

**Faculty of Science
University of South Bohemia
in České Budějovice**



MSc Thesis

**Phylogenetic relationships of small intestinal flukes (Digenea:
Heterophyidae), with emphasis on the taxonomy of the
Ascocotyle complex**

Dagmar Jirsová

Supervisors: Prof. RNDr. Tomáš Scholz, CSc.
RNDr. Jan Brabec

České Budějovice, April 2009

Magisterská práce

Jirsová D., 2009. Fylogenetické vztahy malých střevních motolic čeledi Heterophyidae se zaměřením na taxonomii komplexu rodu *Ascocotyle*. [Phylogenetic relationships of small intestinal flukes (Digenea: Heterophyidae), with emphasis on the taxonomy of the *Ascocotyle* complex]. MSc Thesis, in Czech. Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic, 39 pp.

Annotation

Phylogenetic relationships of trematodes of the family Heterophyidae were examined using sequences of complete ITS2 and partial (D1-D3 region) LSU rDNA. The results indicate possible paraphyly of the family Heterophyidae because two heterophyid species, *Psedexorchis major* and *Cryptocotyle lingua*, appeared among families Cryptogonimidea nad Opisthorchiidae. The genus *Ascocotyle* appears paraphyletic because *Pygidiopsis macrostoma* forms a sister clade with members of the subgenus *Ascocotyle*. Molecular data indicate necessity of some taxonomic changes but are in general congruence with the current classification of the superfamily opisthorchioidea.

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

V Českých Budějovicích, 29. dubna, 2009

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi s touto prací pomohli. Především svému školiteli Tomáši Scholzovi, který to se mnou neměl vůbec jednoduché. Další z mnoha díků patří Brabčákovi, bez něj bych tuto práci asi nezvládla dokončit. Děkuji všem členům Laboratoře molekulární taxonomie a to především Miroslavu Oborníkovi za odborný dohled a vedení. A všem, kteří mě celou dobu podporovali a věřili, že jednou odevzdám.

Obsah

1. ÚVOD	1
1.1. Trematoda – Digenea (motolice).....	1
1.2. Taxonomie motolic.....	3
1.3. Čeleď Heterophyidae Leiper, 1909.....	4
1.4. Rod <i>Ascocotyle</i> Looss, 1899.....	6
2. CÍLE PRÁCE	9
3. MATERIÁL A METODIKA	11
3.1. Materiál.....	11
3.2. Metodika	13
3.2.1. Izolace DNA.....	13
3.2.2. PCR amplifikace.....	14
3.2.3. Klonování amplifikovaných PCR produktů.....	15
3.2.4. Analýza pozitivních klonů.....	15
3.2.5. Restrikční analýza.....	16
3.2.6. Sekvenování.....	16
3.2.7. Analýza sekvencí.....	16
3.2.8. Fylogenetické analýzy.....	18
4. VÝSLEDKY	21
4.1. Analýzy ITS2.....	21
4.2. Analýzy LSU.....	21
4.3. Kombinovaná analýza LSU a ITS2.....	23
4.4. Souhrn analýz.....	23
5. DISKUSE	29
6. ZÁVĚR	33
7. LITERATURA	35

1. ÚVOD

1.1. Trematoda – Digenea (motolice)

Digenea jsou jednou ze skupin velkého kmene Platyhelminthes (Protostomia), jehož součástí je i skupina Neodermata. Hlavním znakem je vznik syncytiálního tegumentu, tzv. neodermis. Neodermis vzniká v průběhu ontogeneze ztrátou původní pokožky (*epidermis*) a vytvořením nového „povrchu“ z náhradních buněk, které jsou ukryté pod buňkami původní *epidermis*. Neodermata zahrnují tři velké skupiny – Cestoda (tasemnice), Monogenea a Trematoda (motolice). Trematoda se dělí na dvě základní skupiny, Aspidogastrea a významnější Digenea, která tvoří jednu z největších skupin parazitů (Campos a kol. 1998, Littlewood a Bray 2001, Olson a kol. 2003).

Digenea (motolice) charakterizují složité vývojové cykly zahrnující u velké části druhů tři hostitele, někdy však dva nebo i čtyři hostitele (Yamaguti 1971, 1975). Tato skupina je výhradně parazitická a vyvinula si řadu unikátních adaptací k parazitismu, např. zmíněný vývojový cyklus, přichytné orgány ve formě svalnatých přísavek nebo asexuální rozmnožování v měkkých tkáních. Její zástupci jsou endoparazity obratlovců včetně člověka (např. čeledi Schistosomatidae, Fasciolidae a Opisthorchiidae). Díky svému patogennímu působení na hostitele se motolice řadí mezi medicínsky a veterinárně významné parazity. Jedná se především o nákazy krevního systému, zažívacího traktu, jater, žlučníku a žlučových cest. Někteří zástupci se ale mohou vyskytovat i v mozku a v srdci (Jíra 1998, Galaktionov a Dobrovolskij 2003).

Rozšíření této skupiny je kosmopolitní, ale v některých částech světa, např. jihovýchodní Asii a Rusku, jsou motolice velmi početnou skupinou. V těchto oblastech dochází k nákaze převážně pozřením nedostatečně upraveného nebo syrového rybího masa (Yamaguti 1971, Ditrich a kol. 1990, Giboda a kol. 1991, King a Scholz 2001, Sohn a Chai 2005, Park a kol. 2007, Thu a kol. 2007).

Většina motolic je vybavena dvěma přísavkami – ústní a břišní, kterými se přichycují v hostiteli. U některých skupin se mohou na ústní přísavce vyvinout další přichycovací orgány; např. zástupci *Ascocotyle* mají trny kolem ústního otvoru (Scholz a kol. 2001). Přísavky se mohou rovněž výrazně pozměnit, např. u zástupců čeledi Heterophyidae, u kterých je přítomný ventrogenitální komplex vzniklý z břišní přísavky.

Až na výjimky (např. Schistosomatidae) jsou Digenea proterandriční hermafroditi. Samčí pohlavní soustavu tvoří dvě varlata (u některé skupiny jich může být více, u zástupců

čeledí Monorchidae a Lissorchiidae pouze jedno), semenný váček, ejakulační kanál, cirus a cirový vak (ten může chybět, např. u čeledi Opisthorchiidae - King a Scholz 2001). Samičí pohlavní orgány se skládají z vaječníku, vejcovodu, ootypu, ookaptu, Mehlisových žlaz, Laurelova kanálu, dělohy (*uteru*) a semenného rezervoáru (*receptaculum seminis*), který slouží k pasážování spermií, oplodňujících dozrávajících vajíčko.

Zažívací ústrojí začíná ústním otvorem, pokračuje svalnatým hltanem ústícím do trubicovitého jícnu a dále do dvou slepě zakončených střevních větví (*caeca*). Potravu mohou také přijímat skrze tegument. Základem vylučovací soustavy jsou plaménkové buňky (cyrtocyty neboli protonefridie), které jsou spojeny vývodnými kanálky a před vyústěním tvoří močový měchýřek, jehož obsah je vyprázdňován pórem do vnějšího prostředí.

Motolice jsou jedinečné svými vývojovými cykly. Prvním mezihostitem bývá zpravidla plž (Mollusca: Gastropoda), druhým mezihostitelem mohou být jak obratlovci, tak bezobratlí; definitivní hostitel je téměř vždy obratlovec (s výjimkou progenetických metacerkárií). Unikátními vývojovými stádii typickými pro Digenea jsou stádia v plžích – sporocysty, redie a cercárie (volně plovoucí stádium). Cercárie se uvolňují z prvního mezihostitele a pronikají do druhého mezihostitele, u některých skupin přímo do definitivního hostitele. Cercárie mají většinou ocásek, který může být opatřen ploutvičkou, tzv. finfold. Ve vývojovém cyklu dochází k pravidelnému střídání pohlavních a nepohlavních generací. Nejprve se oplozené vajíčko uvolní do vodního prostředí, kde se líhne obrvená larvička, miracidium, která si hledá svého prvního mezihostitele a proniká do něj přes pokožku. Už v této fázi se nacházejí různé výjimky, např. u nadčeledi Opisthorchioidea, kdy se plně vyvinuté miracidium uvolňuje z vajíčka až po pozření mezihostitelem (Ditrich a kol. 1997).

Prvním mezihostitelem je většinou plž (Mollusca: Gastropoda) (Ditrich a kol. 1997, Scholz a Aguirre-Macedo 2001). V plžovi se z miracidia stává sporocysta (často je i více než jedna generace sporocyst), ze které se líhnou cercárie. Ve sporocystě mohou také vznikat redie. Cercárie se uvolňují do vody a napadají druhého mezihostitele (Yamaguti 1975), tím může být obratlovec, např. ryba, nebo bezobratlý (Aguirre-Macedo a kol. 2001, Scholz a Aguirre-Macedo 2001). Cercárie ztrácejí ocásek, opouzdřují se (encystují) a vznikají z nich metacercárie, kterými se nakazí definitivní hostitel – obratlovec (Yamaguti 1975). Dochází k dokončení vývojového cyklu a vývoji v dospělé jedince v definitivním hostiteli. Dospělé motolice se nejčastěji vyskytují ve střevech, ale mohou napadat i jiné tkáně a orgány, např. játra, žlučník, žlučovod, močový měchýř, apod. (Jíra 1998).

1.2. Taxonomie motolic

Digenea jsou v rámci plathelminťů monofyletickou skupinou s mnoha autapomorfiemi, např. měkkýši jako první mezihostitel, cercárie, obrvené miracidium, počáteční stádia bez trávicí soustavy, apod. (Caira a Littlewood 2001). Tuto hypotézu potvrzují především práce o fylogenetických vztazích v rámci plathelminťů, např. Campos a kol. (1998).

Klasifikace motolic je založena právě na morfologii dospělců a jejich vývojových stádií, nejčastěji cercárií (Yamaguti 1971, 1975, Caira a Littlewood 2001). Jeden z prvních pokusů o posouzení fylogenetických vztahů pomocí metod kladistiky učinil Brooks (1980, 1985). Jeho práce, především výběr morfologických a ontogenetických znaků pro analýzu, však byly kritizovány Pearsonem (1992), který provedl novou kompletní analýzu a zjistil, že skoro 50% použitých znaků je nevhodných (Littlewood a Bray 2001).

S nástupem molekulární taxonomie (přibližně od počátku 90. let) se studie zabývající se problematikou fylogeneze motolic rozdělují na dvě skupiny – analýzy blízké příbuzných taxonů a studie řešící problémy vyšších taxonomických skupin. První práce zabývající se vztahy v rámci nižších taxonomických kategorií digeneí byly založeny na porovnání sekvencí genu pro malou podjednotku (SSU nebo 18S) (např. práce Barker a kol. 1993), později se jako vhodnější ukázala kombinace velké (LSU nebo 28S, zejména D1-D3 region) a malé podjednotky (viz Olson a kol. 2003). Schulenburg a kol. (1999) použili sekvence ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), který je sice nevhodný pro fylogenetické studie na vyšší než rodové úrovni, ale jeho vyšší variabilita se ukázala vhodná pro studie mezidruhových a mezirodových vztahů (viz např. Lee a kol. 2004, Kang a kol. 2007). V současnosti je pro studie na vyšší taxonomické úrovni preferována velká podjednotka (28S) pro svou lepší fylogenetickou informativnost a větší počet konzervativních úseků ve srovnání s malou podjednotkou (18S). Gen pro 28S (rRNA) se nejčastěji využívá v kombinaci s dalšími ribozomálními geny (rRNA). Podle typu studie, např. pro posouzení vztahů velkých skupin, se nejčastěji používá LSU a SSU, zatím co pro posouzení mezidruhových a mezirodových vztahů se osvědčila kombinace 28S a ITS1 nebo ITS2.

V současnosti se Digenea dělí na dva řády, Diplostomida a Plagiorchiida (Olson a kol. 2003 – viz obr. 1). Za bazální skupinu, ze které se pravděpodobně vyvíjely další skupiny Digenea, se považuje řád Diplostomida. Jejich součástí je i nadčeleď Schistosomatoidea, která se dříve považovala za nejbazálnější skupinu (Littlewood a Bray 2001). Dnes je spolu s nadčeleďmi Brachylaimoidea a Diplostomoidea řazena do podřádu Diplostomata (Olson a kol. 2003).

Řád Plagiorchiida se dále dělí na velký počet dobře definovaných bazálních a odvozených skupin (Olson a kol. 2003). U některých skupin však stále není dostatečně podpořená pozice mezi ostatními taxony (Olson a kol. 2003). Čeledi Bucephalidae, Fellodistomatidae a Tandanicolidae tvoří bazální větev celého řádu Plagiorchiida. Naopak nejvíce nestabilními z hlediska postavení ve fylogenetickém stromu jsou čeledi Haplosporididae, Haploporidae, Atractotrematidae a Apocreadiidae, neboť při různém typu analýz se jejich postavení mění (viz obr. 2) (Littlewood a Bray 2001, Olson a kol. 2003).

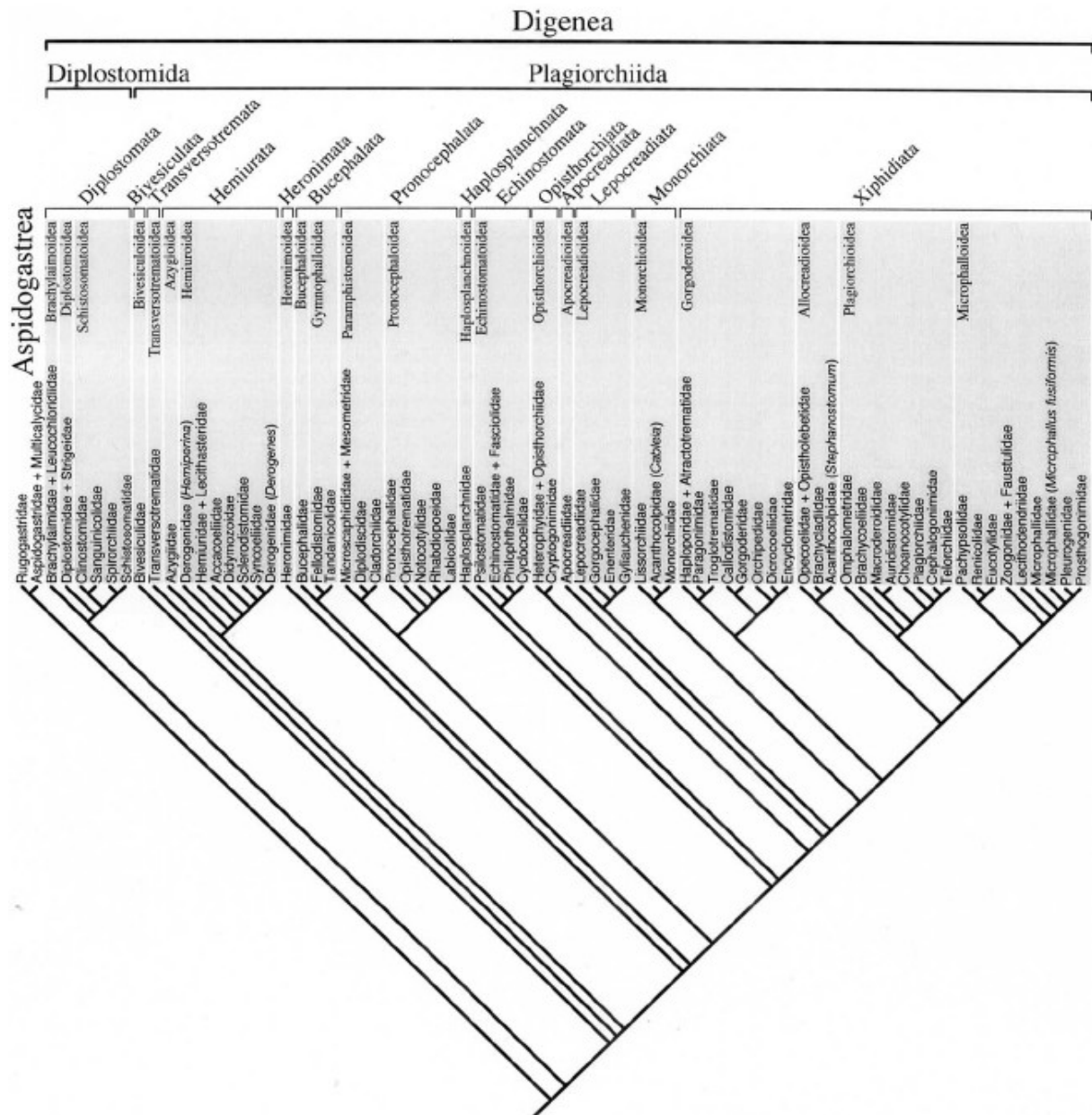
Postavení jednotlivých nadčeledí je poměrně dobře definováno a podpořeno většinou analýz, jak molekulárních, tak morfologických (Littlewood a Bray 2001). Postavení čeledí v těchto skupinách je však odlišné při použití různých genů a analýz jejich sekvencí. Jedním z východisek se zdá být využití molekulárních dat spolu s údaji o morfologii a životních cyklech (Cribb a kol. 2001, Olson a kol. 2003).

1.3. Čeď Heterophyidae Leiper, 1909

Motolice čeledi Heterophyidae jsou součástí nadčeledi Opisthorchioidea zahrnující také čeledi Cryptogonimidae a Opisthorchiidae. Zástupci nadčeledi se vyskytují u ryb, plazů, ptáků a savců včetně člověka a mají stejný typ vývojového cyklu. Operkulované vajíčko je uvolněno do vodního prostředí a obsahuje plně vyvinuté miracidium, které se líhne až po pozření prvním mezihostitelem – plžem (nejčastěji z čeledi Bithyniidae, Hydrobiidae nebo Thiaridae). V plži dochází k vývoji několika generací sporocyst, stádií postrádajících ústa, a následně redií. Redie vytvářejí několik dceřiných generací, které jsou od sebe morfologicky neodlišitelné (La Rue 1951). Cerkárie jsou posledním stádiem v plžovi. Opouštějí ho a aktivně pronikají do druhého mezihostitele, v případě této čeledi ryby (obvykle z čeledi Cyprinidae). Cerkárie jsou vybaveny ocáskem s ploutvičkou, který slouží k pohybu ve vodě. Při vstupu do svého druhého hostitele ztrácí cercárie ocásek a mění se na cystu – metacerkárii, která je často lokalizována ve svalovině ryb. Metacerkárie je posledním larválním stádiem, které čeká v druhém mezihostiteli na pozření definitivním hostitelem – obratlovcem (Cribb a kol. 2001, 2003, King a Scholz 2001).

Dospělci parazitují v tenkém střevě, kde se přichycují mezi střevní klky. Při masivní nákaze dokáží k povrchové nekróze a tvoří se záněty na sliznice. Vajíčka mohou pronikat i do vzdálenějších orgánů, např. mozku, míchy nebo srdce, kde mohou vytvářet granulomatózní léze (Jíra 1998).

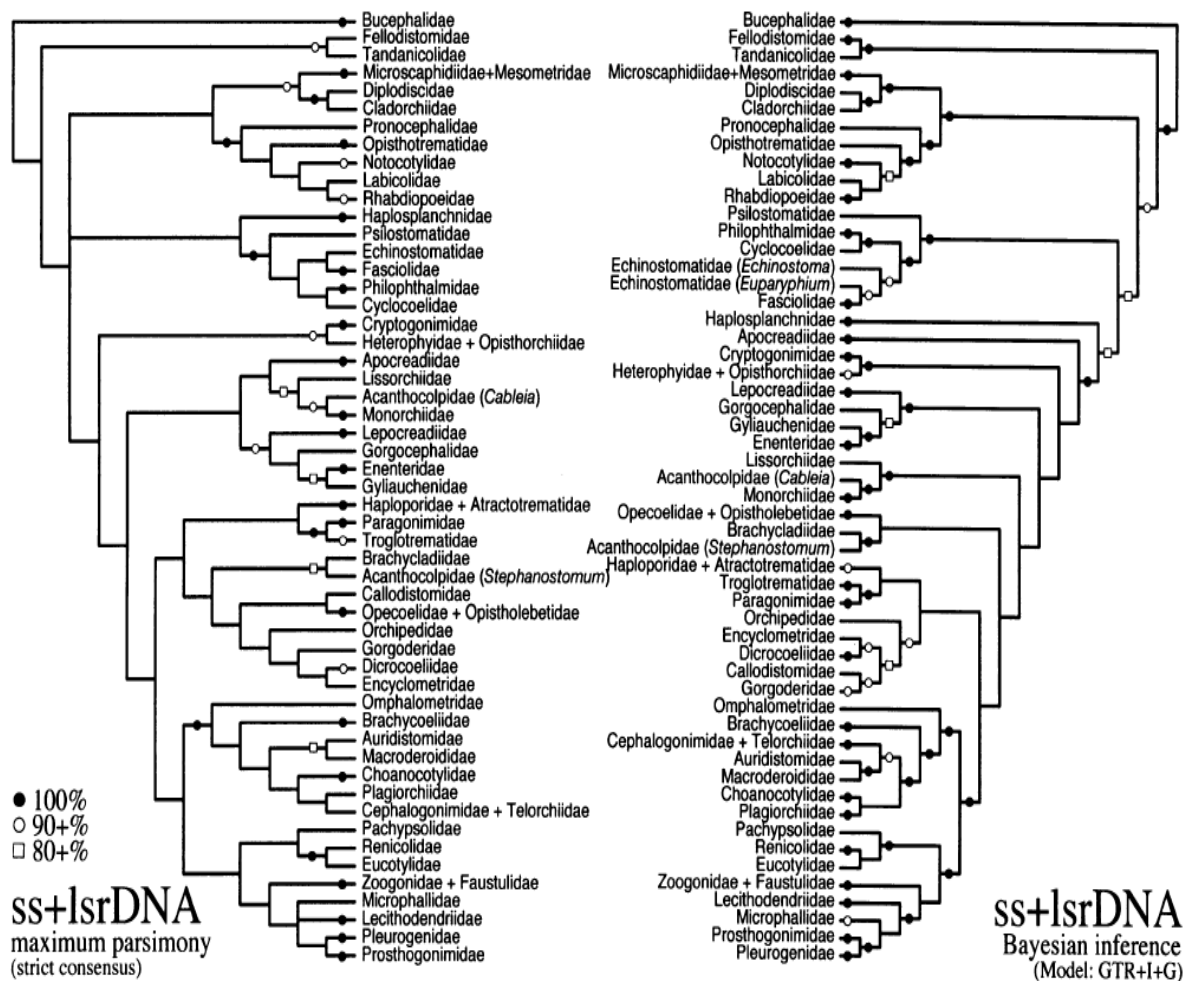
Dospělci mají břišní přísavku přeměněnou v tzv. ventrogenitální komplex s trny a sklerity, jehož součástí je svalnatá struktura zvaná gonotyl. Cirrus ani cirový váček nejsou



Obř. 1. Současná klasifikace motolic založená na molekulárních datech. Výsledný strom získaný kombinací bayesiánské analýzy a kombinované analýzy LSU a SSU (Olson a kol. 2003).

vyvinuty; někteří zástupci této čeledě jsou vybaveni pouze jedním varletem a povrch většiny zástupců je otněný (King a Scholz 2001, Scholz a kol. 2001).

Zástupci této čeledi se u člověka vyskytují nejčastěji v tropech a někdy i v mírném pásu. Čeleď Heterophyidae zahrnuje řadu druhů, jejichž metacerkárie cizopasí u ryb a některé z nich mohou významně poškozovat své hostitele (Ditrich a kol. 1990, Giboda a kol. 1991, Williams a Jones 1994, Jíra 1998, Scholz a kol. 2001, Sohn a Chai 2005, Park a kol. 2007, Thu a kol. 2007).



Obr. 2. Taxonomie řádu Plagiiorchiida založená na molekulárních datech. Porovnání stromů získaných metodami maximální parsimonie a bayesiánské inference (Olson a kol. 2003).

Jedná se o motolice, jejichž taxonomie je obtížná a je založena na morfologických znacích dospělých jedinců a metacerkárií (Scholz a kol. 2001, Pearson 2008). Pozorování taxonomicky významných struktur není snadné kvůli jejich malé velikosti a rychlé autolýze tkání po smrti hostitele. Řada taxonů je z tohoto důvodu popsána nedostatečně. Jedním z nejpoužívanějších genů pro molekulární taxonomii se stal gen pro rRNA (28S). Ale i přes využití tohoto genu v molekulární taxonomii zůstávají četné nevyřešené problémy v této čeledi (Lee a kol. 2004).

1.4. Rod *Ascocotyle* Looss, 1899

Komplex rodu *Ascocotyle* Looss, 1899 (čeleď Heterophyidae) zahrnuje řadu malých druhů motolic parazitujících převážně u rybožravých ptáků a savců. Metacerkárie cizopasí u ryb a někteří zástupci mohou poškozovat své hostitele (Williams a Jones 1994, Scholz a Salgado-Maldonado 2000). Hlavními morfologickými znaky jsou tegument pokrytý trny,

ústní přísavka s několika řadami circumorálních trnů – počet řad je druhově specifický, semenný rezervoár (*receptaculum seminis*) tvaru písmene J a dorzálně umístěný svalnatý výběžek ústní přísavky (*posterior appendage*) (Pearson 2008).

Rod *Ascocotyle* ustanovil Looss (1899) a typovým druhem tohoto rodu navrhl motolici *Distomum coleostomum*, který byl před tím zařazen do rodu *Anoiktostoma* Strossich, 1899. Následně byly popsány další druhy a zařazeny do rodu *Ascocotyle*, např. *A. minuta* Looss, 1899, *A. italica* Alessandrini, 1906, *A. angrense* Travassos, 1916, *A. nana* Price, 1935 a *A. longa* Ransom, 1920. S rostoucím počtem popisovaných druhů byli i noví zástupci postupně zařazováni i do nově ustanovených podrodů, z nichž některé byly původně navrženy jako rody. Jako první byl popsán rod *Phagicola* Faust, 1920 s typovým druhem zástupcem *Phagicola pithecofagicola* Faust, 1920. Dalším ustanoveným podrodem byl podrod *Parascocotyle* Strunkard a Haviland, 1924 s typovým zástupcem *Ascocotyle minuta* Looss, 1899. Později byl tento podrod synonymizován s podrodem *Phagicola* Travassosem (1930) (viz Sogandares-Bernal a Lumsden 1963). Další podrody, které byly postupně ustanovovány, jako např. *Metascocotyle* Ciurea, 1933, byly později také synonymizovány a to nejčastěji s podrodem *Ascocotyle* nebo *Phagicola* (Sogandares-Bernal a Lumsden, 1963). Jako poslední podrod byl ustanoven *Leighia* Sogandares-Bernal a Lumsden, 1963. V současné době se tedy rod *Ascocotyle* skládá ze tří podrodů *Ascocotyle* Travassos, 1930, *Phagicola* Faust, 1920 a *Leighia* Sogandares-Bernal a Lumsden, 1963. Dospělci z těchto podrodů se od sebe liší počtem řad límců cirkumorálních trnů, postavení vitelárií a rozsahem klíček dělohy (Burton 1958, Sogandares-Bernal a Lumsden, 1963, Scholz a kol. 1997).

Podrod *Ascocotyle* Travassos, 1930, jehož typovým zástupcem je *Ascocotyle coleostomum* Looss, 1899, je charakterizován dvěma kompletními řadami circumorálních trnů, vitelárií sahajícími až k břišní přísavce (*acetabulum*) a dělohou nacházející se v prostoru pod břišní přísavkou. Cerkárie zástupců tohoto podrodu je typu pleurolofocerkárie.

Podrod *Phagicola* Faust, 1920, s typovým zástupcem *Ascocotyle (Phagicola) pithecofagicola* (Faust, 1920), se od ostatních liší přítomností počtu řad circumorálních trnů, který je značně variabilní. Dospělci mohou mít jednu kompletní řadu nebo dvě, kdy je spodní řada nekompletní nebo řady úplně chybí (např. u *Ascocotyle (Phagicola) mollieniscicola* Sogandares-Bernal and Bridgman, 1960). Vitelária u tohoto podrodu sahají k oblasti vaječníku a děloha je převážně v oblasti pod břišní přísavkou. Cerkárie tohoto rodu jsou typu pleurolofocerkárie.

Posledním podrodem rodu *Ascocotyle* je podrod *Leighia* Sogandares-Bernal a Lumsden, 1963. Typový zástupce podrodu je *Ascocotyle (Leighia) mcintoshii*, Price, 1932.

Dospělí zástupci a metacerkárie se vyznačují dvěma řadami circumorálních trnů, vitelárií, která sahají až k břišní přísavce (acetabulu) a dělohou sahající až k hltanu. Cerkárie jsou u tohoto podrodu oftalmogymnocefalního typu (Sogandares-Bernal a Lumsden 1963).

Vývojový cyklus je u zástupců všech podrodů trojhostitelský. Prvním mezihostitelem je plž z čeledi Hydrobiidae, např. u neotropických zástupců (Mexiko) především druh *Pyrgophorus coronatus* (Ditrich a kol. 1997). Jako druhého mezihostitele tyto malé motolice nejčastěji využívají sladkovodní ryby z čeledí Cichlidae a Poeciliidae (Scholz a kol. 1995, Scholz a Vargas-Vázquez 1998, Aguirre-Macedo a kol. 2001). Definitivním hostitelem jsou rybožraví ptáci nebo savci, především kočkovité nebo psovitě šelmy (Pearson 2008).

V minulosti docházelo často k nepřesným popisům a k špatné rodové klasifikaci, což bylo mimo jiné způsobeno malými rozměry motolic. Hlavní otázkou stále zůstává, zda se rod *Ascocotyle* skládá z jednoho rodu s řadou podrodů nebo jde o více rodů, a do jakého rodu (resp. podrodu) zařadit jednotlivé druhy (Sogandares-Bernal a Lumsden 1963). Zatím provedené studie (převážně u druhů získaných na území Mexika, Brazílie a USA) využívají pro taxonomii topografii samičích orgánů (distribuci žlutkových trsů a dělohy) nebo počet řad circumorálních trnů (Scholz a kol. 2001). Taxonomie skupiny není dosud uspokojivě vyřešena, což negativně ovlivňuje možnosti správné diagnostiky metacerkárií z ryb.

2. CÍLE PRÁCE

Cíle této práce jsou následující:

1. Získat sekvence vhodných genů (28S a ITS2) zástupců čeledi Heterophyidae se zaměřením na komplex rodu *Ascocotyle* Looss, 1899.
2. Na základě analýzy získaných sekvencí posoudit fylogenetické vztahy studovaných zástupců a posoudit soulad stávající rodové a druhové klasifikace s výsledky molekulárního studia, s důrazem na systematiku rodového komplexu *Ascocotyle* (podrody *Ascocotyle* Travassos, 1930, *Phagicola* Faust, 1920 a *Leighia* Sogandares-Bernal a Lumsden, 1963).
3. V případě rozdílů mezi tradiční klasifikací založenou na morfologických znacích a fylogenetickými vztahy odvozenými ze srovnání sekvencí studovaných genů navrhnout novou klasifikaci skupiny.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Materiál

Motolice použité k analýze byly získány především během výzkumných cest školitele a od jeho zahraničních spolupracovníků, zejména z Mexika a Japonska. Základem byly sběry školitele během jeho pobytu v Mexiku (zejména poloostrov Yukatán) v letech 2000 – 2007 a materiál poskytnutý dr. Takeshi Shimazuem, korejskými parazitology a dr. Margaritou Ostrowski de Núñez (Argentina). Přehled studovaného materialu je uveden v tabulce 1.

Tabulka č. 1. Materiál použitý k izolaci DNA

(druhy, u nichž se podařilo získat sekvence jsou označeny hvězdičkou).

Sbírkové číslo	Druh/Čeď/Hostitel
D-333	<i>Stunkardiella minima</i> (Stunkard, 1938) (CRYPTOGONIMIDAE: Acanthostominae) – metacerkárie z <i>Rhamdia guatemalensis</i> (Siluriformes), Ixin-há, Tixcacal Quintero, Yukatán, Mexiko, T. Scholz
D-429 *	<i>Tabascotrema verai</i> Lamothe-Argumedo et Pineda-López, 1990 (CRYPTOGONIMIDAE) – metacerkárie z <i>Petenia splendida</i> (Cichlidae), Pantanos de Centla, Tabasco, Mexiko, T. Scholz
D-343	<i>Ascocotyle (Ascotyle) secunda</i> Ostrowski de Núñez, 2001 (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy kuřete metacerkáriemi, Buenos Aires, Argentina, M. Ostrowski de Núñez
D-341	<i>Ascocotyle (Ascotyle) secunda</i> Ostrowski de Núñez, 2001 (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy kuřete metacerkáriemi, Buenos Aires, Argentina, M. Ostrowski de Núñez
D-444 *	<i>Ascocotyle (Ascotyle) tenuicollis</i> (Price, 1935) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z <i>Poecilia velifera</i> (Poeciliidae), Dzonot Cervena, Dzilam, Yukatán, Mexiko, T.Scholz
D-444 *	<i>Ascocotyle (Ascotyle) tenuicollis</i> (Price, 1935) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z <i>Poecilia velifera</i> (Poeciliidae), z laguny Chelém at Chuburná, Mexiko, A. Faltýnková
D-400	<i>Ascocotyle (Leighia) megalcephala</i> (Price, 1932) (HETEROPHYIDAE) – metacerkáriemi z <i>Poecilia velifera</i> (Poeciliidae), Chaamac, Yukatán, Mexiko, T. Scholz
D-351 *	<i>Ascocotyle (Phagicola) ampullacea</i> (Miller a Harkema, 1962) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z kuřat, experimentálně nakaženými metacerkáriemi z <i>Poecilia mexicana</i> (Poeciliidae), Arroyo La Veleta, Los Tuxtlas, Veracruz, Mexiko, T. Scholz
D-349 *	<i>Ascocotyle (Phagicola) diminuta</i> (Stunkard et Haviland, 1924) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie ze žaber <i>Poecilia velifera</i> (Poeciliidae), cenote Chaamac, Celestún, Yukatán, Mexiko, T. Scholz
*	<i>Ascocotyle (Phagicola) nana</i> (Ransom, 1920) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z <i>Cichlasoma urophthalmus</i> (Cichlidae), Dzonot Cervera, Dzilam, Yukatán, Mexiko, T. Scholz

- Ascocotyle (Phagicola) nunezae* (Scholz, Aguirre-Macedo et Vargas-Vázquez, 1997) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Cichlasoma octofasciatum* (Cichlidae), Chaamac, Yucatán, Mexiko, T. Scholz
- * *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Phalloptychus januarius* (Poeciliidae), laguna Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brazílie, T. Scholz
- Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Poecilia velifera* (Poeciliidae), Dzonot Cervera, Dzilam, Yucatán, Mexiko, A. Faltýnková
- D-551 *** *Centrocestus armatus* (Tanabe, 1922) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy kočky metacerkáriemi z žaber, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai
- D-551 *** *Centrocestus armatus* (Tanabe, 1922) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie ze *Zacco temmincki* (Cyprinidae), řeka Takami, Higashiyoshino, oblast Nera, Japonsko, T. Shimazu
- D-298 *** *Galactosomum lacteum* (Jägeskiöld, 1896) (HETEROPHYIDAE) – cysty z *Labrus bergylta* (Labridae) Skotsko, M. O'Connell
- Galactosomum spinetum* (Braun, 1901) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Rhynchops nigra* (Rhynchopidae), Brazílie, H. Sattmann
- D-256** *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy kočky metacerkáriemi, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai
- D-260** *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy křečka metacerkáriemi, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai
- Heterophyes nocens* (Onji and Nishio, 1916) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy kočky metacerkáriemi, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai
- * **Heterophyidae** gen. sp. (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Thorichthys meeki* (Cichlidae), Río Hondo, Juan Sarabia, Mexiko, J. Sarabia
- Heterophopsis continua* (Onji and Nishio, 1916) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy křečka metacerkáriemi, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai
- D-416 *** *Metagonimus hakuensis* Shimazu, 1999 (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Lethenteron reissneri* (Petromyzoidae), řeka Hime, Hakuba, oblast Nagano, Japonsko, T. Shimazu
- D-555 *** *Metagonimus miyatai* Saito, Chai, Kim, Lee et Rim, 1997 (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Phoxinus lagowski steindachneri* (Cyprinidae), řeka Hiroi, Iiyama, oblast Nagano, Japonsko, T. Shimazu
- D-554** *Metagonimus otsurui* Saito et Shimizu, 1968 (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Rhinogobius flumineus* (Gobiidae), řeka Takami, Higashiyoshino, oblast Nara, Japonsko, T. Shimazu
- D-553 *** *Metagonimus takahashii* (Suzuki et Takahashi, 1929) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Carassius auratus* (Cyprinidae), jezero Suwa at Suwa, oblast Nagano, Japonsko, T. Shimazu
- D-422** *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z experimentální nákazy kočky metacerkáriemi, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai
- D-422** *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Plecoglossus altivelis altivelis* (Plecoglossidae), oblast Shizuoka, Japonsko, T. Shimazu
- D-552** *Pseudorchis major* (Hasegawa, 1935) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie ze *Silurus asotus*

(Siluridae), jezero Suwa, oblast Nagano, Japonsko, T. Shimazu

D-552 * *Pseudexorchis major* (Hasegawa, 1935) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie ze *Silurus asotus* (Siluridae), jezero Suwa, oblast Nagano, Japonsko, T. Shimazu

* *Pygidiopsis macrostoma* (Travassos, 1928) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Phalloptychus januarius* (Poeciliids), laguna Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brazílie, T. Scholz

* *Pygidiopsis summa* (Onchi et Nishio, 1916) (HETEROPHYIDAE) – metacerkárie z *Mugil cephalus* (Mugilidae), jezero Hamana, oblast Shizuoka, Japonsko, T. Shimazu

Pygidiopsis summa (Onchi et Nishio, 1916) (HETEROPHYIDAE) – dospělci z kočky, Čína, W.-M. Sohn, J.-Y. Chai, Sung-Tae Hong

* *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) (OPISTHORCHIIDAE) – člověk, Korea, Sung-Tae Hong

D-254 * *Opisthorchis viverrini* (Poirrier, 1886) (OPISTHORCHIIDAE) – člověk, Laos, Chai

3.2. Metodika

3.2.1. Izolace DNA

Materiál použitý k izolaci pocházel buď z dospělých jedinců nebo metacerkárií fixovaných v 96-99% etanolu. Celková DNA byla extrahována pomocí komerčního kitu AquaPure® Genomic DNA Isolation Kit od firmy Biorad dle protokolu výrobce s těmito úpravami. Tkáň zbavená etanolu byla nejprve zhomogenizována v 300 µl Genomic DNA Lysis Solution za pomoci zirkonium-křemičitanových kuliček, který usnadnil rozmělnění metacerkárií nebo menších dospělců. K homogenizátu bylo přidáno 1,5 µl proteinázy K (20 mg/ml) a byl inkubován při teplotě 55°C s občasným protřepáváním po dobu 2-3 hodin. Dále byl postup dodržen přesně podle příloženého manuálu.

U příliš malých vzorků – jednalo se především o metacerkárie – byla použita klasická metoda izolace fenol – chloroformem. Vzorky metacerkárií byly zbaveny ethanolu, zhomogenizovány s malým množstvím zirkonium-křemičitanových kuliček ve 200 µl Genomic DNA Lysis Solution z kitu AquaPure® Genomic DNA Isolation Kit. K homogenizátu byla přidána pronáza E a vše bylo inkubováno 1 hodinu při 55°C. Po inkubaci byly kuličky odstraněny a homogenizát byl smíchán s fenolem v poměru 1 : 1 a protřepáván 10 minut. Celá směs byla centrifugována při 13 000 otáčky/minutu (rpm) 10 minut při teplotě 24°C. Po centrifugaci byla odsáta vrchní fáze obsahující DNA a celý postup promývání byl dvakrát zopakován. Při čtvrtém 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 24°C. Po centrifugaci byla opět odsáta vrchní fáze vzorků a bylo k ní přidáno 2 objemy 96% ethanolu. Vzorky pak byly chlazeny 20 až 30 minut při teplotě -80°C. Po chlazení byly vzorky znovu centrifugovány 10 minut při teplotě 4°C a 13 000 rpm a do směsi byl přidán 1 µl glycerolu. Při centrifugaci s glycerolem se ve vzorcích vytvořily pelety promyté DNA. Pelety byly vysušeny při pokojové teplotě a byly rozpuštěny v 50 µl vody.

3.2.2. PCR amplifikace

Úseky LSU a ITS2 byly amplifikovány pomocí PCR za použití primerů pro LSU (D1-D3 region); forward primer: LSU5 5'-TGAGTCGACCCGCTGAAYTTAAGC-3' (Olson a kol., 2003) a reverse primer navržený pro tuto skupinu motolic: 1500R OPISTO 5'-ACTTGGCACTCACATTCAACGCC-3'. Program pro amplifikaci LSU: denaturace 5 minut při 94°C, následována 29 cykly skládajících se z těchto částí 94°C/50sekund, 55°C/50 sekund, 72°C/2 minuty, a poslední část 72°C/10 minut.

Pro ITS2 byly použity primery podle Škeříková a kol. (2004); forward primer: Proteo1 5'-CGGTGGATCACTCGGCTC-3' a reverse primer: Proteo2 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Použitý program pro amplifikaci viz Škeříková a kol., (2004). PCR reakce obsahovala ve 25 µl: 2 jednotky Taq DNA polymerase (Top-Bio), 10 mM Tris-HCl o pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 125 µM nukleotidů dNTP (Invitex), 500 nM každého PCR primeru a 1 µl DNA.

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 a po proběhnutí byla dobarvována v ethidium bromidu (0.5 µg/ml) po dobu 20 minut (Sambrook and Russell, 2001). Amplifikované úseky požadované velikosti byly z gelu vyříznuty a izolovány kitem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle příloženého manuálu.

U vzorků, u nichž nevznikaly nespecifické produkty, byla provedena pouze purifikace PCR produktu kitem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle příloženého manuálu. Jako další možnost purifikace PCR produktů, u nichž nevznikaly nespecifické úseky, bylo použito enzymatické čištění, které se ale nehodí pro zaklonování PCR produktů. Na každých 15 µl PCR produktu bylo přidáno 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/µl), 1,5 µl Exonuclease I (1U/µl) 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 40 minut při 37°C a

dalších 15 minut při 94°C. Purifikovaný a enzymatický čistý PCR produkt byl použit přímo k sekvenování.

3.2.3. Klonování amplifikovaných PCR produktů

Purifikované PCR produkty byly zaklonovány do vektoru pDrive Cloning Vector s použitím QIAGEN® PCR Cloning Kit (QIAGEN) podle příloženého manuálu. Ligační směs obsahovala 1,1 µl PCR produktu, 0,3 µl pDrive vektoru a 1,6 µl Ligation Master Mix. Celá směs byla důkladně promíchána a inkubována přes noc při 4°C.

E. coli DH5a kompetentní buňky byly pomalu rozmrazeny na ledu. Celkem 30 µl 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 30 sekund a po té vrácena zpět na led na dobu 2 minut. Pak bylo přidáno 250 µl SOC media vytemperovaného na pokojovou teplotu a transformované buňky byly nanесeny na LB agaróзовé plotny obsahující ampicilin (100 µg/ml), 40 µl X-galu (40 mg/ml) a 4 µl IPTG (2%) 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 and Russell 2001).

3.2.4. Analýza pozitivních klonů

Po inkubaci na plotnách narostly bílé a modré kolonie. Několik (3 až 6) bílých kolonií bylo posbíráno. Jako kontrola pro úspěšnost klonování byla provedena PCR z těchto kolonií. Každá reakce obsahovala ve 20 µl: 0,5 jednotky Taq DNA polymerase (Top-Bio), 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 µM nukleotidů dNTP (Invitek), 250 nM každého PCR primeru a 3 µl buněk rozsuspendovaných ve vodě. Amplifikační program se skládal z těchto kroků: denaturace 95°C/10 minut, pak 20krát opakování cyklů 95°C/1 minutu, 54°C/1 minutu, 72°C/1 minutu a poslední krok 72°C/10 minut. Elektroforéza byla použita ke kontrole zda kolonie obsahují zaklonované úseky. Pozitivní kolonie byly umístěny do 3 ml LB media obsahujícího ampicilin (50 µg/ml). LB media s buňkami byla inkubována s třepáním (200 rpm) ve 37°C 12 hodin. Plasmidy DNA byly izolovány QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (QIAGEN) přesně podle instrukcí v manuálu.

3.2.5. Restrikční analýza

Plasmidy byly ještě jednou kontrolovány na přítomnost inzertu restrikční analýzou. Reakce obsahovala 0,5 µl enzymu *EcoR* I (15U/µl), 2 µl × Multi Core Buffer, 3 µl vyizolovaného plasmidu a 14,5 µl bidestilované vody. Reakční směs byla řádně promíchána a inkubována při 37°C 1 hodinu. Za použití elektroforézy byly plasmidy zkontrolovány, zda obsahují DNA inzerty požadované délky.

3.2.6. Sekvenování

Pro správné provedení reakce bylo nutné znát koncentraci PCR produktu. Ta byla vypočítána podle absorbance zjištěné při spektrofotometrii (BioPhotometr Eppendorf). Reakční směs obsahovala 500 nM primeru, 300–390 ng přečištěného PCR produktu a byla doplněna do celkového objemu 16 µl bidestilovanou vodou. Genové fragmenty byly sekvenovány pomocí CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter) nebo ABI PRISM® BIG DYE® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sekvenační reakce a sekvenace byly provedena 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
LSU		
LSU5	GAC KAC CCG CTG AAY TTA AGC A	→
360F OPISTO	CCG CTC AGA GGT AAA CGG GTG GAG	→
400F OPISTO1	GCT GGT GAG TKT KGT TTG RGC TTG G	→
400R OPISTO2	CCA AGC YCA AAC MAM ACT CAC CAG C	←
900F OPISTO1	GTG GTG TTG CGG TAG ACT ATC C	→
900R OPISTO2	GGA TAG TCT ACC GCA ACA CCA C	←
1500R OPISTO	ACT TGG CAC TCA CAT TCA ACG CC	←
ITS 2		
Proteo 1	CGG TGG ATC ACT CGG CTC	→
Proteo 2	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	←

3.2.7. Analýza sekvencí

Při práci s molekulárními daty byly použity programy DNASTAR ver. 5.06 (DNASTAR, Inc.). Program EditSeq sloužil jako textový editor sekvencí; v programu SeqManII byly komplementární sekvence spojeny, upraveny a byla z nich vytvořena konsenzuální sekvence. Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena 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 ver. 6.6.2.6 (Katoh a kol. 2005). Případné úpravy alignmentu byly provedeny v programu BioEdit ver. 7.0.5.2 (Hall 1999).

K nově získaným sekvencím byly přidány sekvence především druhů z čeledi Cryptogonimidae z genové banky. Jako srovnávací skupina (outgroup) byli použiti zástupci z příbuzných čeledí (Apocreadiidae, Dicrocoeliidae, Fasciolidae, Gorgoderidae, Lepocreadiidae) (Olson a kol. 2003) (viz tabulka 3).

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

Druh	GenBank Number	
	LSU	ITS2
čeled' Cryptogonimidae		
<i>Beluesca littlewoodi</i>	EF566867	EF566870
<i>Beluesca longicolla</i>	EF566868	EF566871
<i>Caulanus thomasi</i>	EF428144	EF428141
<i>Cheleliadema marjoriae</i>	EF566866	EF566869
<i>Latuterus maldivensis</i>	EF428146	EF428143
<i>Latuterus tkachi</i>	EF428145	EF428142
<i>Neoparacryptogonimus ovatus</i>	EF116616	EF116631
<i>Retrovarium amplorificium</i>	EF116609	EF116635
<i>Retrovarium brooksi</i>	EF116605	EF116641
<i>Retrovarium exiguiformosum</i>	EF116612	EF116638
<i>Retrovarium formosum</i>	EF116611	EF116637
<i>Retrovarium gardneri</i>	EF116606	EF116640
<i>Retrovarium manteri</i>	EF116604	EF116633
<i>Retrovarium mariae</i>	EF116607	EF116630
<i>Retrovarium planum</i>	EF116614	EF116634
<i>Retrovarium sablae</i>	EF116608	EF116642
<i>Retrovarium snyderi</i>	EF116610	EF116636
<i>Retrovarium valdeparvum</i>	EF116613	EF116639
<i>Siphoderina grunnitus</i>	EU571261	EU571257

<i>Siphoderina hirastricta</i>	EU571260	EU571255
<i>Siphoderina infirma</i>	EU571264	EU571256
<i>Siphoderina jactus</i>	EU571263	EU571253
<i>Siphoderina poulini</i>	EU571267	EU571254
<i>Siphoderina quasispina</i>	EU571265	EU571259
<i>Siphoderina subuterus</i>	EU571266	EU571252
<i>Siphoderina territans</i>	EF116615	EF116632
<i>Siphoderina virga</i>	EU571262	EU571258
čeled' Heterophyidae		
<i>Cryptocotyle lingua</i>	AY222228	-
<i>Galactosomum lacteum</i>	AY222227	-
<i>Haplorchoides</i> sp.	AY222226	-
čeled' Opisthorchiidae		
<i>Amphimerus ovalis</i>	AY116876	-
Srovnávací taxony (outgroups)		
<hr/>		
čeled' Apocreadiidae		
<i>Homalometron synagris</i>	AY222243	-
čeled' Dicrocoeliidae		
<i>Dicrocoelium</i> sp.	AY222261	-
čeled' Fasciolidae		
<i>Fasciola gigantica</i>	AY222245	-
čeled' Gorgoderidae		
<i>Degeneria halosauri</i>	AY222257	-
čeled' Lepocreadiidae		
<i>Preptetos trulla</i>	AY222237	-
<hr/>		

3.2.8. Fylogenetické analýzy

Celkem bylo vytvořeno pět souborů dat (data setů) – pro ITS2, LSU, LSU se srovnávací skupinou (outgroupem), kombinovaný soubor pro ITS2 a LSU a kombinovaný data set ITS2 a LSU se srovnávací skupinou (outgroupem). Všechny data sety byly analyzovány metodou maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood, ML) a Bayesiánské inference (BI).

Evoluční modely nejlépe vystihující zjištěná data byly vybrány na základě Akaike information criterion v programu Modeltest ver. 3.7 (Posada a Crandal 1998). Jako nejvhodnější model pro data set LSU byl vybrán *general-time-reversible* model s gamma distribuovanou rychlostí evoluce jednotlivých míst v alignmentu a započítáním množství neměnných pozic (GTR+ Γ +I), pro ITS2 GTR+ Γ a pro data sety LSU s outgroupem, kombinovaný data set ITS2 a LSU a kombinovaný data set ITS2 a LSU se zástupci z

outgroupu byl vybrán model TVM+ Γ +I. Tento model, ale není v nabídce programu MrBayes ver. 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist, 2001), a tak byl místo něj zvolen složitější model GTR+I+G.

K provedení analýz ML podle vybraných modelů byl použit program PHYML ver. 2.4.4 (Guindon a Gascuel 2003), bootstrapová podpora uzlů ve stromu byla vypočítána ze 100 replikací. K BI byl použit program MrBayes ver. 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist 2001). Posteriorní pravděpodobnosti byly vyhodnoceny z různého počtu generací, který byl zvolen podle typu data setu. Generace prošly čtyřmi nezávislými běhy Markov Chain Monte Carlo (MCMC) s uložením každého stého stromu. Konvergence MCMC byla vyhodnocena programem AWTY (http://king2.scs.fsu.edu/CEBProjects/awty/awty_start.php) a velikost burn-in periody určena dle generace, ve které se posterior probabilities jednotlivých uzlů již výrazně neměnily. K vizualizaci výsledků byl použit program TreeView ver. 1.6.6 (Page, 1996).

4. VÝSLEDKY

4.1. Analýzy ITS2

U analýz pro ITS2 nebylo možné použít srovnávací skupiny (outgroups) kvůli velmi obtížnému srovnávání sekvencí (alignment), proto jsou oba stromy nezakořeněné.

Výsledné stromy z analýz ML a BI jsou si navzájem podobné a i přes malé množství informace, kterou ITS2 obsahuje, výsledky se většinou shodují s analýzou LSU (viz níže – obr. 3, 4, 5). Monofylie čeledi Cryptogonimidae je velmi silně podpořena, stejně jako monofylie rodů *Retrovarium* a *Siphoderina*. Čeledi Heterophyidae a Opisthorchiidae tvoří jednu skupinu, jejíž dělení se ale liší podle použitého typu analýzy.

Druh *Cryptocotyle lingua* z čeledi Heterophyidae při použití BI tvoří sesterskou skupinu druhu *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae), ale v analýze ML tvoří sesterskou skupinu s rodem *Centrocestus*. Podobně je tomu i u motolice *Pseudexorchis major* (Heterophyidae), která je v analýze ML zařazena k čeledi Cryptogonimidae, ale při použití BI tvoří součást čeledí Heterophyidae a Opisthorchiidae (obr. 3).

4.2. Analýzy LSU

Celkem byly provedeny čtyři analýzy pro dva soubory sekvencí velké podjednotky (LSU). První soubor zahrnoval nové sekvence LSU se sekvencemi LSU z čeledi Cryptogonimidae, druhý navíc obsahoval sekvence srovnávací skupiny (outgroupu). Každý data set byl analyzován pomocí metod ML a BI. Získané stromy jsou navzájem prakticky identické neboť postavení zástupců se liší jen nepatrně. V obou analýzách LSU bez srovnávací skupiny je čeleď Opisthorchiidae zařazena dovnitř čeledi Heterophyidae, do jedné skupiny s rodem *Metagonimus*.

Druh *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae) je ve všech analýzách řazen do čeledi Opisthorchiidae a jeho postavení jako sesterského taxonu této čeledi je vždy velmi silně podpořeno (obr. 4). Motolice *Pseudexorchis major*, rovněž řazená do čeledi Heterophyidae (viz Yamaguti 1971, Pearson 2008) je ve většině analýz součástí čeledi Cryptogonimidae. U analýzy metodou BI souboru sekvencí LSU bez srovnávací skupiny však byla tato motolice součástí větve zahrnující zástupce čeledí Heterophyidae a Opisthorchiidae.

Rody *Ascocotyle* a *Pygidiopsis* tvoří monofyletickou skupinu silně podpořenou ve všech analýzách. Rody *Metagonimus* a *Centrocestus* jsou rovněž vždy monofyletické s velmi výraznou podporou větví ve všech analýzách (viz obr. 4).

Tabulka č. 4. Přehled získaných sekvencí.

Druh	LSU	ITS2	Délka sekvencí	
			LSU (báze)	ITS2 (báze)
Čeleď Cryptogonimidae				
<i>Tabascotrema verai</i>	+	+	1463	460
Čeleď Heterophyidae				
<i>Ascocotyle (Ascocotyle) tenuicollis</i> laguna Chelém at Chuburná, Mexiko	+	+	1442	442
<i>Ascocotyle (Ascocotyle) tenuicollis</i> Dzonot Cervena, Dzilam, Yukatán, Mexiko	+	+	1439	488
<i>Ascocotyle (Phagicola) diminuta</i>	+	+	1501	487
<i>Ascocotyle (Phagicola) nana</i>	+	+	1473	494
<i>Ascocotyle (Phagicola) ampullacea</i>	+	+	1409	442
<i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i>	+	+	1439	488
<i>Centrocestus armatus</i> řeka Takami, Higashiyoshino, oblast Nera, Japon- sko	+	+	1435	530
<i>Centrocestus armatus</i> , Skotsko	+	+	1399	490
<i>Cryptocotyle lingua</i>	-	+	-	508
<i>Galactosomum lacteum</i>	+	+	1418	405
Heterophyidae gen. sp.	-	+	-	522
<i>Metagonimus hakuensis</i>	+	+	1400	494
<i>Metagonimus miyatai</i>	-	+	-	477
<i>Metagonimus takahashii</i>	+	+	1347	483
<i>Pseudexorchis major</i>	+	+	1458	486
<i>Pygidiopsis macrostoma</i>	+	+	1483	411
<i>Pygidiopsis summa</i>	+	+	1431	480
Čeleď Opisthorchiidae				
<i>Clonorchis sinensis</i>	+	+	1321	536
<i>Opisthorchis viverrini</i>	+	+	1422	542

4.3. Kombinovaná analýza LSU a ITS2

Pro kombinované analýzy LSU a ITS2 byly použity dva soubory dat – se srovnávací skupinou (outgroupem) a bez ní. Oba soubory byly podrobeny analýzám pomocí ML a BI. Kombinované analýzy přinesly podobné informace o postavení jednotlivých zástupců jako analýzy založené pouze na sekvencích LSU. Stejný výsledek je u motolice *Pseudexorchis major* (Heterophyidae), která pouze při analyzování souboru dat ze sekvencí LSU a ITS2 bez srovnávací skupiny metodou BI tvoří součást čeledi Heterophyidae a Opisthorchiidae. Ve všech zbývajících analýzách tvoří skupinu společně se zástupci čeledi Cryptogonimidae.

Motolice *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae) je všech provedených analýzách řazena k zástupcům čeledi Opisthorchiidae a toto postavení má ve všech stromech velmi silnou podporu.

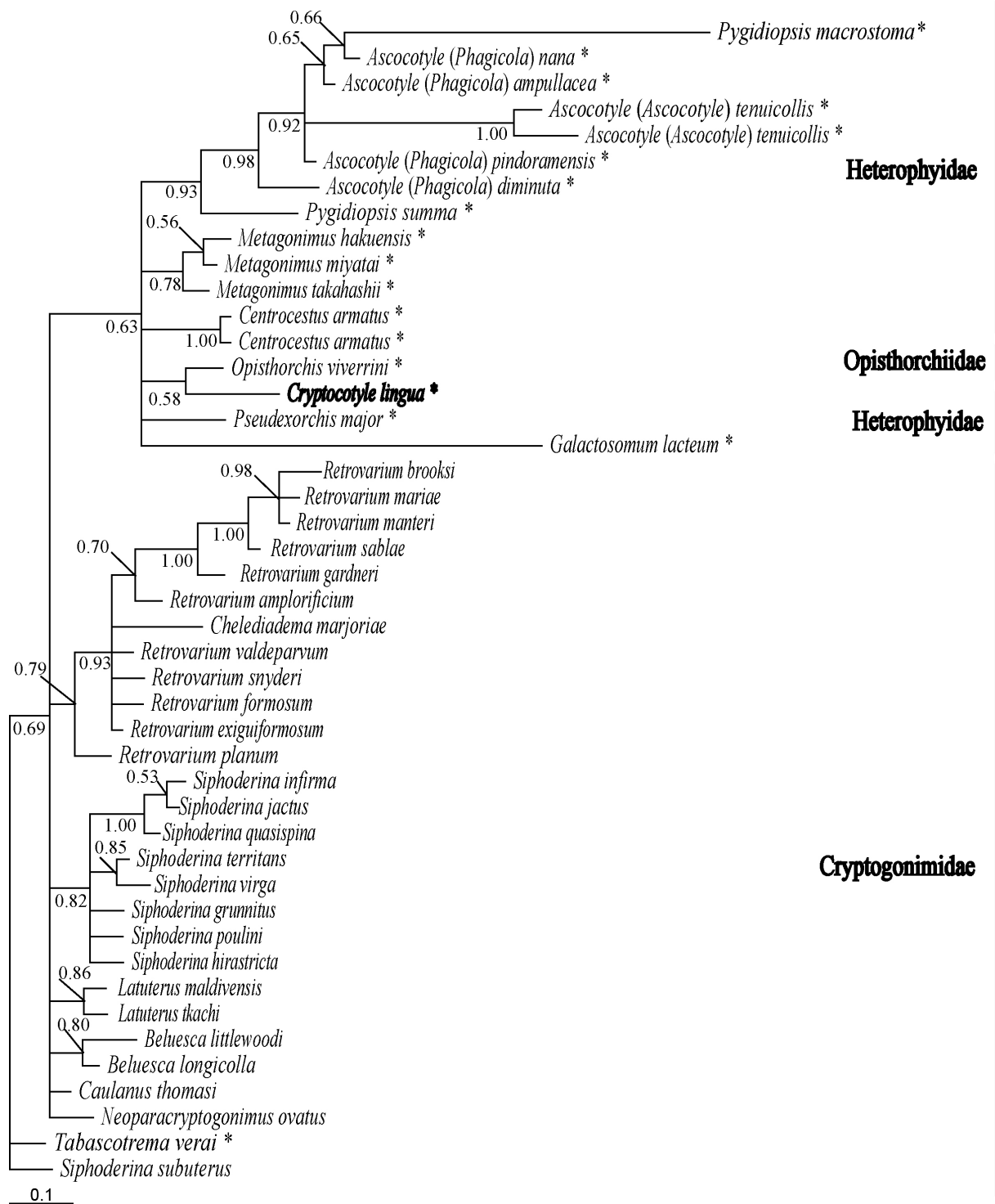
Stejně jako v předchozích stromech tvoří i ve stromech z těchto analýz zástupci rodů *Ascocotyle* a *Pygidiopsis* silně podpořenou monofyletickou skupinu (viz obr. 5).

4.4. Souhrn analýz

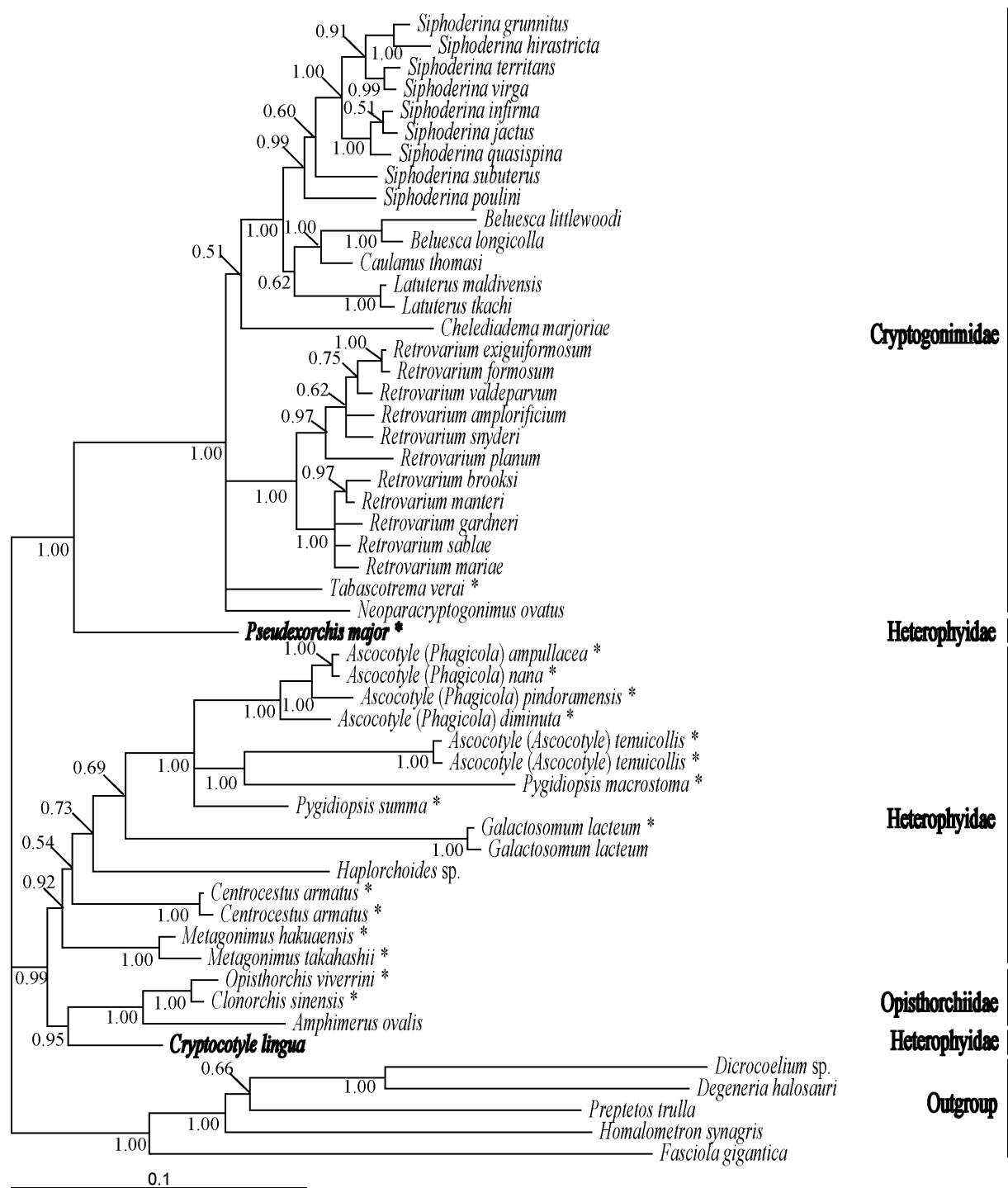
V rámci této studie bylo získáno celkem 17 částečných sekvencí LSU (oblast D1–D3) a 20 kompletních sekvencí ITS2 (viz tabulka č. 4). Do analýz nebyly zahrnuty sekvence ITS2 motolic *Clonorchis sinensis* a Heterophyidae gen. sp. kvůli problémům s alignováním s ostatními sekvencemi.

Nižší množství získaných sekvencí ve srovnání s počtem analyzovaných vzorků bylo způsobeno převážně metodickými problémy při izolaci DNA v případě encystovaných metacerkárií nebo z velmi malých a nepočetných zástupců. U druhů *Ascocotyle* (*Ascocotyle*) *tenuicollis* a *Centrocestus armatus* byly získány sekvence ze dvou zástupců kvůli posouzení vnitrodruhové variability. Dále byly v průběhu prací zjištěny paralogy v genu pro ITS2 u druhů *Ascocotyle* (*Phagicola*) *ampullacea* a *Ascocotyle* (*A.*) *tenuicollis* (z laguny Chelém at Chuburná, Mexiko).

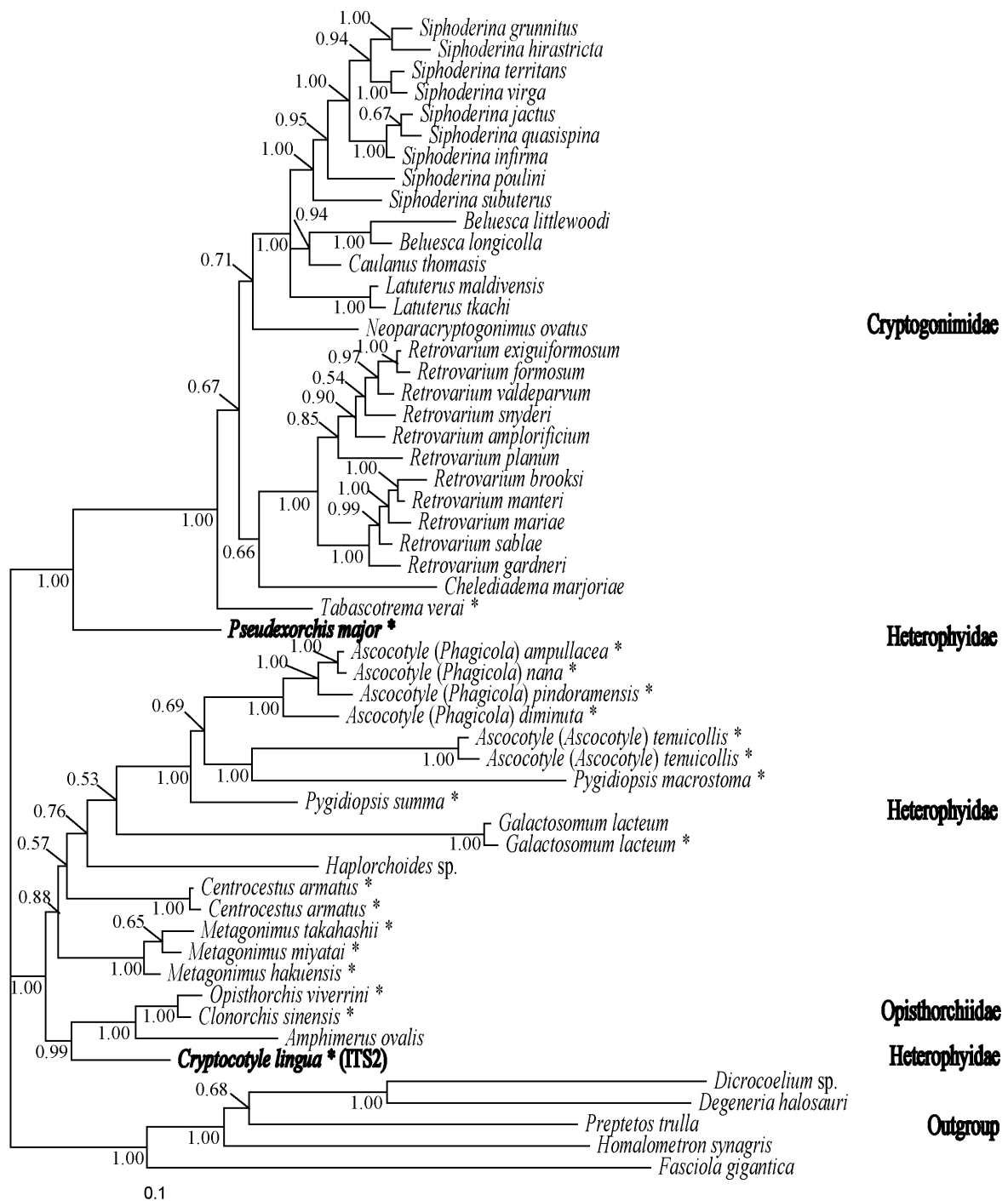
Provedené analýzy pro LSU a ITS2 ukázaly velmi podobné výsledky. Ve všech výsledných stromech vznikly dvě velmi dobře podpořené skupiny – první zastoupená čeledí Cryptogonimidae, druhá zahrnující čeledi Opisthorchiidae a Heterophyidae. Jako výsledný strom pro taxonomické závěry byl vybrán výsledek kombinované analýzy sekvencí LSU a ITS2 se srovnávací skupinou (outgroupem) Bayesiánskou inferencí (BI) (viz obr. 5). Tento strom byl použit pro hodnocení vztahů a vzájemné porovnávání.



Obr. 3. Analýza ITS2 Bayesiánskou inferencí (BI) podle evolučního modelu GTR+G s počtem generací 5×10^6 , počet odstraněných generací (burnin) $2,5 \times 10^6$, podpora uzlů je založená na posteriorních pravděpodobnostech. Nově získané sekvence jsou označeny hvězdičkou (*). Tučně jsou označeny druhy, které jsou podle molekulárních dat zařazeny do jiné skupiny než podle morfologických studií.



Obr. 4. Analýza LSU se srovnávací skupinou (outgroupem) Bayesiánskou inferencí (BI) podle evolučního modelu GTR+G+I s počtem generací 10×10^6 , počet odstraněných generací (burnin) 3×10^6 , podpora uzlů je založená na posteriorních pravděpodobnostech. Nově získané sekvence jsou označeny hvězdičkou (*). Tučně jsou označeny druhy, které jsou podle molekulárních dat zařazeny do jiné skupiny než podle morfologických studií.



Obr. 5. Kombinovaná analýza sekvencí LSU a ITS2 se srovnávací skupinou (outgroupem) Bayesiánskou inferencí (BI) podle evolučního modelu GTR+G+I s počtem generací 6×10^6 , počet odstraněných generací (burnin) $2,5 \times 10^6$, podpora uzlů je založená na posteriorních pravděpodobnostech. Nově získané sekvence jsou označeny hvězdičkou (*). Tučně jsou označeny druhy, které jsou podle molekulárních dat zařazeny do jiné skupiny než podle morfologických studií.

Čeď Cryptogonimidae, která je ve většině analýz monofyletická, se dále dělí na dvě molekulárně i morfologicky odlišené skupiny zahrnující druhy rodů *Retrovarium* a *Siphoderina*. K této čeledi se také řadí jediný nově osekvenovaný druh *Tabascotrema verai*, který se ale řadí jako sesterská skupina k oběma výše zmíněným rodům. Tento zástupce pochází z Nového světa (Mexika) (viz tabulka 1), ale velice dobře spadá mezi ostatní druhy čeledi Cryptogonimidae, kteří pocházejí z Austrálie.

Čeď Opisthorchiidae, kterou reprezentují pouze 3 zástupci a tedy i 3 rody, tvoří ve všech analýzách velmi silně podpořenou monofyletickou skupinu (viz obr. 4 a 5). Čeď Heterophyidae se skládá z několik rodů – rod *Ascocotyle*, *Pygidiopsis*, *Metagonimus*, *Haplorchoides* a *Centrocestus*. Rody *Metagonimus* a *Centrocestus* ve většině analýz tvoří monofyletické skupiny s velmi dobrou podporou. Druhy rodů *Ascocotyle* a *Pygidiopsis* vytváří jednu skupinu, což může naznačovat parafylii rodu *Pygidiopsis* a *Ascocotyle*, která je dobře podpořena výsledky ze všech typů analýz. Tyto rody jsou si i morfologicky velice podobné a jejich vzájemné rozlišení je velice obtížné.

Rod *Ascocotyle* se ve výsledném stromě dělí na dvě dobře podpořené skupiny – podrody *Ascocotyle* a *Phagicola* (viz obr. 5). Rozdělení rodu *Ascocotyle* na tyto dva podrody je totožné i s morfologickým dělením (Sogandares-Bernal a Lumsden 1963).

Druh *Pseudexorchis major* (Heterophyidae) je většině analýz zařazen do čeledi Cryptogonimidae, a to jak v analýzách pro LSU, tak pro ITS2 a kombinovanou analýzu. Dalším takto netypicky zařazeným zástupcem je *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae), který je přiřazován k čeledi Opisthorchiidae. Tyto výsledky naznačují parafylii čeledi Heterophyidae nebo a to pravděpodobněji nesprávné zařazení druhu *Pseudexorchis major* mezi heterophyidní motolice.

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo posoudit, který z vybraných genů (LSU a ITS2) je vhodnější pro posouzení vztahů mezi jednotlivými druhy čeledi Heterophyidae, se zaměřením na vztahy zástupců v rámci rodu *Ascocotyle*. Po analýze získaných sekvencí se jako dostatečně informativní ukázal gen pro velkou podjednotku (LSU, viz obr. 4), ale nejlepších výsledků a podpor bylo dosaženo v kombinaci LSU s ITS2 (viz obr. 5). Při práci pouze se sekvencemi ITS2 bylo hlavním problémem dobré srovnání sekvencí různých druhů (alignment) a zachování dostatečného množství informací pro provedení analýz. Dále byly v průběhu prací zjištěny paralogy v genu pro ITS2 u druhů *Ascocotyle (Phagicola) ampullacea* a *Ascocotyle (A.) tenuicollis* (z laguny Chelém at Chuburná, Mexiko), ale počet paralogů nebyl tak vysoký jako např. u zástupců čeledi Paragonimidae (Nolan a Crib 2005).

Jedním z nejzásadnějších metodických problémů v průběhu prací byla izolace DNA z velmi malých vzorků, a to jak z dospělců, tak z cyst (metacerkárií). I při použití speciálního komerčního kitu (AquaPure® Genomic DNA Isolation Kit od firmy BIORAD) určeného pro malá množství vzorků se v některých případech nepodařilo DNA vyizolovat. Jako další metoda při získávání DNA byla použita klasická metoda izolace fenol-chloroformem, při níž bylo dosaženo lepších výsledků než s komerčně využívaným kitem. V průběhu prací se jako náročnější materiál pro izolaci ukázaly cysty, které jsou na rozdíl od dospělců vybaveny silným proteinovým obalem. Cysty musely být před izolací homogenizovány za pomoci zirkonium-křemičitanových kuliček a až po důkladném rozmělnění mohl být homogenizát použit k izolaci.

Jako strom, který byl použit pro diskusi možných taxonomických změn, byl vybrán výsledek z kombinované analýzy pomocí BI (viz obr. 5). V tomto stromu můžeme jasně odlišit čeleď Cryptogonimidae, která se dále dělí na dva rody *Retrovarium* a *Siphoderina* (viz obr. 5). Rozdělení na tyto rody má velmi dobrou podporu v molekulárních i v morfologických datech. K této čeledi se také řadí jediný nově osekvenovaný druh *Tabascotrema verai*, který pochází, na rozdíl od ostatních australských druhů, z Jižní Ameriky (Mexika).

Další velmi silně podpořenou skupinu tvoří čeledi Opisthorchiidae a Heterophyidae. Čeleď Heterophyidae zahrnuje rody *Galactosomum*, *Centrocestus*, *Metagonimus*, *Haplorchoides* a skupinu rodů *Ascocotyle* a *Pygidiopsis* (viz obr. 5). Rody *Galactosomum*, *Centrocestus* a *Metagonimus* se podle výsledků jeví jako monofyletické, ale k úplnému ověření by bylo potřeba osekvenovat více zástupců z těchto rodů. U rodu *Haplorchoides* nemůže být vyslovena jasná hypotéza, jelikož je známa sekvence pouze jednoho zástupce.

Čeď Opisthorchiidae je zastoupena druhy *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* a *Amphimerus ovalis*. Tito zástupci tvoří velmi silně podpořenou monofyletickou skupinu, ke které se podle molekulárních dat přiřadil i druh *Cryptocotyle lingua* jako sesterská skupina. Tento druh je zařazen na základě morfologie do čeledi Heterophyidae, ale podle molekulárních dat je přiřazován k čeledi Opisthorchiidae (viz obr. 4 a 5). Pozice druhu *C. lingua* mimo čeď Heterophyidae byla zjištěna již Olsonem a kol. (2003). Pro potvrzení hypotézy o bližší příbuznosti druhu *Cryptocotyle lingua* k čeledi Opisthorchiidae než k čeledi Heterophyidae je však nutné získat více sekvencí druhů z čeledi Opisthorchiidae.

Podle výsledků prezentovaných v této studii (viz obr. 5) se rod *Ascocotyle* dělí na dva podrody, *Ascocotyle* a *Phagicola*. Výsledek tedy odpovídá i morfologickému dělení a potvrzuje podrody *Phagicola* a *Ascocotyle* jako samostatné skupiny (Sogandares-Bernal a Lumsden 1963, Scholz a kol. 2001). Bohužel se zatím nezdařilo osekvenovat žádného zástupce z podrodu *Leighia*, aby mohla být potvrzena nebo vyvrácena samostatnost tohoto podrodu.

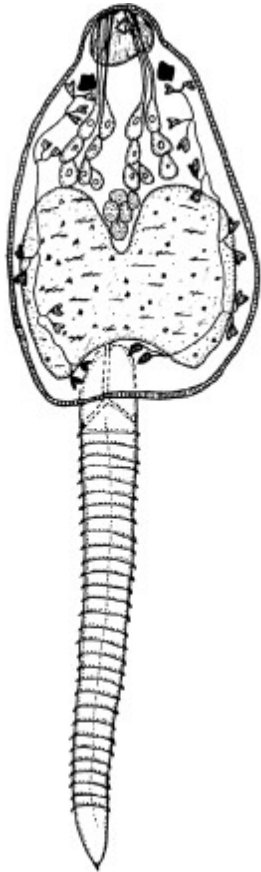
Zvláštností v těchto analýzách je přiřazení druhu *Pygidiopsis macrostoma* k druhům rodu *Ascocotyle*, a to konkrétně k podrodu *Ascocotyle* (viz obr. 4 a 5). Toto zařazení může naznačovat, že současné rozlišování rodů *Ascocotyle* a *Pygidiopsis* pouze na základě morfologických údajů, především přítomnosti dorzálně umístěného svalnatého výběžku ústní přísavky (*posterior appendage*) u rodu *Ascocotyle*, není vhodné pro charakterizaci přirozených skupin. Oba tyto rody jsou si morfologicky velice podobné včetně stavby pohlavní soustavy a svými vývojovými cykly. Zástupci rodu *Pygidiopsis* jsou spíše paraziti ptáků, zatímco motolice rodu *Ascocotyle* cizopasí jak ptáků tak u savců (Pearson 2008). Jediným morfologickým rozdílem dospělců je právě přítomnost dorzálně umístěného svalnatého výběžku ústní přísavky (*posterior appendage*) u rodu *Ascocotyle* (viz Scholz a kol. 2001, Pearson 2008).

Při srovnání morfologie cercárie *P. macrostoma* (viz Simões a kol. 2009; obr. 6) byly zjištěny podobnosti s cercáriemi druhů *Ascocotyle* (*Ascocotyle*) *gemina* Font, Overstreet a Heard, 1984 (viz Font a kol. 1984; obr. 7) a *Ascocotyle* (*Leighia*) *hadra* Ostrowski de Núñez, 1992 (viz Ostrowski de Núñez 1992; obr. 8). Tato podobnost by mohla naznačovat, že druh *P. macrostoma* je spíše zástupcem rodu *Ascocotyle* než rodu *Pygidiopsis*, čemuž odpovídají i výsledky z analýz molekulárních dat.

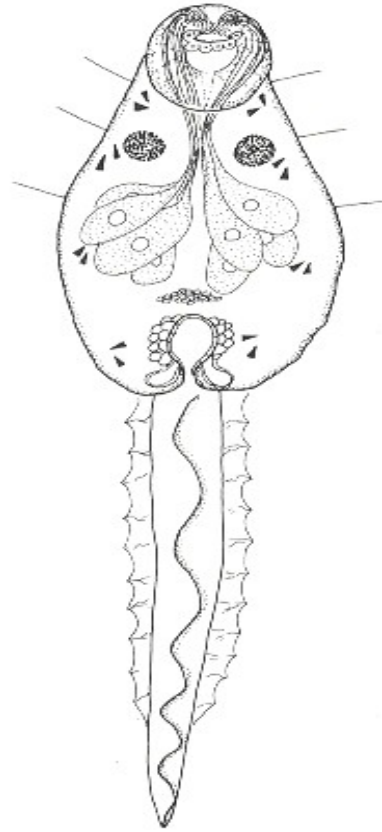
Dalším druhem, jehož stávající zařazení nemusí být správné, je *Pseudexorchis major*, který je zařazen na základě morfologie cercárie do čeledi Heterophyidae. Jeho vývojový cyklus však odpovídá spíše zástupcům čeledi Cryptogonimidae, neboť druhy rodu

Pseudexorchis (spolu s ním však zástupci dalších dvou rodů heterophyidních motolic *Haplorchoides* Chen, 1949 a *Acetodextra* Pearce, 1924) využívají jako definitivního hostitele dravé ryby, v tomto případě sumce z čeledi Siluridae, což je znak typický právě pro čeleď Cryptogonimidae (Yamaguti 1978, Pearson 2008). Ve většině analýz v této práci se druh *P. major* řadí k čeledi Cryptogonimidae. Tento výsledek naznačuje, že zařazení toho druhu pouze podle morfologie cercárií nemusí odpovídat skutečným příbuzenským vztahům a na základě molekulárních údajů i typu vývojového cyklu lze uvažovat o přeřazení rodu *Pseudexorchis* do čeledi Cryptogonimidae.

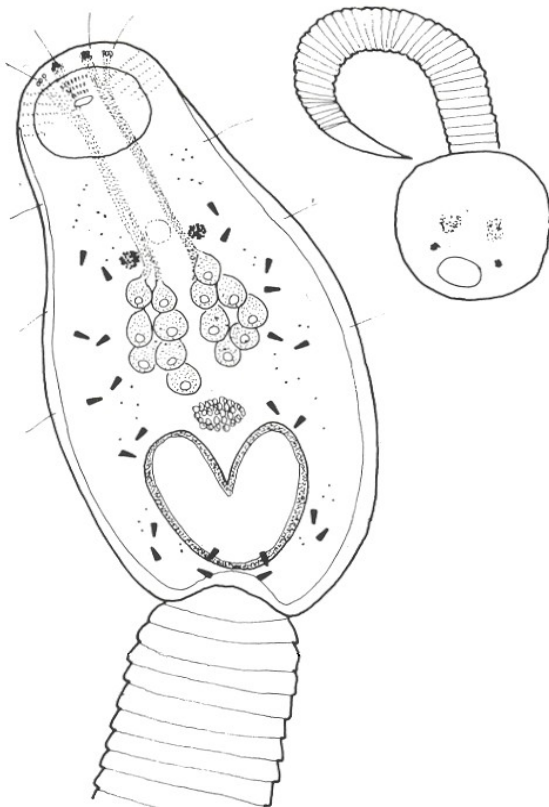
Jedním z obtížných problémů v této práci byl nedostatek informací o sekvencích příbuzných druhů z čeledi Opisthorchiidae a Heterophyidae pro srovnání s nově získanými sekvencemi. V genové bance (GenBanku) je velké množství sekvencí převážně lékařsky významných motolic, jako např. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* nebo *Heterophyes nocens*. Tyto sekvence jsou však příliš krátké, a proto ve většině případů nepoužitelné pro zařazování druhů do čeledí a porovnání vztahů mezi rody. I s nově získanými sekvencemi druhů je posouzení vztahů mezi rody a v rámci rodů značně limitované, např. v případě rodu *Haplorchoides*, u kterého je známa sekvence pouze jednoho zástupce. S rostoucím počtem sekvencí by se mohl problém se zařazováním druhů do čeledi Heterophyidae vyřešit. Zařazení některých zástupců podle morfologických znaků občas neodpovídá skutečným příbuzenským vztahům např. zařazení druhů *Pseudexorchis major*, *Pygidiopsis macrostoma* a *Cryptocotyle lingua* prezentované v této práci.



Obr. 6. Cercárie *Pygidiopsis macrostoma*
Travassos, 1928 (Simões a kol 2009).



Obr. 7. Cercárie *Ascocotyle (Ascocotyle)*
gemina Font, Overstreet a Heard, 1984
(Font a kol. 1984).



Obr. 8. Cercárie *Ascocotyle (Leighia)*
hadra Ostrowski de Núñez, 1992
(Ostrowski de Núñez 1992).

6. ZÁVĚR

Výsledky prezentované v této studii jsou založeny na nově získaných sekvencích 28S (velké podjednotky) a ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) motolic čeledi Heterophyidae, Opisthorchiidae a Cryptogonimidae. V průběhu prací bylo získáno celkem 37 sekvencí (17 sekvencí 28S a 20 sekvencí ITS2). Od zástupců z čeledi Cryptogonimidae byly získány 2 sekvence (1 sekvence 28S a 1 sekvence ITS2) od jediného druhu *Tabascotrema verai*, který byl získán z ryb (Mexiku), 31 sekvencí (14 sekvencí 28S, 17 sekvencí ITS2) od zástupců čeledi Heterophyidae a 4 sekvence (2 sekvence 28S a 2 sekvence ITS2) druhů *Opisthorchis viverrini* a *Clonorchis sinensis* z čeledi Opisthorchiidae (viz tabulka 4). Na základě získaných sekvencí v průběhu této studie bylo možné posoudit fylogenetické vztahy mezi zástupci čeledi Heterophyidae, Opisthorchiidae a Cryptogonimidae. V průběhu analýz se ukázal jako dostatečně informativní gen pro velkou podjednotku (28S, LSU), který se hodí pro zařazování zástupců do čeledí; nejlepších výsledků však bylo dosaženo při kombinované analýze obou genů.

Výsledky z analýz naznačují, že čeledi Cryptogonimidae a Opisthorchiidae jsou monofyletické. U čeledi Heterophyidae byla již diskutována možná parafylie Olsnem a kol. (2003), a to na základě postavení druhu *Cryptocotyle lingua*, který byl řazen k čeledi Opisthorchiidae. Toto postavení bylo znovu potvrzeno i v předkládané práci. Dalším druhem, jehož zařazení nemusí odpovídat skutečným příbuzenským vztahům, je *Pseudexorchis major*. Tento druh je zařazen na základě morfologie cercárie do čeledi Heterophyidae. Jeho vývojový cyklus však odpovídá spíše zástupcům čeledi Cryptogonimidae. Na základě vývojového cyklu spolu s výsledky z molekulárních analýz lze uvažovat o přeřazení druhu *Pseudexorchis major* (popř. celého rodu *Pseudexorchis*) do čeledi Cryptogonimidae.

Celkem bylo získáno 6 sekvencí LSU a 6 sekvencí ITS2 zástupců rodu *Ascocotyle* (viz tabulka 4). Z těchto dat se podařilo potvrdit samostatnost podrodů *Ascocotyle* a *Phagicola*, které byly až do této doby oddělovány pouze na základě morfologie dospělců a cercárií. K rodu *Ascocotyle* byl ve většině analýz přiřazen i druh *Pygidiopsis macrostoma* (obr. 4 a 5). Výsledky z molekulárních analýz naznačují, že tento druh by měl být přeřazen do rodu *Ascocotyle* (podrod *Ascocotyle*).

Tato studie přispívá svými výsledky k vyjasnění vztahů mezi některými rody z čeledi Heterophyidae. Zároveň také naznačuje, že výhradní použití morfologických popisů při zařazování druhů do rodů *Ascocotyle* a *Pygidiopsis* nemusí vždy odrážet skutečné příbuzenské

vztahy a ke klasifikaci je třeba využít veškeré dostupné informace o morfologii a vývojovém cyklu v kombinaci s molekulárními daty.

Při případném dalším pokračování v tomto projektu by bylo vhodné pracovat v případě dostupnosti vhodného materiálu spíše s dospělci než s encystovanými metacerkáriemi. Dále je žádoucí osekvenovat zástupce podrodu *Leighia*, rodu *Haplorchoides* a *Pseudexorchis* a další druhy z čeledi Opisthorchiidae kvůli lepšímu ověření hypotéz a výsledků uvedených v této studii.

7. LITERATURA

- Aguirre-Macedo M. L., Scholz T., González-Solís D., Vidal-Martínez V.M., Posel P., Arjona-Torres G., Siu-Estrada E., Dumailo S., 2001.** Larval helminths parasitizing freshwater fishes from the Atlantic coast of Nicaragua. *Comparative Parasitology* 68: 42-51.
- Burton P.R., 1958.** A review of the taxonomy of the trematode genera *Ascocotyle* (Looss) and *Phagicola* (Faust) of the family Heterophyidae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 25: 117-122.
- Caira J.N., Littlewood D.T.J., 2001.** Worms, Platyhelminthes. In: Encyklopedia of Biodiversity, University of Connecticut and The Natural History Museum London: pp. 863-899.
- Campos A., Cummings C.P., Reyes J.L., Lacleste J.P., 1998.** Phylogenetic relationships of Platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 1-10.
- Cribb T.H., Bray R.A., Littlewood D.T.J., 2001.** The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *International Journal for Parasitology* 31: 997-1001.
- Cribb T.H., Bray R.A., Littlewood D.T.J., Pichelin S.P., Herniou E.A., 2001.** The Digenea. In: Littlewood D.T.J., Bray R.A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*, Taylor and Francis, London, pp. 168-185.
- Cribb T.H., Bray R.A., Olson P.D., Littlewood D.T.J., 2003.** Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. *International Journal for Parasitology* 54: 198-254.
- Ditrich O., Scholz T., Aguirre-Macedo L., Vargas-Vázquez J., 1997.** Larval stages of trematodes from freshwater molluscs of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Folia Parasitologica* 44: 109-127.
- Ditrich O., Scholz T., Giboda M., 1990.** Occurrence of some medically important flukes (Trematoda: Opisthorchiidae and Heterophyidae) in Nam Ngum water reservoir, Laos. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 21: 482-488.

- Font W. F., Heard R. W., Overstreet R.M.**, 1984. Life cycle of *Ascocotyle gemina* n. sp., a sibling species of *A. sexidigita* (Digenea: Heterophyidae). *Transactions of the American Microscopical Society* 103: 392-407.
- Galaktionov K.V., Dobrovolskij A.A.**, 2003. The Biology and Evolution of Trematodes. Kluwer Academic Publishers, 592 pp.
- Giboda M., Ditrich O., Scholz T., Viengsay T., Bouaphan S.**, 1991. Human *Opisthorchis* and *Haplorchis* infection in Laos. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85: 199-205.
- 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.
- Jíra J.**, 1998. *Lékařská helmintologie*. Galén, Praha, 491 pp.
- Kang S., Sultana T., Loktev V.B., Wongratanacheewin S., Sohn W.M., Eom K.S., Park J.K.**, 2007. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda). *Parasitology International* 57: 191-197.
- Katoh K., Toh M.**, 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518.
- King S., Scholz T.**, 2001. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. *Korean Journal of Parasitology* 39: 209-221.
- La Rue G.R.**, 1951. Host-parasite relations among the digenetic trematodes. *Journal of Parasitology* 37: 333-342.
- Lee S.U., Huh S.**, 2004. Variation of nuclear and mitochondrial DNAs in Korea and Chinese isolates of *Clonorchis sinensis*. *Korean Journal of Parasitology* 42: 145-148.
- Lee S.U., Huh S., Sohn W.-M., Chai J.-Y.**, 2004. Sequence comparisons of 28S ribosomal DNA and mitochondrial cytochrom c oxidase subunit I of *Metagonimus yokogawai*, *M. takahashii* a *M. miyatai*. *Korean Journal of Parasitology* 42: 129-135.
- Littlewood D.T.J., Bray R.A. (Eds.)**, 2001. *Interrelationships of Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, 356 pp.

- Lumsden R.D.**, 1963. A new heterophyid trematodes of the *Ascocotyle* complex of species encysted in poeciliid and cyprinodont fishes of Southeast Texas. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 30: 293-296.
- Nolan J.N., Cribb T.H.**, 2005. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in Parasitology* 60: 102-163.
- Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T.J.**, 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33: 733-755.
- Ostrowski de Núñez M.**, 1992. Life history studies of heterophyid trematodes in the Neotropical region: *Ascocotyle (Leighia) hadra* sp. n. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 87: 539-543.
- Page R.D.M.**, 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Park J.H., Kim J.L., Shin E.H., Guk S.M., Park Y.K., Chai J.Y.**, 2007. A new endemic focus of *Heterophyes nocens* and other heterophyid infection in a coastal area of Gangjin-gun, Jeollanam-do. *Korean Journal of Parasitology* 45: 33-38.
- Pearson J.**, 2008. Family Heterophyidae. In: Keys to the Trematoda, Volume 3, Natural Historical Museum and CABI, London, pp.113-141.
- Posada, D. and Crandal, K.A.** 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Sambrook J., Russell, D.W.** 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scholz T., Aguirre-Macedo M.L.**, 2000. Metacercariae of trematodes parasitizing freshwater fish in Mexico: a reappraisal and methods of study. In: G. Salgado-Maldonado, A.N. García-Aldrete and V.M. Vidal-Martínez (Eds.). Metazoan parasites in the neotropics: a systematic and ecological perspective. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 85-99.
- Scholz T., Salgado-Maldonado G.**, 2000. The introduction and dispersal of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae) in Mexico: a review. *American Midland Naturalist* 143: 185-200.

- Scholz T.**, 1999. Redescription of *Phagicola pithecofagicola* Faust, 1920 (Digenea: Heterophyidae), the type species of *Phagicola* Faust, 1920. *Journal of Parasitology* 85: 111-114.
- Scholz T., Aguirre-Macedo M.L., Sabasflores Díaz de León A.N., Ditrich O.**, 2000. Larval stages of trematodes in freshwater molluscs of Mexico: a review of present state and methodology for future research. In: G. Salgado-Maldonado, A.N. García-Aldrete and V.M. Vidal-Martínez (Eds.). *Metazoan parasites in the neotropics: a systematic and ecological perspective*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 61-84.
- Scholz T., Aguirre-Macedo M.L., Salgado-Maldonado G.**, 2001. Trematodes of the family Heterophyidae (Digenea) in Mexico: a review of species and new host and geographical records. *Journal of Natural History* 35: 1733-1772.
- Scholz T., Vargas-Vázquez J., Aguirre-Macedo L., Vidal-Martínez V.M.**, 1997. Species of *Ascocotyle* Looss, 1899 (Digenea: Heterophyidae) of the Yucatan Peninsula, Mexico, and notes on their life-cycles. *Systematic Parasitology* 36: 161-181.
- Scholz T., Vargas-Vázquez J.**, 1998. Trematodes from fishes of the Río Hondo River and freshwater lakes of Quintana Roo, Mexico. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 65: 91-95.
- Scholz T., Vargas-Vázquez J., Moravec F., Vivas-Rodríguez, Mendoza-Franco E.**, 1995. Metacercariae of trematodes of fishes from cenotes (= sinkholes) of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Folia Parasitologica* 42: 173-192.
- Schulerburg J.H.G., U. Englisch, J. W. Wägele**, 1999. Evolution of ITS1 rDNA in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda): 3' end sequence conservation and its phylogenetic utility. *Journal of Molecular Evolution* 48: 2-12.
- Simões S.B.E., Barbosa H.S., Santos C.P.**, 2009. The life history of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Digenea: Heterophyidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 104: 106-111.
- Sogandares-Bernal F., Lumsden R.D.**, 1963. The generic status of the heterophyid trematodes of the *Ascocotyle* complex, including notes on the systematics and biology of *Ascocotyle angrense* Travassos, 1916. *Journal of Parasitology* 49: 264-274.

- Sohn W.M., Chai J.Y.**, 2007. Infection status with helminths in feral cats purchased from market in Busan, Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology* 43: 93-100.
- Škeříková A., Hypša V. , Scholz T.**, 2004. A paraphyly of the genus *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808 (Cestoda: Pseudophyllidea) inferred from internal transcribed spacer-2 and 18S ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 90: 612-617.
- Thu N.D., Dalsgaard A., Loan L.T.T, Murrell K.D.**, 2007. Survey for zoonotic liver and intestinal trematode metacercariae in cultured and wild fish in An Giang Province, Vietnam. *Korean Journal of Parasitology* 45: 45-54.
- Williams H., Jones A.**, 1994. *Parasitic Worms of Fish* Taylor and Francis, London, 593 pp.
- Yamaguti S.**, 1971. *Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates*. Vols. 1 and 2, Keigaku Publishing Co., Tokyo, 1074 pp.
- Yamaguti S.**, 1975. *A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates*. Keigaku Publishing Co., Tokyo, 590 pp.