nematodes. *Nematology* 2: 43-55.
- Bundy D.A.P. 1997: This wormy world – then and now. *Parasitology Today* 13: 407-408.
- Chabaud A.G. 1974: Class Nematoda. Keys to subclasses, orders and superfamilies. In: R.C. Anderson, A.G. Chabaud, S. Willmott (eds.), CIH Keys to Nematode Parasites of Vertebrates. No. 1. Commonwealth Bureaux, Farnham Royal, Bucks (UK), pp. 6-17.
- Chabaud A.G. 1975: Keys to genera of the order Spirurida. Part 1. Camallanoidea, Dracunculoidea, Gnathostomatoidea, Physalopteroidea, Rictularoidea and

- Thelazioidea. In: R.C. Anderson, A.G. Chabaud, S. Willmott (eds.): CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. No. 3. Commonwealth Bureaux, Farnham Royal, Bucks (UK), 27 pp.
- Chan M.S., Medley G.F., Jamison D., Bundy D.A. 1994: The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology* 109: 373-387.
- Chitwood B.G. 1933: A revised classification of the Nematoda. *Journal of Parasitology* 20: 131.
- Chitwood B.G. 1937: A revised classification of the Nematoda. In: Anonym (ed.), Papers on Helminthology. 30 Year Jubilee K.I. Skrjabin. All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences, Moscow, pp. 67-79.
- Chitwood B.G. 1950: An outline classification of the Nematoda. In: B.G. Chitwood, M.B. Chitwood (eds.), Introduction to Nematology. University Park Press, Baltimore, Maryland, pp. 12-25.
- Chitwood B.G., Chitwood M.B. 1933: The characters of a protonematode. *Journal of Parasitology* 20: 130.
- Conway Morris S. 1981: Parasites and the fossil record. *Parasitology* 82: 485-509.
- Conway Morris S. 1993: The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* 361: 219-225.
- Crompton D.W.T. 1999: How much human helminthiasis is there in the world? *Journal of Parasitology* 85: 397-403.
- De Conick L.A.P. 1965: Systématique des nématodes. In: P.P. Grassé (ed.), Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie. 4th edition. Masson et Cie, Paris, pp. 586-731.
- De Ley P., Blaxter M.L. 2002: Systematic position and phylogeny. In: D.L. Lee (ed.), The Biology of Nematodes. Taylor & Francis, London and New York, pp. 1-30.
- De Ley P., Blaxter M.L. 2004: A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematology Monographs & Perspectives* 2: 633-653.
- de Meeûs T., Renaud F. 2002: Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* 18: 247-251.
- Dieterich Ch., Sommer R.J. 2009: How to become a parasite – lessons from the genomes of nematodes. *Trends in Genetics* 15: 203-209.
- Dorris M., De Ley P., Blaxter M.L. 1999: Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today* 15: 188-193.

- Dunn C.W., Hejnol A., Matur D.Q., Pang K., Browne W.E., Smith S.A., Seaver E., Rouse G.W., Obst M., Edgecombe G.D., Sørensen M.V., Haddock S.H.D., Schmidt-Rhaesa, Okusu A., Kristensen R.M., Wheeler W.C., Martindale M.Q., Giribet G. 2008: Broad phylogenomic sampling improves resolution of animal tree of life. *Nature* 452: 745-749.
- Ghedini E. et al. 2007: Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317: 1756-1760.
- Gibbons L.M. 2010: Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Supplementary Volume. CABI, Wallingford, 416 pp.
- Guindon S., Gascuel O. 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Hall T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series 41*: 95-98.
- Holterman M., Van Den Wurf A., Van Den Elsen S., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. 2006: Phylum wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1798-1800.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P. 2001: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Hyman L.H. 1951: The invertebrates: Acanthocephala, Aschelminthes, and Entoprocta. McGraw-Hill Book Company, New York, 572 pp.
- Ivaškin V. M., Chromova L.A. 1976: [Cucullanata and Gnathostomata of Animals and Man and the Diseases Caused by Them. Essentials of Nematodology 27.], Nauka, Moskva, 436 pp. (rusky)
- Ivaškin V.M., Sobolev A.A., Chromova L.A. 1971: [Camallanata of Animals and Man and the Diseases Caused by Them. Essentials of Nematodology 22.], Nauka, Moskva, 388 pp. (rusky)
- Katoh K., Toh M. 2005: MAAFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 191-197
- Kinkelin P., Gerard J.P., Tuffery G. 1973: Pathologie des poissons d'eau douce. II. Causes infectieuses: les maladies – leur traitement. *Informations Techniques des Services Vétérinaires* 43/44, pp. 411-423.
- Lambshhead P.J.D. 1993: Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis* 19: 5-24.

- Lambshhead P.J.D., Brown C.J., Ferrero T., Mitchell N., Hawkins L.E., Smith C.R. 2003: Biodiversity of nematode assemblages from the Clarion-Clipperton Fracture Zone, an area of commercial mining interest. *BMC Ecology* 3: 1.
- Lee D.L. 2002: Cuticle, moulting and exsheathment. In: D.L. Lee (ed.), *The Biology of Nematodes*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 171-209.
- Lorenzen S. 1981: Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden. *Feröffentlichungen des Institut für Meeresforschungen Bremerhaven*, Supplement 7, 472 pp.
- Lukeš J., Horák A., Scholz T. 2005: Helminth genome projects: all or nothing. *Trends in Parasitology* 21: 265-266.
- Maggenti A.R. 1963: Comparative morphology in nemic phylogeny. In: E.C. Dougherty (ed.), *The Lower Metazoa, Comparative Biology and Phylogeny*. University of California Press, Berkeley, pp. 273-282.
- Meldal B.H.M., Debenham N.J., De Ley P., De Ley I.T., Vanfleteren J.R., Vierstraete A.R., Bert W., Borgonie G., Moens T., Tyler P.A., Austen M.C., Blaxter M.L., Rogers A.D., Lambshhead P.J.D. 2007: An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 622-636.
- Mitreva M., Blaxter M.L., Bird D.L., McCarter J.P. 2005: Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics* 21: 573-581.
- Moravec F. 1994: *Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe*. Academia and Kluwer Academic Publishers, Prague and Dordrecht, Boston, London, 473 pp.
- Moravec F. 2004a: *Metazoan Parasites of Salmonid Fishes of Europe*. Academia, Prague, 510 pp.
- Moravec F. 2004b: Some aspects of the taxonomy and biology of dracunculoid nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitologica* 51: 1-13.
- Moravec F. 2006: *Dracunculoid and Anguillicoloid Nematodes Parasitic in Vertebrates*. Academia, Prague, 634 pp.
- Moravec F. 2007: Some aspects of the taxonomy and biology of adult spirurine nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitologica* 54: 239-257.
- Moravec F., Charo-Karisa H., Jirků M. 2009: Philometrids (Nematoda: Philometridae) from fishes of Lake Turkana, Kenya, including two new species of *Philometra* and erection of *Afrophilometra* gen. n. *Folia Parasitologica* 56: 41-54.

- Moravec F., de Buron I. 2006: Two new species of philometrid nematodes (Nematoda: Philometridae) from the southern flounder *Paralichthys lethostigma* in the estuaries of South Carolina, USA. *Folia Parasitologica* 53: 139-146.
- Moravec F., Glamuzina B., Marino G., Merella P., Di Cave D. 2003: Occurrence of *Philometra lateolabracis* (Nematoda: Philometridae) in the gonads of marine perciform fishes in the Mediterranean region. *Diseases of Aquatic Organisms* 53: 267-269.
- Moravec F. Molnár K. Székely C. 1998: *Lucionema balatonense* gen. et sp. n., a new nematode of a new family Lucionematidae fam. n. (Dracunculoidea) from the swimbladder of the European pikeperch, *Stizostedion lucioperca* (Pisces). *Folia Parasitologica* 45: 56-61.
- Moravec F. Taraschewski H., Anantaphruti M.T., Maipanich W., Laoprasert T. 2007: *Heliconema longissimum* (Ortlepp, 1923) (Nematoda: Physalopteridae) in Thailand, with remarks on the taxonomy of the Proleptinae Schulz, 1927. *Systematic Parasitology* 66: 73-80.
- Moravec F., Scholz T., Ash A., Kar P.K. 2010: New data on the morphology and taxonomy of three species of *Rhabdochona* (Nematoda: Rhabdochonidae) parasitizing fishes in India. *Folia Parasitologica* – v tisku.
- Munn E.A., Munn A.D. 2002: Feeding and digestion. In: D.L. Lee (ed.), *The Biology of Nematodes*. Taylor & Francis, London and New York, 211-232.
- Nadler S.A., Carreno R.A., Mejía-Madrid H., Ullberg J., Pagan C., Houston R., Hugot J.-P. 2007: Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology* 134: 1421-1442.
- Opperman C.H. et al. 2008: Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: a compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14802-14807.
- Page R.D.M. 1996: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Application in the Biosciences* 12: 357-358.
- Page A.P., Johnstone I.L. 2007: The cutitule (March 19, 2007). Wormbook, the online review of *C. elegans* biology. Wormbase.net/chapters/www_cuticle/cuticle.html
- Platonova T.A., Gal'tsova V.V. 1976: *Nematodes and their Role in Meiobenthos*. Nauka, Leningrad. Publication translated from Russian for the Smithsonian Institute Library and the National Science Foundation, Washington, D.C. Amerind Publishing Co., New Delhi, 1985, 366 pp.

- Platt H.M. 1994: Foreword. In: S. Lorenzen (ed.), *The Phylogenetic Systematics of Freelifving Nematodes*. The Ray Society, London, pp. i-ii.
- Posada D., Crandal K.A. 1998: Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Potts F.A. 1932: Chapter VII: The phylum Nematoda. In: Borradaile L.A. et al., *The Invertebrata. A Manual for the Use of Students*. Cambridge University Press, New York, pp. 214-227.
- Prichard R. 1994: Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 54: 529-268.
- Ramachandran P. 1975: *Philometra cephalus* sp. n. infecting the gonads of the striped mullet, *Mugil cephalus* L. from the Arabian coast of Kerala, India, with a note on its pathology. *Zoologischer Anzeiger* 194: 140-144.
- Rudolphi C.A. 1808: Entozoorum Sive Vermium Intestinalium. *Historia Naturalis*, Vol. 1. Amstelaedami, 527 pp.
- Sakaguchi S., Yamagata Y., Gogo M. 1987: Reidentification of *Philometra* parasitic in red sea bream. *Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture* 12: 69-72. (japonsky, anglický souhrn)
- Sambrook J., Russell D.W. 2001: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stein L.D. et al. 2003: The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS. Biology* 1: E45
- The *C. elegans* genome Sequencing Consortium. 1998: Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.
- The *C. elegans* genome Sequencing Consortium. 1999: How the worm was won. *Trends in Genetics* 15: 51-58.
- van Megen H., van den Elsen S., Holterman M., Karssen G., Mooyman P., Bongers T., Holovachov O., Bakker J., Helder J. 2009: A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11: 927-950.
- Wijová M. 2004: Molekulární fylogeneze na bázi SSU rRNA genů u drakunkuloidních hlístic. Bakalářská práce, Biologická fakulta JU, České Budějovice, 20 pp.
- Wijová M. 2006: Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences. Magisterská práce, Biologická fakulta JU, České Budějovice, 26 pp.

- Wijová M., Moravec F., Horák F., Lukeš J. 2006: Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences. *International Journal for Parasitology* 36: 1067-1075.
- Wijová M., Moravec F., Horák A., Modrý D., Lukeš J. 2005: Phylogenetic position of *Dracunculus medinensis* and some related nematodes inferred from 18S rRNA. *Parasitology Research* 96: 133-135.
- Yamaguti S. 1961: Nematodes of Vertebrates. Systema Helminthum 3. Interscience Publishers, New York – London, 1261 pp.