

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

# Charakterizace mitochondriálního genomu vybraných myxozoi

Diplomová práce

Bc. Vendula Branišová

Vedoucí práce: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2023

**Branišová, V., 2023:** Charakterizace mitochondriálního genomu vybraných myxozí [Characterization of the mitochondrial genome of selected myxozoans, Mgr. Thesis, in Czech.] 75 pp., University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Myxozoans are microscopic metazoan parasites with a cnidarian origin. These organisms lost many genes responsible for multicellular development, cell communication, and even aerobic respiration (in some cases) during their evolution into microscopic parasites. This study has been aimed to characterize the mitochondrial genome and reconstruct its evolution within Myxozoa. The complete mitochondrial genome of *Zschokkella nova* and *Sphaerospora molnari*, and partial genome of *Myxidium lieberkuehni*, *Nephrocystidium pickii*, and *Zschokkella* sp. has been characterized. Phylogenetic trees have been constructed based on sequences of selected mitochondrial proteins.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

13.04.2023

Bc. Vendula Branišová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ivanu Fialovi, PhD. za jeho trpělivost, cenné rady, připomínky a přátelský přístup. Dále pak taky všem pracovníkům Laboratoře rybí protistologie za milé pracovní prostředí. V neposlední řadě bych ale chtěla poděkovat svým rodičům a prarodičům, především svému dědovi, za vše, co pro mě kdy udělali.

## **Finanční podpora**

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky z grantu č. 21-29370S.

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Myxozoa Grasse, 1970 .....	1
1.1.1. Fylogeneze .....	1
1.1.2. Morfologie .....	2
1.1.3. Životní cykly.....	4
1.1.4. Ekonomický význam.....	8
1.2. Mitochondrie .....	9
1.2.1. Původ a funkce.....	9
1.2.2. Deriváty mitochondrií .....	10
1.2.3. Mitochondriální DNA .....	12
1.2.4. Mitochondriální DNA jako molekulárně genetický marker.....	15
2. Cíle práce.....	18
3. Materiál a metody .....	19
3.1. Studijní materiál .....	19
3.1.1. Metodika sběru materiálu .....	20
3.2. Izolace mitochondriální frakce .....	21
3.3. Izolace mitochondriální DNA .....	21
3.4. Oxford Nanopore sekvenování.....	22
3.5. PCR.....	22
3.5.1. Navržení primerů .....	22
3.5.2. LA PCR .....	25
3.5.3. Nested PCR.....	26
3.6. Gelová elektroforéza.....	27
3.7. Sekvence.....	28
3.8. Vyhodnocení a zpracování sekvencí .....	28
3.8.1. De Novo Assembly .....	28
3.8.2. Anotace genomu .....	29
3.8.3. Fylogenetická analýza .....	29

3.9. Mikroskopická analýza .....	31
4. Výsledky.....	32
4.1. Charakteristika mitochondriálního genomu .....	32
4.1.1. Mitochondriální genom druhu <i>Zschokkella nova</i> .....	32
4.1.2. Mitochondriální genom druhu <i>Sphaerospora molnari</i> .....	35
4.1.3. Mitochondriální genom druhu <i>Myxidium lieberkuehni</i> .....	37
4.1.4. Mitochondriální genom druhu <i>Nephrocystidium pickii</i> .....	39
4.1.5. Mitochondriální genom druhu <i>Zschokkella sp.</i> .....	41
4.1.6. Struktura mitochondriálního genomu .....	45
4.2. Fylogenetická analýza.....	47
4.3. Mikroskopická analýza .....	51
4.3.1. Mitochondrie.....	51
4.3.2. Mitochondriální DNA .....	52
5. Diskuse .....	53
6. Závěr .....	59
7. Seznam použité literatury.....	60
8. Přílohy .....	69

# 1. Úvod

## 1.1. Myxozoa Grasse, 1970

Myxozoa neboli rybomorky je kmen morfologicky vysoce redukovaných mikroskopických endoparazitů se složitými životními cykly. Dosavadně popsané druhy jsou řazeny do 67 rodů v 17 čeledích (Kaur et al., 2023) a rozděleny do dvou tříd Malacosporea a Myxosporea. Malacosporea zahrnují pouze několik druhů využívajících sladkovodní mechovky jako hostitele. Zbytek zástupců je zahrnut ve třídě Myxosporea, a využívá jako hostitele kroužkovce (Okamura et al., 2015).

### 1.1.1. Fylogeneze

Fylogenetické umístění těchto živočichů bylo dlouhou dobu složitým tématem k řešení. Přestože byl tento kmen od svého objevu řazen do protist, již od začátku 20 století začalo být toto řazení na základě některých vlastností zpochybňováno. Jako první přišel s touto myšlenkou Štolc (1899), který ve své studii tvrdil, že Myxozoa nejsou protisté, že jsou jejich spory mnohobuněčné a měly by tedy být součástí metazoí. Tuto hypotézu později znovu potvrdil Weill (1938). Ve své studii byl konkrétnější a zmiňuje už i nematocyty myxozoí vykazující identické vlastnosti jako nematocyty žahavců. Tehdy tedy Weill jako první navrhl, že se jedná o žahavce. Na základě některých podobností dokonce odhadoval příbuznost s druhem *Polypodium hydriforme*. K přesnému řazení však bylo třeba molekulárních analýz.

Ke konci 20. století docházelo díky rozmáhajícím se molekulárním analýzám k postupnému odhalování skutečného zařazení těchto parazitů. Když byly dostupné sekvence 18S rDNA, Smothers et al. (1994) ukázali, že se Myxozoa seskupili v rámci metazoí jako sesterská skupina k hlísticím. Toto zjištění však nekorelovalo s Weillovo hypotézou. Siddall et al. (1995) analýzu opakovl a díky většímu počtu použitých sekvencí prokázal, že jsou Myxozoa sesterská s *Polypodium hydriforme*, přesně jak předpověděl Weill (1938). Lom & Dyková o pár let později (1997) také dospěli k závěru, že jsou Myxozoa velmi podobní žahavcům, a to především na základě ultrastrukturálních srovnání, zejména potom srovnání jejich nematocyt s nematocyty žahavců (Kent et al. 2001).

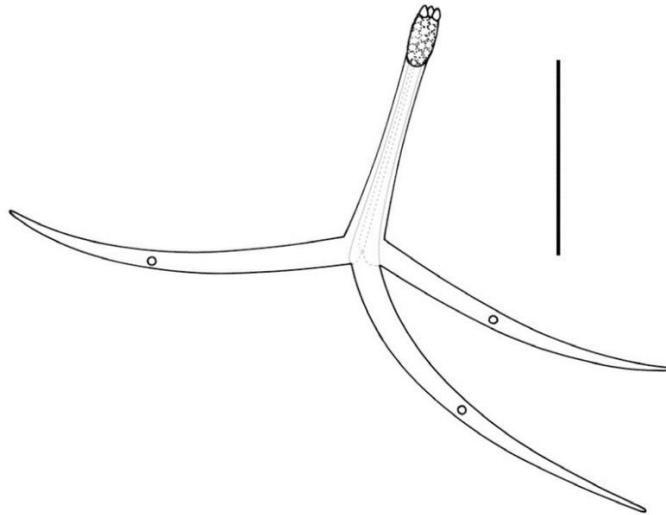
Zásadní pro vyřešení této dlouholeté otázky bylo znovuobjevení druhu *Buddenbrockia plumatellae*, jehož zařazení nebylo jasné. Ultrastrukturální analýza tohoto parazita odhalila díky přítomnosti nematocyt jeho myxozoární afinitu (Okamura et al., 2002). Tato analýza sice na jednu stranu podpořila žahavčí původ, na druhou ale interpretovala domnělé soubory podélných svalových bloků u *B. plumatellae* jako homologní se svalovinou hlístic, což podpořilo tvrzení Smotherse et al. (1994). Detailnější studie však následně odhalily, že podélné svaly *B. plumatellae* jsou stejně jako u žahavců distribuovány radiálně. Navíc první multigenová fylogenetická analýza (Jiménez-Guri et al., 2007) vyloučila jejich bilatérní původ. Definitivně byla příbuznost myxozoi s žahavci potvrzena průkazem přítomnosti genu specifického pouze pro žahavce (gen pro minicolagen) v jejich genomu (Holland et al., 2011).

### **1.1.2. Morfologie**

Jako u ostatních parazitů, i u myxozoi došlo vlivem adaptace na parazitický způsob života k redukci tělního plánu. Ten se skládá pouze ze dvou vrstev tkáně (endodermu a ektodermu), jediného otvoru sloužícího jako ústa i řitní otvor (Technau & Steele, 2011) a specializovaných žahavých buněk tzv. nematocytů, které obsahují unikátní organelu nematocystu (Americus et al. 2020). Extrémně redukovaní Myxozoa se tak během svého životního cyklu skládají pouze z několika typů buněk (Holzer et al., 2018) a střídají dvě vývojová stádia (aktinospóra/myxospóra u myxosporeí, dva typy malakospor vyvíjející se v mechovce/rybě u malacosporeí), jejichž podrobnější popis byl publikován ve studiích Lom & Arthur (1989) a Lom & Dyková (1997).

#### **1.1.2.1 Stádium aktinospory**

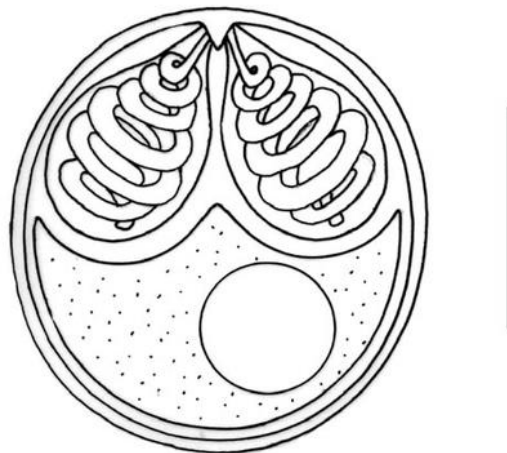
Stádium aktinospory (Obrázek 1) je většinou triradiální, se třemi nebo šesti sporovými chloupkami (kaudální výběžky). Výjimku tvoří skupina Tetractinomyxon, která má čtyři sporové chloupky, ty fungují jako plováky, které pomáhají udržovat aktinosporu ve vodním sloupci. Každý kaudální výběžek obsahuje jediné jádro a jeho délka se pohybuje od 10  $\mu\text{m}$  do několika set  $\mu\text{m}$ . Všechny dosud popsané aktinospory obsahují tři nematocyty bez ohledu na počet kaudálních výběžků (Feist & Longshaw, 2006).



**Obrázek 1.** Stádium aktinospory. Měřítko 100  $\mu\text{m}$  (Převzato ze Székely et al. 2009).

### 1.1.2.2. Stádium myxospory

Stádium myxospory (Obrázek 2), jehož velikost se pohybuje mezi 10–20  $\mu\text{m}$ , se vyvíjí v obratlovčím hostiteli a slouží jako deterministický znak v taxonomii. Spory jsou složeny ze dvou až 12 chlopní, jednoho až 13 nematocytů a infekční sporoplazmy, která se skládá z jedné dvoujaderné či dvou jednojaderných buněk. Chlopně vytvářejí suturální linii, která se štěpí a uvolňuje infekční sporoplazmu v definitivním hostiteli. Povrch chlopní bývá hladký či vroubkovaný, někdy mohou být obklopeny (zcela nebo částečně) slizovým obalem. Nematocyty obsahují stočené polární vlákno, jehož orientace a typ stočení bývá druhově specifické. Myxospory se vyvíjejí v plasmodiích nebo pseudoplasmodiích splynutím několika buněk (Feist & Longshaw, 2006).



**Obrázek 2.** Stádium myxospory. Měřítko 5  $\mu\text{m}$  (Převzato ze Székely et al. 2009).



### 1.1.2.3. Stádium malakospory

Malakospory z mechovců se skládají z 8 chlopňových buněk, 4 nematocytů a 2 infekčních sporoplazem, z nichž se každá skládá z primární buňky obalující sekundární buňku (McGurk et al. 2005). U malakospor produkovaných v rybím hostiteli je morfologie spor, a tedy i identifikace druhů obtížnější. Transmisní elektronová mikroskopie však prokázala, že se rybí malakospory skládají ze 4 chlopňových buněk, 2 nematocytů a 1 sporoplazmy bez sekundární buňky (Morris & Adams 2008).

### 1.1.3. Životní cykly

Jak již bylo zmíněno, životní cykly myxozoí jsou poměrně složité a sestávají se z obratlovčího mezihostitele a definitivního hostitele, kterým je obvykle kroužkovec nebo mechovka. Největší zastoupení známých mezihostitelů tvoří ryby, ale využívání jsou i obojživelníci, plazi, ptáci a savci (Fiala et al., 2015). Mezi myxozoi neexistuje žádný jasný vzorec jejich hostitelské specifity. Některé druhy jsou například striktně hostitelsky specifické jako třeba *Myxidium lieberkuehni* u štiky. Některé druhy, jako je *Myxobolus cerebralis* či *Tetracapsuloides bryosalmonae* jsou specifictí pouze na úrovni čeledí. Oproti tomu jiné druhy se vyznačují nízkou specifitou, například *Myxobolus aeglefini* parazituje jak u platýsovitých, tak u treskovitých ryb (Nielsen et al., 2002). Jejich zástupce můžeme nalézat jak v mořích, estuárech, tak i ve sladkovodních prostředí po celém světě (Feist & Longshaw, 2006).

#### 1.1.3.1. Životní cyklus malacosporeí

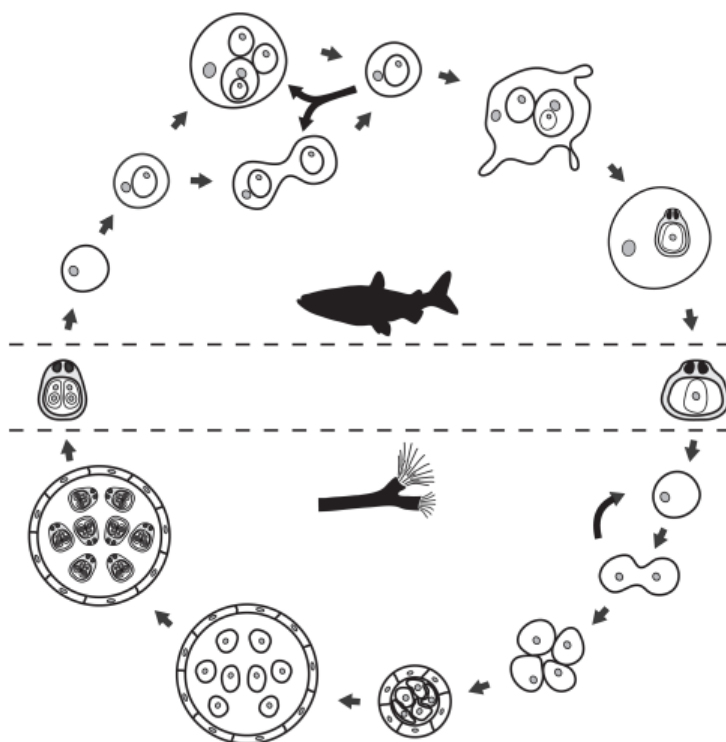
Malocosporea jsou paraziti sladkovodních mechovek. Trofická, proliferativní stádia žijí v jejich tělní dutině ve formě uzavřených mnohobuněčných vaků nebo červovitých organismů (Lom & Dyková 2006). Jako mezihostitele využívají ryby.

Jako první bylo popsáno vakovité stádium druhu *Buddenbrockia plumatellae* jako *Tetracapsula bryozoides* (Canning et al. 1999). Na základě pozdějších ultrastrukturálních a molekulárních studií však někteří autoři navrhli, že *B. plumatellae* a *T. bryozoides* jsou fázemi životního cyklu téhož organismu (Monteiro et al. 2002, Canning et al. 2002). Tato stádia se odlišují především morfologicky. Červovité stádium *B. plumatellae* se skládá z vnější a vnitřní vrstvy epiteliální tkáně. Mezi vrstvami jsou umístěny čtyři podélné bloky složené ze svalových buněk (Okamura et al., 2002). Oproti tomu vakovitá stádia se skládají

pouze z vnější a vnitřní vrstvy epiteliální tkáně. Fenomén dvou stádií byl zaznamenán pouze u tohoto druhu a jiné druhy, jako *Buddenbrockia allmani* nebo *Tetracapsula bryosalmonae* tvoří pouze vakovitá stádia (Hrabcová, 2015). Obě stádia produkují infekční spory ve vnitřní dutině (Hartikainen et al., 2014).

Nejjednodušší vývoj nacházíme u *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Obrázek 3), kde sporoplazma vstupuje do mechovky přes střevní epitel a epidermis. Raná mnohobuněčná stádia jsou shluky několika buněk, které se svou ultrastrukturou podobají jednobuněčným stádiím. Předpokládá se, že tyto shluky vznikají buď agregací nebo mitózou. Následná stádia již mají vnější epiteliální vrstvu obklopující kompaktní masu vnitřních buněk. Vegetativním růstem vznikají váčky. V určité fázi vnitřní buňky podléhají sporogonii, která na rozdíl od růstu probíhá spíše synchronně. U jednoho hostitele se tedy obvykle nacházejí váčky různých velikostí, ale v podobné fázi sporogonie. Ve zralých váčkách se nacházejí spory, které skrze kůži infikují ryby (Gruhl, 2015).

Spory jsou přichyceny na kůži nebo žábry polárními vlákny a invadují přes epidermální a slizové buňky do ryb (Longshaw et al. 2002). Infekční stadia poté proliferují v krevním řečišti a putují do ledvin, kde se znovu replikují. Pronikají do renálních tubulů, zde probíhá další buněčné množení a diferenciací vedoucí k produkci malakospor v ledvinových tubulech (Morris & Adams 2008). Spory z ledvinových tubulů se následně uvolňují močí do vody a později infikují mechovky (Grabner & El-Matbouli 2008).



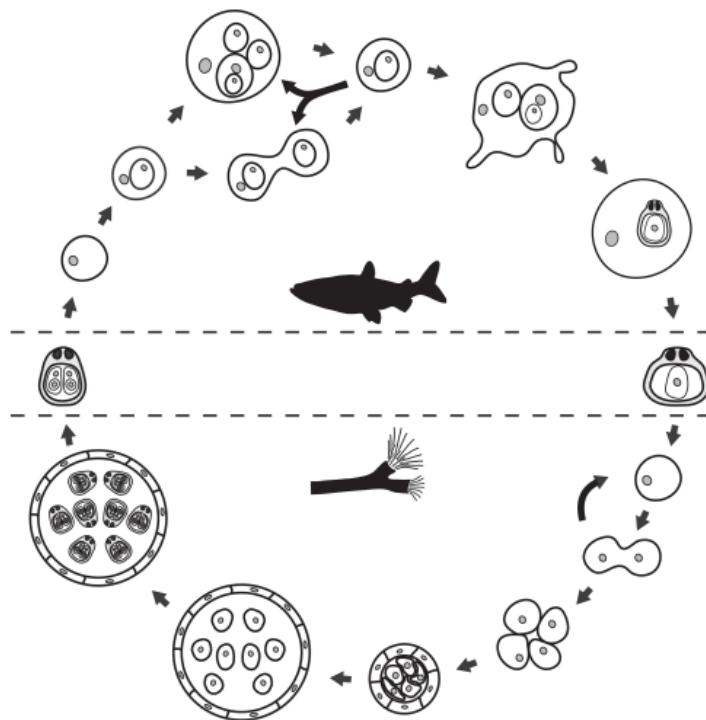
**Obrázek 3.** Životní cyklus *Tetracapsuloides bryosalmonae* (převzato z Gruhl, 2015).

### 1.1.3.2. Životní cyklus myxosporeí

Ačkoliv je v současné době dobře známo, že životní cyklus myxosporeí (Obrázek 4) zahrnuje dva hostitele, poměrně dlouhou dobu se mělo za to, že se myxospory přenášejí přímo z ryby na rybu. Studie Wolfa & Markiwa (1984) však prokázala, že životního cyklus druhu *Myxobolus cerebralis* má dvě fáze a k jeho dokončení je potřeba máloštětinatce jako hostitele (Feist & Longshaw, 2006). Obecně známější je fáze, která vede k produkci myxospor a probíhá u nižších obratlovců, typicky u ryb, vzácně u obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Druhá fáze, vedoucí k produkci aktinospor, probíhá v kroužkocích, zřídka u sumýšovců (Lom & Dyková, 2006).

Po pohlcení myxospor máloštětinatcem dochází k uvolnění polárního vlákna a ukotvení parazita v hostiteli. Chlopně se oddělují podél suturální linie, améboidní sporoplazmy se uvolňují a pronikají mezi epiteliální buňky stěny střeva. Cyklus prochází třemi fázemi – schizogonií, gametogamií a sporogonií. Zralé aktinospor jsou uvolňovány do lumen máloštětinatců, a do prostředí jsou uvolňovány defekací nebo po smrti hostitele. Stádium aktinospor je infekční pro rybího hostitele.

Při kontaktu s hostitelem jsou polární vlákna vytlačena z aktinospory a ukotvena k hostiteli. Preferovaným vstupním bodem jsou například hlenové buňky (Yokoyama & Urawa, 1997). Sporoplazma proniká do hostitele, její buněčná stěna se rozpadá a vnitřní sekundární buňky napadají okolní hostitelské buňky. Vzniká stádium „buňka v buňce“, kdy se uvnitř primární buňky nachází endogenně vzniklé sekundární buňky (Hausmann & Hülsmann 2003). Tato stádia migrují do tkání definitivní infekce, kde proliferují a vyvíjí se v plazmodium. Ty se rozdělují dle typu lokalizace ve tkáni na coelozoické (v tělních dutinách) a histozoické (ve tkáních). Původní generativní buňky prochází dělením a diferenciací za vzniku sporoblastů, které po dozrání dávají vznik myxosporám (Wolf & Markiw, 1984). Mělo se za to, že většina histozoických myxospor opouští hostitele až po smrti a jeho rozkladu (Lom et al., 1987), existují však také důkazy, že se tyto myxospory uvolňují do prostředí, když je rybí hostitel stále naživu (Yokoyama, 2003). Myxospory jsou pohlceny máloštětinatcem a cyklus se uzavírá.



**Obrázek 4.** Životní cyklus *Myxobolus cerebralis* (převzato z Gruhl, 2015).

#### 1.1.4. Ekonomický význam

Myxozoa mají značný hospodářský a ekonomický význam. Parazity působená onemocnění jsou nejvýznamnějšími překážkami pro úspěšnou produkci ryb v akvakulturách a jsou zodpovědné za 20 % úmrtnosti ryb (Dadar et al., 2016). Mezi myxozoi nalezneme druhy, které mohou způsobovat závažná onemocnění a znatelné úhyny ryb jak ve sladkovodním, tak mořském prostředí. Infekce může snížit kvalitu masa a způsobit dokonce jeho neprodejnost. U volně žijících populací jsou nákazy myxozoi jedním z významných faktorů snižujícím její velikost (Feist & Longshaw, 2006). Infekci postihuje celou řadu tkání a orgánů.

Infekce žaber sama o sobě způsobuje snížení dýchacích schopností, narušení žaberního epitelu uvolněním myxospor však může navíc poskytnout cestu vstupu pro sekundární infekce. Dle Molnára (2002) lze rozlišit intralamelární epiteliální a intralamelární vaskulární formy. Jedním z druhů infikujících žábry ryb v ČR je *Sphaerospora molnari*. Ta byla hlášena u kapra obecného a karase obecného ve studii Dyková & Lom, (1988). Infekce vede ke středně těžké až těžké hyperplazii žáber a část respiračního epitelu je nahrazena sporogonickými stádii. U lehkých infekcí dochází k lokálním poruchám prokrvení a dystrofickým změnám (Feist & Longshaw, 2006). Proliferativní onemocnění žaber neboli „hamburger gill disease“ způsobené extrasporogonálním stádiem druhu *Henneguya ictaluri* je jedním z ekonomicky významných příkladů. Toto onemocnění má za následek vysokou úmrtnost mezi mladými chovanými sumci, u kterých parazit vyvolává silnou granulomatózní zánětlivou reakci v žábrách (Pote et al., 2000).

Nejnámější nemoc způsobována myxozoy je vrthohlavost pstruhů (z ang. Whirling disease). Jejím původcem je *Myxobolus cerebralis*, který napadá chrupavku. Infekce chrupavky mohou vést k její hypertrofii a zánětu okolních tkání (Feist & Longshaw, 2006). Klinické příznaky onemocnění zahrnují melanizaci ocasní oblasti a skeletální deformity. Má se za to, že charakteristický „vířivý“ pohyb a infikovaných ryb je důsledkem sevření a tlaku na míchu (Rose et al., 2000).

Ledviny jsou hlavním cílovým orgánem velkého množství druhů myxozoi. Indukují v nich významnou patologickou odpověď hostitele, která vede k onemocněním jako je proliferativní onemocnění ledvin (PKD) lososovitých, způsobená druhem *Tetracapsuloides bryosalmonae*, a sphaerosporóza u kaprů, způsobená druhem *Sphaerospora renicola*. Infekce se může projevovat jako akutní či chronický zánět až po rozsáhlou tkáňovou

nekrózu a fibrózu. Renální poškození může být rozsáhlé a vést tak k funkčnímu poškození (Feist & Longshaw, 2006). Infekce *T. bryosalmonae* jsou odpovědné za vážné ekonomické ztráty v chovech lososovitých po celé Evropě a Severní Americe (Feist et al., 2001; Wahli et al., 2002). Spolu s *Ceratonova shasta* je to druh, který byl kosmopolitně rozšířen člověkem (Hallet & Bartholomew, 2012). Nedávné studie zkoumající účinky změny klimatu na rybí patogeny navíc prokázaly že v blízké budoucnosti vyšší teploty podpoří eskalaci propuknutí PKD (Waldner et al., 2020).

## 1.2. Mitochondrie

Eukaryotické buňky obsahují mitochondrie. Ty se považují za pozůstatky bakterií, které nyní přežívají jako vysoce odvození symbionti (Andersson, & Kurland, 1999). Jejich přítomnost je jedním z hlavních odlišujících rysů eukaryot od prokaryot. Mitochondrie jsou notoricky známé jako „buněčná elektrárna“, jelikož typicky generují většinu ATP zásadního pro přežití buněk (Pagliarini & Rutter, 2013). Kromě již zmíněné produkce ATP v těchto organelách probíhají další zásadní reakce, a to například štěpení cukrů a mastných kyselin s dlouhým řetězcem, syntéza steroidů a lipidů či replikace, transkripce, translace DNA a proteinů (McBride et al., 2006). Ačkoliv jsou tedy mitochondrie primárně vnímány jako bioenergetické a biosyntetické organely, které autonomně koexistují v buňce, poslední dvě desetiletí poskytla důkaz, že navíc fungují jako signální organely. Tyto organely tedy neustále komunikují s cytosolem a iniciují biologické děje za homeostatických a stresových podmínek (Navdeep, 2015).

### 1.2.1. Původ a funkce

Mitochondrie mají dvojitou membránu. Vnější membrána odděluje mitochondrie od cytosolu, vnitřní membrána je invaginována a tvoří kristy (Taanman, 1999). Tyto membrány obklopují hustou matrix, která obsahuje enzymy intermediárního metabolismu a mnohonásobné kopie genomu, který kóduje několik vnitřních membránových proteinů a RNA potřebné pro jejich translaci (Frey & Mannella, 2000).

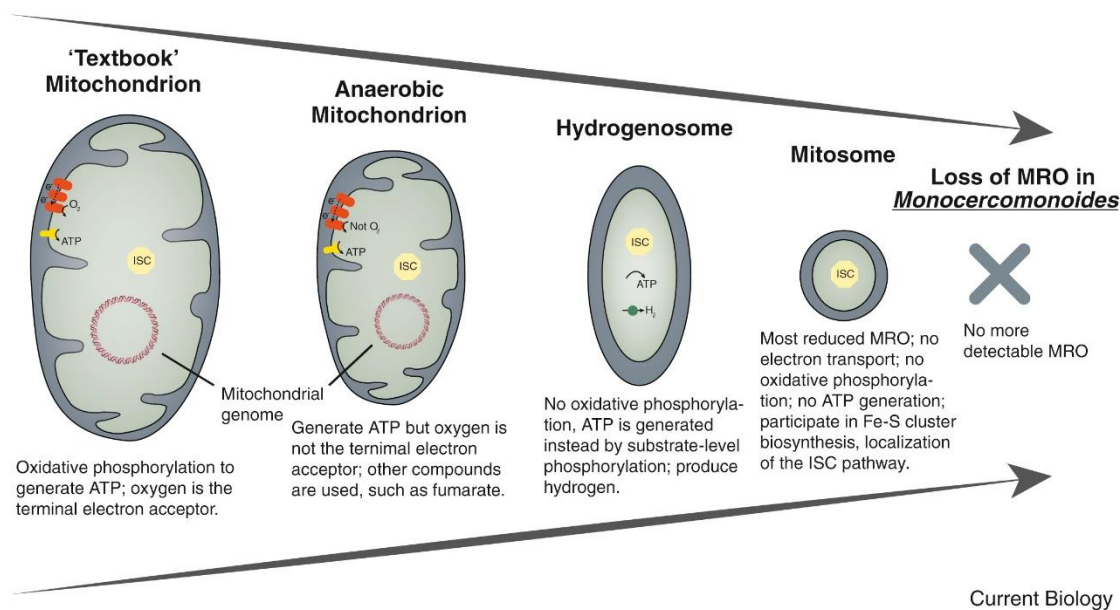
V roce 1970 Lynn Margulisová ve své knize *Origin of Eukaryotic Cells* oživila dlouhotrvající myšlenku, že se mitochondrie a plastidy vyvinuly z volně žijících bakterií prostřednictvím symbiózy v eukaryotické hostitelské buňce. Technologický vývoj v oblasti

sekvenování DNA v 70. a 80. letech 20. století dopomohl podrobné charakterizaci mitochondriálních genů, které byly zásadní pro potvrzení této teorie. Z pohledu genomu, který obsahuje, je mitochondrie nezpochybnitelného bakteriálního původu, pocházejícího z bakteriálního kmene  $\alpha$ -Proteobakterie (Gray, 2012). Časem byl tento bakteriální endosymbiont redukován na vysoce závislou organelu, přičemž velká většina jeho genů byla buď ztracena, nebo přenesena do eukaryotického jádra (Andersson & Kurland, 1999).

Nejzásadnější funkcí mitochondrie je dýchací řetězec, který obsahuje pět enzymových komplexů (komplex I–IV) umístěných na vnitřní mitochondriální membráně. Každý komplex se skládá z více podjednotek, kdy nejvíce podjednotek (více než 40 polypeptidových složek) má komplex I. Redukované kofaktory (FADH<sub>2</sub> a NADH) generované metabolismem sacharidů, proteinů a tuků poskytují elektrony komplexu I a komplexu II. Tyto elektrony proudí mezi komplexy po elektrochemickém gradientu a jsou přenášeny komplexy III a IV a dvěma mobilními elektronovými nosiči (ubichinonem a cytochromem c). Uvolněnou energii využívají komplexy I, III a IV k pumpování protonů (H<sup>+</sup>) do mezimembránového prostoru. Tento protonový gradient generující většinu mitochondriálního membránového potenciálu, je využit komplexem V k syntéze adenosintrifosfátu (ATP) z adenosindifosfátu (ADP) a anorganického fosfátu (Chinnery & Schon, 2003).

### **1.2.2. Deriváty mitochondrií**

U některých organismů můžeme pozorovat redukcí některých částí či dokonce celého genomu jako součást adaptace na anaerobní životní styl. Takto redukované mitochondrie nazýváme „mitochondrion related organelles“ (MRO). Tyto organely (Obrázek 5), známé jako hydrogenosomy, mitosomy nebo mitochondriální organely (MLO), jsou ve srovnání s klasickými mitochondriemi redukovány jak strukturně, tak biochemicky (Shiflett & Johnson, 2010). Jejich společnými charakteristikami jsou přítomnost dvojité membrány a enzymů zapojených do biosyntézy FeS klastrů (Hackstein et al., 2006). Hydrogenosomy a mitosomy tak nesou evoluční dědictví mitochondrií v eukaryotických anaerobečních organismech (Tachezy, 2019).



**Obrázek 5.** Evoluce redukce mitochondriálního genomu (převzato z Burki, 2016).

### 1.2.2.1. Hydrogenosomy

Hydrogenosomy byly poprvé popsány v roce 1973 ve studii Lindmark & Müller u bičenky dobytčí (*Tritrichomonas foetus*) parazitující v reprodukčním traktu dobytka a zažívacím traktu koček (Gookin et al, 2004). Lindmark & Müller zjistili, že hydrogenosomy jsou místem fermentačního metabolismu pyruvátu vedoucího k produkci ATP a molekulárního vodíku (Shiflett & Johnson, 2011). Přestože většina hydrogenosomů postrádá genom, nálevník *Nyctotherus ovalis* si zachoval jeho část kódující geny *nad2*, *nad4L*, *nad5* a *nad7* (van Hoek et al., 2000).

### 1.2.2.2. Mitosomy

Další redukovanou mitochondriální organelou jsou mitosomy. Byly nalezeny v anaerobních nebo mikroaerofilních organismech jako jsou archaméba *Entamoeba histolytica* (Mai et al., 1999), diplomonáda *Giardia intestinalis* (Tovar et al., 2003), mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka et al., 2001) či výtrusovec *Cryptosporidium parvum* (Henriquez et al. 2005). Metabolické procesy mitosomu ještě nejsou plně popsány a prozatím je jim přisuzována pouze biosyntéza FeS klastrů (Goldberg et al. 2008), což je tedy spojuje s mitochondriemi a hydrogenosomy. Výjimku však představuje *E. histolytica*, u které je dráha biogeneze FeS-klastru lokalizována mimo mitosom (Aguilera et al., 2008).



### 1.2.3. Mitochondriální DNA

Mitochondrie mají na rozdíl od většiny ostatních organel malé množství své vlastní DNA, která je známá jako mitochondriální DNA (mtDNA) či mitochondriální genom (mitogenom). Tato DNA kóduje řadu klíčových proteinů dýchacího řetězce. Každá mitochondrie obsahuje jednu či více jejích kopií, které se nacházejí v mitochondriální matrix (Mishra & Chan, 2014). Na rozdíl od jaderné DNA (nDNA) je mtDNA zabalena řadou proteinů podobně jako bakteriální chromozom (Yan et al., 2019).

#### 1.2.3.1. mtDNA živočichů

Typický živočišný mitogenom kóduje 13 proteinů patřících do čtyř enzymových komplexů dýchacího řetězce, a to cytochrom b (cob), dvě podjednotky ATP syntázy (atp 6,8), tři podjednotky cytochrom c oxidázy (cox1–3) a sedm podjednotek dehydrogenázy NADH (nad1–6, 4L). Mimo proteiny mitogenom dále kóduje RNA malé a velké (rrnS, rrnL) podjednotky mitochondriálních ribozomů (Bernt et al., 2013) a řadu tRNA.

Odchytky od typické organizace genů jsou relativně vzácné. Nejčastěji dochází ke ztrátám genů tRNA. Tuto ztrátu můžeme běžně pozorovat u láčkovců, kde je ztráta většiny tRNA běžným jevem (Haen et al., 2010) či u vířníků (Suga et al., 2008) a drápkovců (Braband et al., 2010), kde dochází k částečným ztrátám. Nejčastěji chybějícím protein kódujícím genem je atp8. Chybí například u některých měkkýšů (Boore, 1999) a dle studie Gissi et al., (2008) se tento gen ztrácí v rozptýlených případech ve všech hlavních větvích metazoi. Vzhledem ke krátké a rychle se vyvíjející sekvenci genu však zůstává nejisté, jestli se jedná o opravdovou ztrátu genu nebo jen o pouhé selhání jeho detekce (Bernt et al., 2013). K odchytkám však nedochází pouze v organizaci genů, ale i na strukturní úrovni. Dochází například k rozpadu mitogenomu na několik chromozomů. Tento fenomén je popsán například u stejnonožců (Raimondet al., 1999), vířníků (Suga et al., 2008), hlístic (Armstrong et al., 2000) či vší (Cameron et al., 2011).

#### 1.2.3.2. mtDNA žahavců

Pokud se zaměříme na kmen žahavců, odchytky v mtDNA jsou poměrně výrazné. Mají odlišný jak obsah a organizaci genomu, tak i jeho strukturu. Variace v obsahu genů se projevuje ztrátou většiny genů tRNA nebo přítomností intronů (Chen et al. 2008) a duplikovaných genů (Kayal & Lavrov 2008). Původní cirkulární molekulu mají pouze

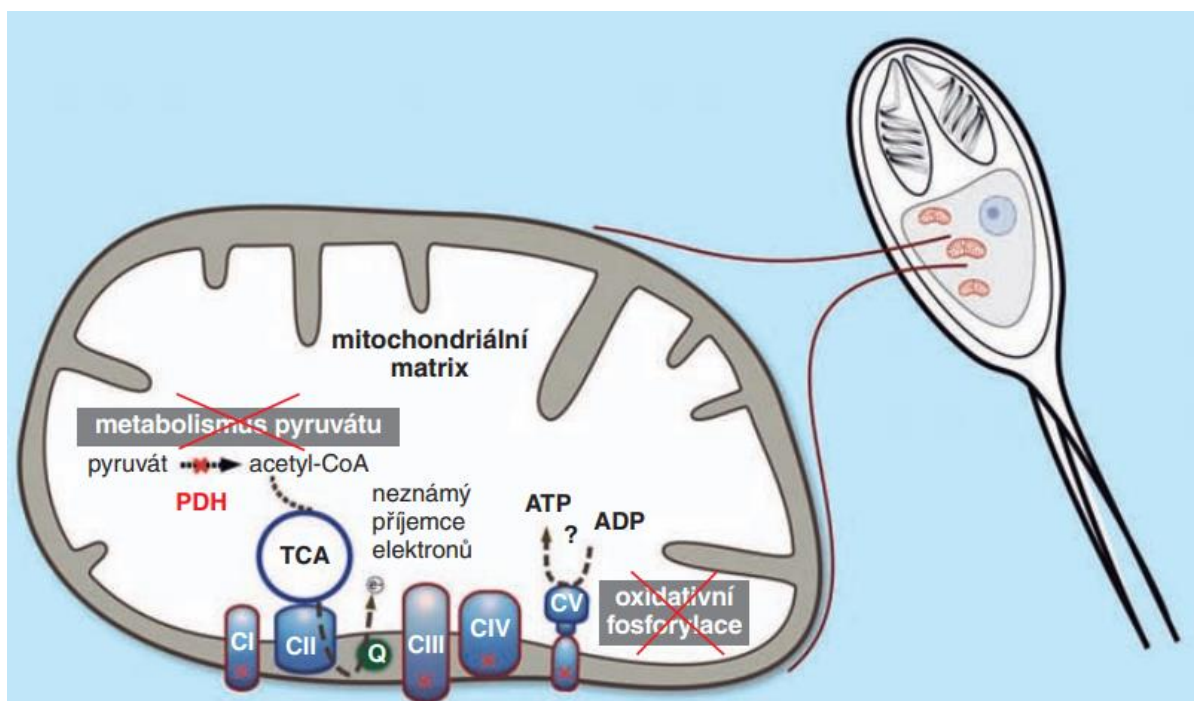
korálnatci (Medina et al., 2006), u ostatních tříd žahavců došlo k její linearizaci. Tyto lineární molekuly navíc u některých tříd podléhají fragmentizaci. Čtyřhranky mají genom fragmentovaný na osm lineárních chromozomů (Smith et al., 2012) a *Hydra magnipapillata*, zástupce polypovců, na dva lineární chromozomy (Voigt et al., 2008).

Mitochondriální genom druhu *Polypodium hydriforme*, u kterého byl na základě studie Chang et al. (2015) potvrzen často zmiňovaný příbuzenský vztah s myxozoi, byl popsán v roce 2022 (Novosolov et al., 2022). Jeho odhadovaná velikost je 93,065 bp a obsahuje 70 kb nekódující oblasti obsahující především repetice. Jedná se tedy o největší kruhový mitochondriální genom, který byl doposud u zvířat popsán. V kódující oblasti byly identifikovány protein kódující geny pro *atp6*, *cox1-3*, *nad1-6*, a *cob*. Organizace genů se výrazně liší od ostatních žahavců (včetně myxozoi). Jedinou podobností je umístění genu *cox1* na konci kódující oblasti a nepřítomnost mt tRNA.

### 1.2.3.3. mtDNA myxozoi

Mitochondrie myxozoi mají vysoce odlišné struktury genomu s neobvykle vysokou evoluční rychlostí (Takeuchi et al., 2015). Doposud byl publikován mitogenom druhů *Kudoa septempunctata*, *K. hexapunctata* a *K. iwatai*, (Takeuchi et al., 2015), dále pak taky druhů *Enteromyxum leei* (Yahalomi et al., 2017) a *Myxobolus squamalis* (Yahalomi et al., 2020). Mitogenom druhu *E. leei* se skládá z osmi cirkulárních molekul s velikostí od 23,997 do 22,093 bp a jeho velikost je výrazně větší než u ostatních myxozoi. Každý z chromozomů obsahuje konzervativní oblasti, které jsou identické až na výjimky u chromozomu 7 a 8. U tohoto druhu byly identifikovány geny pro *cox1*, *cox2*, *cob*, *nad1* a *nad5*, kdy každý z nich byl nalezen na jiném chromozomu. Na každém chromozomu byl také kódující gen ribozomální RNA, kdy na chromozomu 7 a 8 je kódován na reverzním vlákně (Yahalomi et al., 2017). Poměrně jednodušší jsou mitogenomy druhů, *K. hexapunctata* a *K. iwatai*, které se skládají pouze z jedné cirkulární molekuly o velikosti 18,219 bp a 15,442 bp. Nachází se na ní geny pro *cox1*, *cox2*, *cob*, *nad1*, *nad3*, *nad5*, *nad6*, *rns* a *rnl*. Další zástupce rodu *Kudoa*, *K. septempunctata*, má genom rozdělený na dvou molekulách o velikosti 19,425 a 19,350 bp. Na každém byly identifikovány geny pro *cox1*, *cox2*, *cob*, *nad1*, *nad5*, *nad6* a *rnl* s *rns*. Druh *Myxobolus squamalis* má stejně jako druhy *K. hexapunctata* a *K. iwatai* pouze jednu cirkulární molekulu s *nad1*, *nad5* a *rnl* s *rns* geny.

V roce 2020 Yahalomiho tým přišel s pozoruhodným objevem. *Henneguya salmonicola* postrádá mitochondriální genom a je tedy vůbec prvním živočichem, který ztratil schopnost buněčného dýchání. Během studie dvou příbuzných druhů (*Henneguya salmonicola* a *Myxobolus squamalis*) nebyly u *H. salmonicola* schopni identifikovat žádné mitochondriální geny. Toto zjištění bylo dále potvrzeno pomocí DAPI barvení. Během transkriptomické analýzy bylo zjištěno, že téměř všechny proteiny kódované jádrem zapojené do replikace a translace mt genomu u *H. salmonicola* chyběly. Zajímavé dále je, že se u tohoto druhu gen podjednotky gama-1 mtDNA polymerázy vyskytuje jako pseudogen. Obsahuje totiž tříbodové mutace, které vytvářejí předčasné stop kodony, a proto *H. salmonicola* nemá žádný replikační aparát mtDNA. Dále také chybí geny komplexů I, III a IV dýchacího řetězce a geny kódující podjednotku protonového kanálu komplexu V (Obrázek 6). Předmětem diskuzí tedy bylo, jaké MRO (viz. Kapitola 1.2.2.) se u tohoto druhu nachází. Jelikož získané assembly neobsahovaly žádné hydrogenázy, nejedná se o hydrogenosomy. Na druhou stranu tato organela sdílí některé znaky s mitosomy kryptosporidií, a to přítomnost krist a ztrátu genů komplexů I, III a IV. Přítomnost krist a pseudogenů by mohla znamenat, že ztráta mitogenomu je u tohoto druhu poměrně recentní záležitost dle autorů poháněna anaerobním prostředím v obou hostitelích.



**Obrázek 6.** Schematické znázornění přerušené dráhy aerobní respirace v mitochondrii *Henneguya salmonicola* (převzato z Bartošová-Sojková P., Fiala I., 2020).

#### 1.2.4. Mitochondriální DNA jako molekulárně genetický marker

Molekulárně genetické markery jsou segmenty genomu poskytující molekulární informace umožňující diferenciaci taxonů (Grover & Sharma., 2016). Jejich použití se osvědčilo nejen pro identifikaci a objevování nových druhů, ale také pro objasnění vztahů mezi skupinami organismů v systematických studiích (Wiens, 2007).

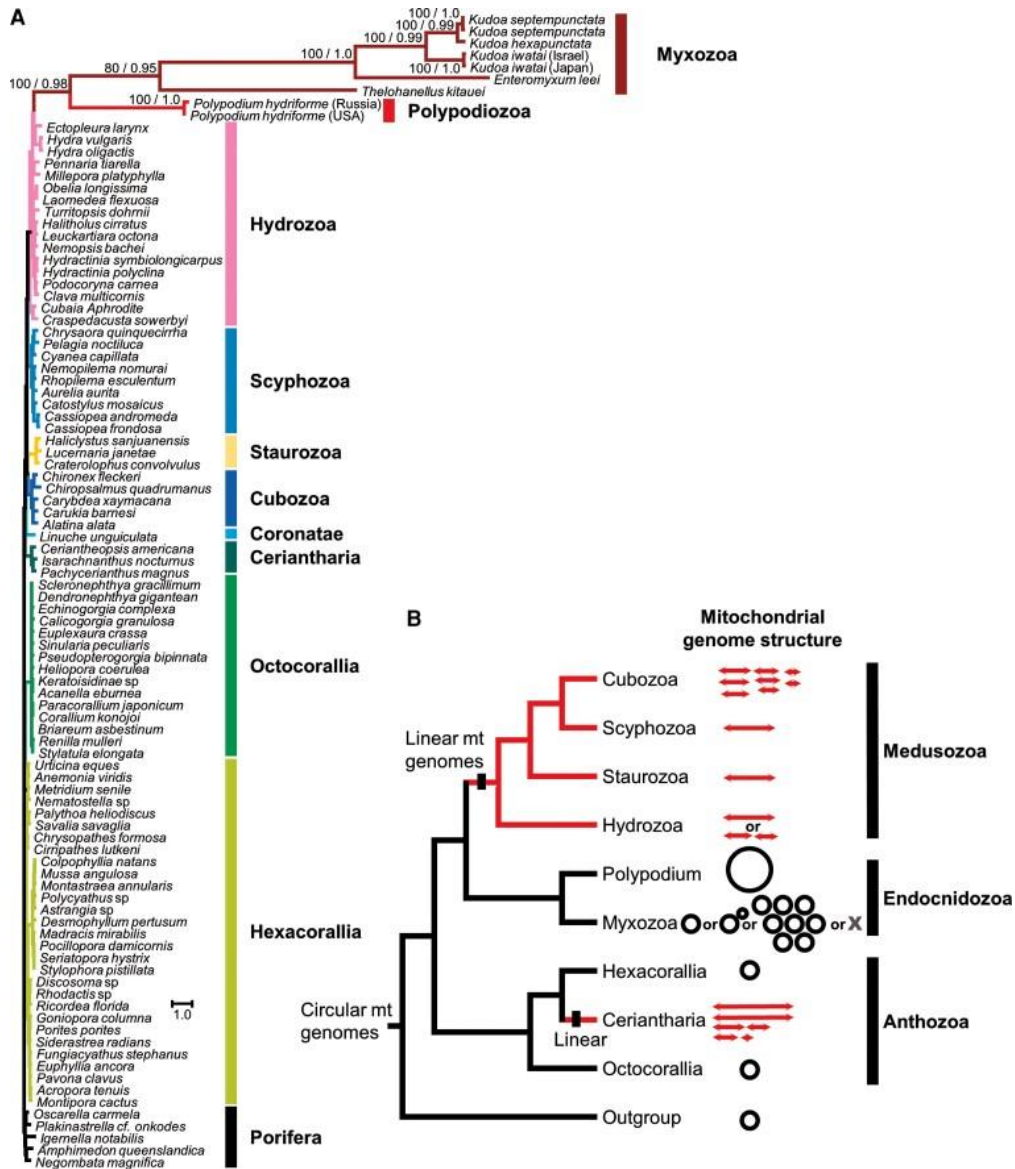
Markery mohou být navrženy buď z jaderného či mitochondriálního genomu. Užitečnost a rozlišení každého genetického markeru závisí na stupni variace sekvence markeru (Blasco et al., 2016). Ve srovnání s jadernou DNA (nDNA) se mitochondriální DNA (mtDNA) vyvíjí rychleji, a tím vytváří vyšší stupeň sekvenční variace, což z ní činí užitečný zdroj markerů pro rozlišení nižších taxonomických úrovní pro organismy (Hwang & Kim, 1999) či nedávno divergovaných linií (Harrison, 1989). Naopak nDNA jsou více konzervativní než mtDNA. Vysoce konzervované oblasti jsou užitečný zdroj genetických markerů pro rozlišení vyšších taxonomických úrovní pro organismy (Choudhary et al., 2015). Příkladem využití mtDNA markerů je úspěšná mezidruhová determinaci mezi několika druhy helmintů jako jsou *Taeniae* spp., *Echinostoma* spp. a *Schistosomy* spp. nebo *Trichuris* spp. (Gasser, 1999; Poon, 2017; Callejon, 2013). V rámci mtDNA zahrnují příklady genetických markerů geny kódující protein podjednotky I cytochrom c oxidázy (COI) a genů podjednotky 1 dehydrogenázy NADH (NAD1) spolu s geny 12S a 16S ribozomální RNA (rRNA) (Chan et al., 2021).

U živočichů je tedy analýza mitochondriálních genomů mocným nástrojem k odvození fylogenetických vztahů na různých taxonomických úrovních (Boore, 2006). Poměrně malá velikost molekuly, její hojnost v tkáních, ortologie kódovaných genů, přítomnost genů či oblastí vyvíjejících se různou rychlostí, uniparentální dědičnost a absence rekombinace (Elson & Lightowers, 2006) totiž činí z této molekuly spolehlivý a snadno použitelný fylogenetický marker (Gissi et al., 2008).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1.1, fylogenetické zařazení myxozoí bylo poměrně dlouho dobou složitou otázkou. Studie založené na jaderné ribozomální RNA (rRNA) a housekeeping genech podávaly rozporuplné informace (Smothers et al., 1994, Jiménez-Guri et al., 2007, Evans et al., 2010). Fylogeneze založená na jaderných genech rRNA zařadila Myxozoa do bilaterií, (Smothers et al., 1994). Oproti tomu fylogeneze některých housekeeping genů (Jiménez-Guri et al., 2007) naznačovala, že tato skupina patří k žahavcům. Mitochondriální genom by tedy mohl poskytnout další pohled na evoluci těchto zvířat.

I tato cesta má ale několik překážek. Například i poměrně konzervativní mitochondriální geny myxozoi podlely v průběhu evoluce zásadním změnám v důsledku vysoké evoluční rychlosti, a tedy identifikování mitochondriálních sekvencí v milionech nukleotidových bází DNA celkové genetické informace myxozoi je velmi nesnadné (Bartošová-Sojková & Fiala, 2020).

Dle poslední studie zabývající se mitochondriálním genomem druhu *Polypodium hydriforme* (Novosolov et al., 2022) je evoluce mitogenomů u žahavců složitější, než se dříve předpokládalo (Obrázek 7). Jak Myxozoa, tak *P. hydriforme* v této studii, v souladu s předchozími studii (Lavrov & Pett 2016; Yahalomi et al. 2017), vykazují extrémně vysokou evoluční rychlost. Z délky větví a nízkého počtu identifikovaných mitochondriálních genů, vyplývá, že evoluční rychlost je u myxozoi ještě vyšší, než u druhu *P. hydriforme*. Dále pak *P. hydriforme* a Myxozoa sdílejí ztrátu tRNA. Tyto molekulární znaky definující architekturu mitogenomu tak poskytují další důkaz příbuzenského vztahu myxozoi, parazitického druhu *P. hydriforme* a medusozoi.



**Obrázek 7.** Fylogenetické analýzy mitochondriálních genomů žahavců. (A) Fylogenetický strom pěti konkatenovaných protein kódujících genů (*cox1*, *cox2*, *cytb*, *nad1*, *nad5*). (B) Evoluce struktury mmitogenu žahavců. Červeně je označen lineární mitogenom a černě potom cirkulární mitogenom (převzato z Novosolov et al., 2020).

## 2. Cíle práce

Tato práce měla tři hlavní dílčí cíle:

- 1) Získat kompletní či částečný mitochondriální genom vybraných zástupců myxozoi z různých evolučních linií.
- 2) Popsat charakter genomu a zjistit, zdali je fragmentace genomu jev vyskytující se ve více evolučních liniích myxozoi.
- 3) Na základě získaných dat rekonstruovat evoluci mitochondriálního genomu myxozoi.

Dodatečným cílem bylo pokusit se pomocí transmisní elektronové mikroskopie vizualizovat mtDNA a nahlédnout na strukturu mitochondrií myxozoi.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Studijní materiál

Pro splnění jednotlivých cílů bylo vybráno 5 druhů myxozoí (Tabulka 1) patřících do různých vývojových linií. Vybranými druhy byly *Sphaerospora molnari*, *Myxidium lieberkuehni*, *Nephrocystidium pickii*, *Zschokkella nova* a *Zschokkella* sp.

Druhy *N. pickii*, *M. lieberkuehni* a *Z. nova* byly vyizolovány pitvou ryb získaných v České republice. Vzorky druhu *Zschokkella* sp. byly izolovány z tresky *Gadus morhua* během kurzu Mořské parazitologie (v roce 2022) v oblasti Norského moře v zátocě Kvernesfjorden (Obrázek 8), oblasti Vevang (Norsko). *S. molnari* je modelovým organismem naší laboratoře a jeho vzorky jsou neustále k dispozici. Sekvenační data mitochondriálního genomu mi byla poskytnuta školitelem před začátkem diplomové práce.

**Tabulka 1.** Seznam analyzovaných druhů v této práci.

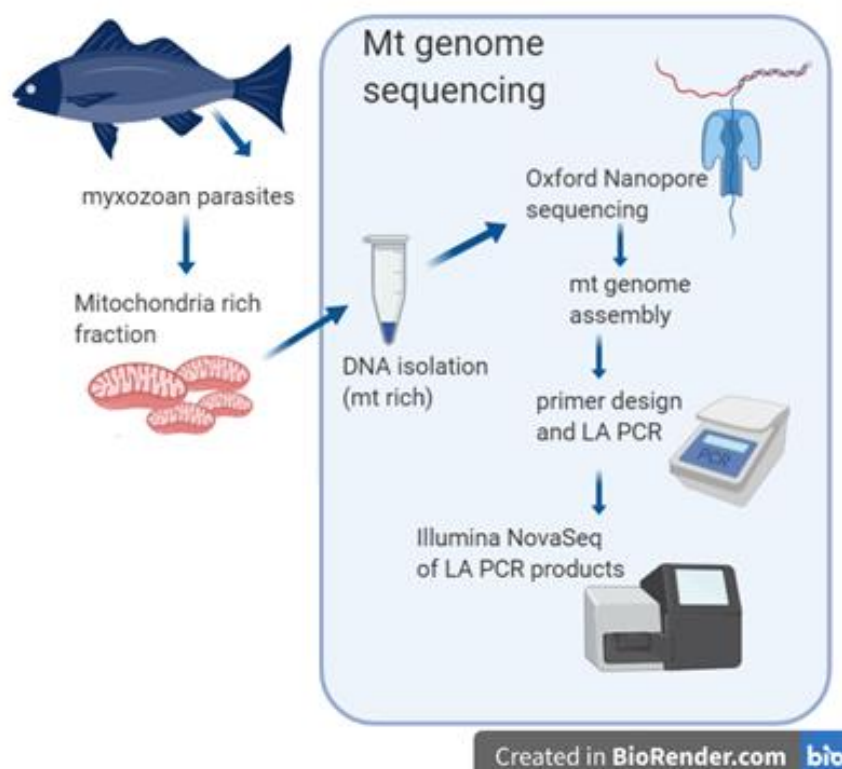
Druh	Hostitel	Orgán	Lokalita
<i>Sphaerospora molnari</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	krev	ČR
<i>Myxidium lieberkuehni</i>	<i>Esox lucius</i>	močový měchýř	Třeboňsko – ČR
<i>Nephrocystidium pickii</i>	<i>Esox lucius</i>	ledviny	Třeboňsko – ČR
<i>Zschokkella nova</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	žlučník	Třeboňsko – ČR
<i>Zschokkella</i> sp.	<i>Gadus morhua</i>	žlučník	Vevang – Norsko



**Obrázek 8.** Mapa s vyznačenými oblastmi odchyту *Gadus morhua* pro následnou izolaci druhu *Zschokkella* sp. (Zdroj: GoogleEarth).



Vzorky byly výchozím materiálem pro následnou izolaci mitochondriální frakce a izolaci mitochondriální DNA. Metodicky následovalo Oxford Nanopore sekvenování, design specifických primerů, PCR, BTseq sekvenování a bioinformatická analýza (Obrázek 9).



**Obrázek 9.** Grafické znázornění postupu práce (Fiala).

### 3.1.1. Metodika sběru materiálu

Pro sběr vzorků druhu *Zschokkella* sp. bylo nutné odchyty ryb, ke kterému byly využity rybářské sítě (tenata) kladené do různých hloubek. Sítě byly na místě ponechány po dobu 24 hodin. Chycené ryby byly přepraveny do laboratoře, humánně usmrceny a vypitvány. Následovalo vyšetření orgánů na přítomnost parazitů. Vzorky nalezených parazitů byly rozděleny a uchovány v lednici, mrazáku, pufu či v 96% ethanolu.

Pro sběr zbylých vzorků byly využity zakoupené ryby, či ryby z laboratorního chovu. Tyto ryby byly humánně usmrceny a vypitvány. Získaní paraziti byly uchováni v lednici, mrazáku, pufu či v 96% ethanolu.

### **3.2 Izolace mitochondriální frakce**

Základním bodem pro všechny metody využívané v této práci bylo získání na mitochondrie obohacené frakce. Frakce byla extrahována pomocí komerčně dodávaného kitu firmou Abcam (Cambridge) (ab110171). Před samotnou izolací mitochondrií bylo z důvodu pevné schránky spor nutno vzorek zhomogenizovat za pomoci zirkonových kuliček v bead-beateru. Následovala extrakce mitochondrií dle instrukcí dodavatele kitu. Takto vyzolovaná frakce byla následně využita k izolaci mitochondriální DNA a k mikroskopickým analýzám.

### **3.3 Izolace mitochondriální DNA**

K izolaci mitochondriální DNA bylo využito fenol-chloroformové metody. K mitochondriální frakci v 400  $\mu$ l TNES-Urea pufru (10mM Tris-HCL, 125mM NaCl, 10mM EDTA, 0,5% SDS a 4M urea) bylo přidáno 4  $\mu$ l proteinázy K (100  $\mu$ g/ml, Serva). Vzorek byl přes noc inkubován v termobloku při teplotě 55°C. Ke zlyzovanému vzorku bylo přidáno 400  $\mu$ l fenolu. Po dobu 10 min byla směs promíchávána převrácením a následně 10 min centrifugována při rychlosti 9 000 rpm a pokojové teplotě. Došlo ke vzniku rozdělených fází. Svrchní fáze byla odebrána do nové zkumavky a smíchána s 400  $\mu$ l chloroform:isoamylalkoholu (v objemovém poměru 24:1). Byly opakovány kroky promíchávání převrácením a centrifugace se stejnou rychlostí. Byla odebrána svrchní fáze, ke které bylo přidáno 400  $\mu$ l chloroformu. Znovu byly opakovány kroky promíchávání převrácením a centrifugace se stejnou rychlostí. Svrchní vrstva obsahující DNA byla přenesena do nové zkumavky, smíchána s 900  $\mu$ l vychlazeného, 92% ethanolu a 20 min centrifugována (14 000 rpm při teplotě 4°C). Finální pročištění proběhlo pomocí 900  $\mu$ l vychlazeného, 70% ethanolu a centrifugováním po dobu 5 minut rychlostí 14 000 rpm při 4 °C. Pročištěný vzorek byl inkubován v termobloku při teplotě 45 °C do doby, než byl pelet plně vysušen. Vysušený pelet byl rozsuspendován v 100  $\mu$ l deionizované vody. Vzniklý roztok DNA byl použit k následným mikroskopickým či molekulárním analýzám.

### **3.4. Oxford Nanopore sekvenování**

Z mitochondriální frakce vyizolovaná DNA byla zaslána na sekvenaci metodou Oxford Nanopore (ON) firmou SeqMe (Dobříš, Česká republika) v objemu 100  $\mu$ l a koncentrací od 0,0970 do 5,23 ng/ $\mu$ l (měřeno Qubitom). Parametry pro sekvenační jednotku byly následující: MinION/GridION FC, single-end, 1-200 kb ready, 5-10 Gb (DS-210). Technologie ON se opírá o proteinový pór na syntetické membráně v elektrolytickém roztoku pod napětím, kterým je protahována jednořetězcová molekula DNA. Změny v iontovém proudu během průchodu molekuly DNA odpovídají nukleotidové sekvenci přítomné ve snímací oblasti a jsou dekodovány pomocí výpočetních algoritmů, které umožňují sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase (Wang et al, 2021).

Nevýhodou této metody je výskyt systematických chyb jako je například nesprávná translace získaných signálů do sekvence DNA. Oprava chyb většinou vyžaduje přídatné sekvenování s krátkými čtecími délkami (Jain et al., 2018). V této práci byly k opravě využity sekvence získané metodou BTseq.

### **3.5. PCR**

Pro ověření správnosti získaných ON readů a jejich assemblování (viz. Kapitola 3.8.) byla provedena PCR dlouhých úseků tzv. Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR), která byla využita pro amplifikaci mtDNA (Burger et al., 2007). Jejím hlavním cílem bylo „opravit“ ON sekvence s vyšší mírou chybovosti a zároveň ověřit správnost seřazení jednotlivých ON readů do kontigů. LA PCR byla také využita pro amplifikaci úseků, které se nepovedlo získat pomocí ON, tedy úseků, které by propojily jednotlivé kontigy do jedné mt molekuly v případě, že se nezdařilo již pomocí ON sekvenování.

#### **3.5.1. Navržení primerů**

Díky získaným ON readům a dostupným sekvencím již anotovaných genomů byly navrženy primery jak pro LA PCR, tak i pro standardní PCR v programu Geneious Prime 2021.1.1. a vyrobeny firmou Generi Biotech s.r.o. Primery pro LA PCR byly navrhovány tak, aby jejich délka byla alespoň 30 bp s nulovou nebo minimální hairpin a self-dimer nasedací teplotou. Přehled navržených primerů je spolu s primery získanými z literatury znázorněn v tabulkách 2,3,4 a 5. Primery byly většinou využity v různých vzájemných kombinacích pro amplifikaci dlouhých PCR produktů pro BTseq.

**Tabulka 2.** Přehled použitých primerů pro druh *N. pickii*.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>	<b>Zdroj</b>
NP_rns_LA_F	AAAGTAGCATATTAATTCTCAAAC TAAGAAGTC	Tato práce
NP_rns_LA_R	AAATAGTTTTTAAGTCTGTTCTTTTTAAGATAC	Tato práce
NP_cox1_LA_R2	TAACTCTATTATTACTAGATAAGGATGCTAATTG	Tato práce
NP_cox1_F2	CCAAAAATAACCCATTCCAAACTATAACC	Tato práce
NP_rnl_LA_F1	ACTAATTTTGAAGATAAATAAAGTCCAGTTATCC	Tato práce
NP_rnl_LA_R1	TGATGAGCCTAGAAATTTTGTTAAAAATCTTG	Tato práce
NP_rnl_LA_R2	TGAGATTTAAAAAGATGAAACATGTATTCTTATTC	Tato práce
NP_rnL_LA_F2	AGAATAAGAATACATGTTTCATCTTTTTAAATCTC	Tato práce
NP_mt_F1	GGAGACAATGGATAGATTAAGATACTAAG	Tato práce
NP_mt_F2	GAGGGTTGGTGGGTTATTAATGG	Tato práce
NP_mt_R3	TCTCATTTGAGATTAGGCYATTATAAATTG	Tato práce
NP_mt_R4	CTTRTAWAAGCTACTCCAACCTCTCC	Tato práce
NP_mt_R5	CAAATAATTCACCCTCTATTAAGCC	Tato práce
NP_mt_R6	GTTGAAAGTTCTATACGCATACAAACTG	Tato práce
NP_mt_F3	ACAATTTATAATRCCTAATCTCAAATGAG	Tato práce
NP_mt_F4	GGAGAGGTTGAGTAGCTTWTAYAAG	Tato práce
NP_mt_F5	GGCTTAATAGAGGGTGAATTATTTGG	Tato práce
NP_mt_F6	CAGTTTGTATGCGTATAGAACTTTCAAC	Tato práce
NP_mt_R2	AATCTACCATTTAATAACCCACCAACC	Tato práce
NP_mt_R1	CTTAGTATCTTAATCTATCCATTGTCTCC	Tato práce
rnl_frwMyxo-F1A	AGAGAAAKGAATTATCMDAGTA	Tato práce
rnl_frwMyxo-R1	GGVYCATTATCCTACAGG	Tato práce
rnl_frwMyxo-F2	CARTCHAGTGAAYTCGGCAA	Tato práce
rnl_frwMyxo-R2	ACRCCGYCTAAACTCAGCTCAC	Tato práce
rnl_frwMyxo-F3	GAAAYCAAATCTRAAWAAGGTG	Tato práce
rnl_frwMyxo-R3	GARRTGTCTTTAGTAAACAG	Tato práce
rnl_frwMyxo-F1B	AADHTWAGAGAAAKGAATTATC	Tato práce

**Tabulka 3.** Přehled použitých primerů pro druh *S. molnari*.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>	<b>Zdroj</b>
Sphaerom_rnl-LA-F1	ATAGTAGAAGATTTTCAGGCGCCTCGATGTTGG	Tato práce
Sphaerom_rnl-LA-R1	TTCCGTAATATCGTGGCCCAATCAAAGCATG	Tato práce
Sm_cytB_f9398LA	TAAAATAACCACTAAACCAAACCAAAGAAAAAGG	Tato práce
Sm_NADH5_r11577LA	TTTGACAAACTTTATAAGACTTGCTAGATTAG	Tato práce
Sm_cytB_r9587LA	AGTTCTGGTTTAAATTCTTCTTTTATAAGTTTGTG	Tato práce
Smcox1_f4913LA	CATATCTAAAAAACCATACCTAAAACTATTCCGG	Tato práce

**Tabulka 4.** Přehled použitých primerů pro druh *Z. nova* a *Zschokkella* sp.

Primer	Sekvence	Zdroj
Znova_rnl-LA-F1	TACTGTGAGTGACAGGCACATCGATGTTGG	Tato práce
Znova_rnl-LA-R1	ACCATTTGCACTTCACCCAATTAAGGCAAGG	Tato práce
ZN_cox1R1	GTGAATTTATATTTGGACATTATTGTATT	Tato práce
ZN_16K_F1	CAACAATCTTTATTAACACTGACGTCTAT	Tato práce
ZN_cox2_F1	ATCACATCCAACGAGGAAACAATAAC	Tato práce
ZN_cox2_F2	ATAAGCTGAGGAAGTGCATGTAACCAC	Tato práce
ZN_ND1_F1	AAGAACCTCCTCCTATATCAGTGGC	Tato práce
ZN_ND1_F2	GTCAAAGGAGTCCTACTAACCTG	Tato práce
ZN_cox1R2	TGGAATTACTATTTGTGTTAGTTTC	Tato práce
ZN_cox1F1	AATACAATAATGTCCAAATATAAATTCAC	Tato práce
ZN_ND1_R1	AATACAATAATGTCCAAATATAAATTCAC	Tato práce
ZN_ND1_R2	CAGGTTAGTAGGACTCCTTTTGAC	Tato práce
ZN_cox2_R1	GTTATTGTTTCTCCTGTTGGATGTGAT	Tato práce
ZN_16K_R1	ATAGACGTCAGTGTTAATAAAGATTGTTG	Tato práce
ZN_cox2_R2	GTGGTTACATGCACTTCCTCAGCTTAT	Tato práce
ZN_cox1F2	AGAAACTAACACAAATAGTAATAATTCC	Tato práce
ZN_rnl_F1	ATAACAAATCCAATTGCCAACTAAAGC	Tato práce
ZN_7K_R1	CTTTATGAGGTGTGTTAGAGATTGAG	Tato práce
ZN_rns_F1	AAGATACGGCAATGGAGTCAAATAAC	Tato práce
ZN_rns_F2	AATTAAGTCGTCATTGAAACTCCTC	Tato práce
ZN_cytB_F2	ACTGCCCAATAGCTCATAGAACC	Tato práce
ZN_7K_F1	TCAATCTCTAACACACCTCATAAAGTC	Tato práce
ZN_7K_F2	CTTCTTAATTTGATAAATAAGGGTTTACC	Tato práce
ZN_cox1F2	AGAAACTAACACAAATAGTAATAATTCC	Tato práce
ZN_cytB_R2	TTCTATGAGCTATTGGGCAGTG	Tato práce
Zn_cytB_F1	AGAGTGATCAAAGTAATAAAATTAACAGG	Tato práce
LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. 1994
HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. 1994
cox2F1	AAGCWAATWGGNCATCARTGRTATTG	Burger et al. 2007
cox2R1	CTCCRCATATTTTCNGARCATTGNCC	Burger et al. 2007
cox3F	TGGTGGCGAGATGTTKKTNCNGA	Burger et al. 2007
cox3R	ACWACGTCKACGAAGTGCARTATCA	Burger et al. 2007
cobF424	GGWTAYGTWYTWCWWTGRGGWCARAT	Boore et al. 2000
cobR876	GCRTAWGCRAAWARRAARTAYCAYTCWGG	Boore et al. 2000
nad4F	CCKAARGCYCAYGTKGARGCYCC	Shao et al. 2006
nad4R	GARGAWCAKAWWCRTGAGCAATYAT	Shao et al. 2006
nad5F	TWYTATTAGGKTGAGATGGKYTNNG	Lavrov et al. 2004
nad5R	TARAAKCCWGMTARAAWGGKAWWCC	Lavrov et al. 2004
12Sai-5'	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	Kocher et al. 1989
12Sb-3'	GAGGGTGACGGGCGGTGTGT	Kocher et al. 1989
rnl_frwMyxo-F1A	AGAGAAAKGAATTATCMDAGTA	Tato práce
rnl_frwMyxo-R1	GGVYCATTATCCTACAGG	Tato práce

rnl_frwMyxo-F2	CARTCHAGTGAAAYTCGGCAA	Tato práce
rnl_frwMyxo-R2	ACRCCGTYCTAAACTCAGCTCAC	Tato práce
rnl_frwMyxo-F3	GAAAYCAAATCTRAAWAAGGTG	Tato práce
rnl_frwMyxo-R3	GARRTGTCTTTAGTAAACAG	Tato práce
rnl_frwMyxo-F1B	AADHTWAGAGAAAKGAATTATC	Tato práce

**Tabulka 5.** Přehled použitých primerů pro druh *Myxidium* sp.

Primer	Sekvence	Zdroj
Mpseudo_rnl-LA-F1	TTAACCTATTTAGACCGTACATAAAAAGGATCTTAC	Tato práce
Mpseudo_rnl-LA-R1	AACTATTTTCGTGGAGAACAAGTATTATTCAAGTCC	Tato práce
LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. 1994
HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. 1994
cox2F1	AAGCWAATWGGNCATCARTGRTATTG	Burger et al. 2007
cox2R1	CTCCRCATATTTTCNGARCATTGNCC	Burger et al. 2007
cox3F	TGGTGGCGAGATGTTKKTNCNGA	Burger et al. 2007
cox3R	ACWACGTCKACGAAGTGTCTARTATCA	Burger et al. 2007
cobF424	GGWTAYGTWYTWCCWTGRGGWCARAT	Boore et al. 2000
cobR876	GCRTAWGCRAAWARRAARTAYCAYTCWGG	Boore et al. 2000
nad4F	CCKAARGCYCAYGTTKGARGCYCC	Shao et al. 2006
nad4R	GARGAWCAKAWCCRTGAGCAATYAT	Shao et al. 2006
nad5F	TWYTATTAGGKTGAGATGGKYTNNG	Lavrov et al. 2004
nad5R	TARAAKCCWGMTARAAAWGGKAWWCC	Lavrov et al. 2004
12Sai-5'	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	Kocher et al. 1989
12Sb-3'	GAGGGTGACGGGCGGTGTGT	Kocher et al. 1989

### 3.5.2. LA PCR

Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR), tedy dlouhá a přesná polymerázová řetězová reakce, používá směsi dvou různých termostabilních DNA polymeráz ke katalýze amplifikační reakce. Takto vylepšená PCR generuje vysoké výnosy a přesné kopie dlouhých úseků DNA (Green & Sambrook, 2019). V práci využívána Takara LA Taq (Clontech) kombinuje dvě polymerázy, a to Taq DNA polymerázu a DNA korekturní polymerázu s 3'→5' exonukleázovou aktivitou (Takara Bio, 2023). První z polymeráz je sice velmi účinná, ale podléhá vysoké chybovosti. Druhá polymeráza má tedy korekturní funkci 3' 5' exonukleázy a resekuje nesprávné 3' konce.

Reakce probíhala v celkovém objemu 25 µl. Reakční směs se skládala z 4 µl dNTPs (2,5 mM), 2,5 µl 10x Bufferu, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl forward primeru (0,1 mM) a reverse primeru (0,1 mM), 12,75 µl H<sub>2</sub>O, 0,25 µl polymerázy (1 jednotka, Clontech) a 1 µl DNA o přibližné koncentraci 2 ng/µl. Jednotlivé primery (Tabulky 2,3,4,5) se lišily v závislosti na zkoumaném druhu. Výchozí PCR cyklus (Tabulka 6) byl modifikován v závislosti na použitých primerech (jejich daných nasedacích teplotách) a délce předpokládaného fragmentu (1 kb/1 minuta).

**Tabulka 6.** Výchozí cyklus pro PCR amplifikaci.

	Teplota (°C)	Čas
Denaturace	95	3:00
Amplifikace (34 cyklů)	95	0:30
	60	1:00
	68	15:00
Elongace	72	10:00

### 3.5.3. Nested PCR

K amplifikaci určitých úseků mtDNA u druhu *N. pickii* byla kromě LA PCR využita tzv. nested PCR. Nested PCR byla vyvinuta pro zvýšení jak citlivosti, tak specifity PCR (Haqqi et al., 1988). Tato reakce využívá dva páry amplifikačních primerů a dvě po sobě jdoucí kola PCR. Produkty první amplifikace jsou podrobeny druhému kolu amplifikace za použití druhé sady primerů. Ty nasedají do sekvence amplifikované první sadou primerů. Zvýšená citlivost a specifita vyplývá z vysokého celkového počtu cyklů a tím, že druhá sada primerů nasedá na sekvence nalezené pouze v produktech prvního kola, a tím tak ověřuje identitu produktu prvního kola (McPherson et al., 2021).

Obě reakce probíhaly v celkovém objemu 25 µl složeného z 4 µl dNTPS (2,5 mM), 2,5 µl 10x Bufferu, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 Mm), 1 µl forward primeru (0,1 mM) a reverse primeru (0,1 mM) (Tabulky 7,8), 12,75 µl H<sub>2</sub>O, 0,25 µl polymerázy (1 jednotka, Clontech) a 1 µl DNA či PCR produktu. Pro obě reakce byl využit původní cyklus (Tabulka 6).

**Tabulka 7.** Primery použité při první sekvenační reakci.

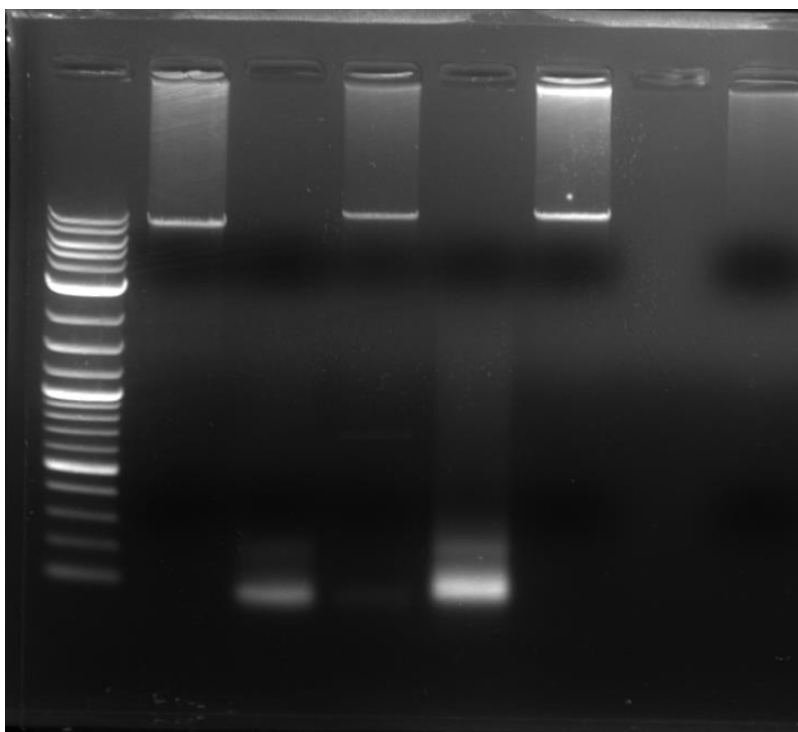
Primer	Sekvence	Zdroj
NP_rns_LA_R	AAATAGTTTTTAAGTCTGTTCTTTTTAAGATAC	Tato práce
NP_rns_LA_F	AAAGTAGCATATTAATTCTCAAACCTAAGAAGTC	Tato práce

**Tabulka 8.** Primery použité při druhé sekvenační reakci.

Primer	Sekvence	Zdroj
NP_cox_LA_F2	CCAAAAATAACCCATTCCAAACTATAACC	Tato práce
NP_cox_LA_F1	GAAAGAGGAGCATATAAAGTCCAACCAG	Tato práce

### 3.6. Gelová elektroforéza

K analýze amplifikovaných produktů byla využita gelová elektroforéza na 1% agarózovém gelu připraveného za použití TAE pufru. K roztoku gelu byl přidán Ethidium bromide (Top – Bio). Do jamek v gelu byly následně napipetovány PCR produkty, žebříček (2log ladder; New England BioLabs) a negativní kontrola. Elektroforéza probíhala na gelu při napětí 100V a pokojové teplotě po dobu 30-45 minut. Následovala vizualizace (Obrázek 10) pomocí UV transiluminátoru (FireReader V10, UVITEC). Délka výsledných fragmentů byla odhadnuta na základě použitého žebříčku. Produkty o správné velikosti byly vyříznuty a přečištěny Gel/PCR DNA Fragments Extraction kitem (Geneaid Biotech Ltd.) dle instrukcí dodavatele. Oproti originálu byl v poslední kroku nahrazen originální roztok PCR vodou.



**Obrázek 10.** Ukázka běžného výsledku elektroforézy.



### 3.7 Sekvenace

Přečištěné produkty byly sekenovány firmou SeqMe (Dobříš, Česká republika) metodou BTseq, která umožňuje pomocí NGS technologie sekvenaci ampliconů do velikost 20 kb. BTseq metoda spočívá v Illumina sekvenování dlouhých PCR produktů, které jsou barkódovány a multiplexovány, což umožňuje analyzovat velké množství produktů najednou a snižuje finanční náklady. Sekvenační knihovna byla připravena firmou SeqMe.

### 3.8. Vyhodnocení a zpracování sekvencí

#### 3.8.1. De Novo Assembly

Dlouhé ready získané ON sekvenováním byly assemblovány programem Flye 2.9.2. (Kolmogorov et al., 2019). Princip metody je založen na tzv. opakovaných grafech sestavených pomocí přibližných shod sekvencí. Opakované grafy odhalují opakující se strukturu genomu, což pomáhá rekonstruovat optimální sestavu. Pomocí malých rozdílů mezi opakovanými kopiemi generuje přesné kontigy (Kolmogorov et al., 2019). Flye dokáže tolerovat vyšší míru nepřesností v sekvenačních readech, proto je využíván pro sestavování kontigů z ON nebo PacBio dat.

Program Flye byl stažen a nainstalován pomocí odkazu [github.com/fenderglass/Flye](https://github.com/fenderglass/Flye). Výchozí příkaz pro spuštění Flye s nezpracovanými ON ready:

```
--nano-raw JmenoSouboruONready.fastq --out-dir JmenoVystupnihoSouboru
```

Ze získaných kontigů byla sestavena databáze, vůči které byly blastovány známé sekvence mitochondriálních genů myxozoi v programu Geneious (tblastx, e-value 0,005). To umožnilo identifikovat kontigy, které obsahují mitochondriální geny a jsou částí mitochondriálního genomu. Takto vybrané kontigy byly dále re-assemblovány v programu Geneious (de novo assembly) ve snaze získat delší, pokud možno kompletní mitochondriální genom.

Programem Flye a následným re-assembly kontigů v programu Geneious byly sestaveny částečné genomy, které byly sekvenčně nepřesné, jelikož se skládaly z dlouhých a chybových sekvencí ON. Mapováním sekvenčně přesných sekvencí získaných z LA PCR a sekvenovaných BTseq k těmto genomům byl proveden tzv. „polishing“, kterým byly nepřesnosti získané ON readů sníženy. BTseq sekvence byly namapovány na referenční ON kontigy v programu Geneious.

### **3.8.2. Anotace genomu**

Mitochondriální genom byl anotován dvěma programy, a to MITOS (Bernt et al., 2013) a HHpred (Zimmermann et al., 2018). Predikce těchto programů byly porovnány. Cirkulární genom byl graficky ztvárněn programem mtviz ([pacosy.informatik.uni-leipzig.de](http://pacosy.informatik.uni-leipzig.de)).

MITOS k identifikaci genů kódujících proteiny využívá strategii založenou na agregaci BLAST vyhledávání s dříve anotovanými proteinovými sekvencemi (Bernt et al., 2013). Do tohoto programu jsou data vkládána ve fasta formátu a jeho výsledkem je popis detekovaných genů s jejich pozicemi. Takto nalezené geny byly dále ověřeny programem HHpred.

Otevřené čtecí rámce (ORF) s minimální délkou 300bp nalezené programem Geneious Prime 2021.1.1. byly dále použity jako vstupní data pro program HHpred. Tento server je využíván pro vzdálenou detekci homologie proteinů a predikci jejich struktury. Na základě srovnání profilových HMM (Hidden Markov model), HHpred bere proteinovou sekvenci jako vstup a hledá vzdálené homology v sortimentu databází, jako je PDB, SMART a Pfam (Söding et al., 2005).

### **3.8.3. Fylogenetická analýza**

Z vybraných sekvencí genů (*cox1*, *cox2*, *cob* a *nad1*) nacházejících se u zkoumaných druhů a již anotovaných genomů pocházejících z databáze GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) byl vytvořen aminokyselinový alignment v programu MAFFT v.7490 (Katoh & Standley, 2013) za využití algoritmu E-INS-i s výchozím parametrem pro penalizaci vytváření mezer. Platforma Geneious prime byla využita pro běh programu MAFFT. Výsledný alignment pro jednotlivé geny byl následně manuálně upraven zastřížením konců a použit k fylogenetické analýze.

Pro konkatenovanou fylogenetickou analýzu byl dataset doplněn o žahavce (Tabulka 9). V databázi GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) byly vyhledány a staženy sekvence vybraných genů (cox1, cox2, cob a nad1), vždy pro dva zástupce jednotlivých tříd žahavců. Následně byl pro tyto sekvence a v této práci získané sekvence sestaven konkatenovaný alignment ve stejném programu a se stejnými parametry jako v předešlé analýze.

**Tabulka 9.** Seznam sekvencí použitých pro fylogenetickou analýzu. Plné kolečko odpovídá sekvenci použité k fylogenetickým analýzám.

Druh	Zdroj	cob	cox1	cox2	nad1
<i>Myxidium lieberkuehni</i>	tato práce	●	●	○	●
<i>Nephrocystidium pickii</i>	tato práce	●	○	○	○
<i>Sphaerospora molnari</i>	tato práce	●	●	●	○
<i>Zschokkella nova</i>	tato práce	●	●	●	●
<i>Zschokkella</i> sp.	tato práce	●	●	●	●
<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	NCBI	○	●	○	○
<i>Kudoa septempunctata</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Kudoa iwatai</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Kudoa hexapunctata</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Buddenbockia plumatellae</i>	NCBI	○	●	○	○
<i>Enteromyxum leei</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Myxobolus squamalis</i>	NCBI	○	○	○	●
<i>Alatina alata</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Aurelia limbata</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Chiropsalmus quadrumanus</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Craspedacusta sowerbii</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Craterolophus convulus</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Haliclystus sanjuanensis</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Heliopora coerulea</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Hydra vulgaris</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Nematostella</i> sp.	NCBI	●	●	●	●
<i>Polypodium hydriforme</i>	NCBI	●	●	●	●
<i>Rhopilema esculentum</i>	NCBI	●	●	●	●

Fylogenetické stromy byly rekonstruovány metodou maximální pravděpodobnosti (ML) v programu RAxML (Randomized Accelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2014) a Bayesiánskou metodou (BI) v programu MrBayes v.3.2.6. (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) implementovaném v programu Geneious prime. Pro ML i BI byl vybrán evoluční model LG+gamma na základě analýzy selekce nejlepšího modelu pomocí webového serveru IQ-tree (Nguyen et al. 2015). ML bootstrapová analýza byla provedena s 500 opakováním pro jednogénové analýzy a 1000 opakováními pro konkatenanou analýzu 4 genů. Bayesovská analýza byla provedena s délkou řetězce 1 milion opakování, v rámci této analýzy byl vybrán každý stý strom, přičemž prvních 1000 (10 %) stromů bylo odstraněno (tzv. burn in).

### **3.9. Mikroskopická analýza**

Transmisní elektronová mikroskopie byla využita jak ke kontrole efektivity izolace mitochondriální frakce, tak k vizualizaci mitochondrií a mitochondriální DNA. Základním vstupním materiálem byla na mitochondrie obohacená frakce nebo z ní vyizolovaná mitochondriální DNA. Vzorke obou materiálů byly zaslány ke zpracování do laboratoře elektronové mikroskopie patřící ke společným pracovištím Biologického centra AV ČR a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Připravené preparáty byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem JEM-2100F JEOL při urychlovacím napětí 200 kV.

## 4. Výsledky

V rámci kurzu Mořské parazitologie bylo vyšetřeno 9 jedinců druhu *Gadus morhua*. U dvou z nich byla potvrzena přítomnost druhu *Zschokkella* sp. (Tabulka 10). U tohoto druhu ryb se ve žlučníku nacházel i další zástupce myxozoí, druh *Myxidium gadi*, který nebyl do magisterské práce z časových důvodů zařazen. Podílela jsem se i na pitvách štik *Esox lucius*, ze kterých byly získány druhy *Myxidium lieberkuehni* a *Nephrocystidium pickii* (prevalence viz tabulka 10). Všechny pět vyšetřených jedinců *Ctenopharyngodon idella* bylo infikováno druhem *Zschokkella nova* (vzorky poskytnuty školitelem).

**Tabulka 10.** Prevalence výskytu jednotlivých druhů myxozoí u vyšetřovaných druhů ryb.

Hostitel	Druh	Prevalence (infikováno/vyšetřeno)
<i>Gadus morhua</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Zschokkella</i> sp	22,22 % (2/9)
<i>Esox lucius</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Myxidium lieberkuehni</i>	100 % (10/10)
	<i>Nephrocystidium pickii</i>	20 % (2/10)
<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Valenciennes, 1844)	<i>Zschokkella nova</i>	100 % (5/5)

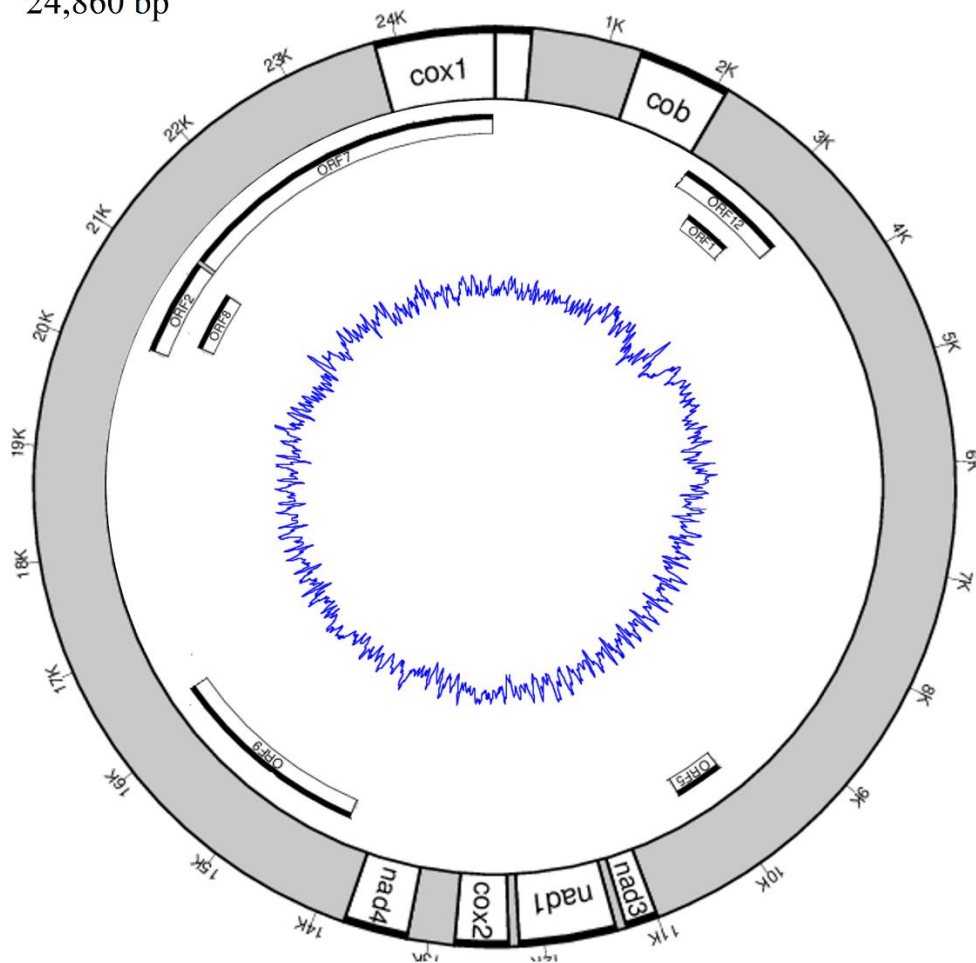
### 4.1. Charakteristika mitochondriálního genomu

V této práci se podařilo získat sekvence celého mitochondriálního genomu druhu *Zschokkella nova* a částečného mitochondriálního genomu druhů *Myxidium lieberkuehni*, *Nephrocystidium pickii*, a *Zschokkella* sp. Mitochondriální genom *Sphaerospora molnari* byl již k dispozici jako nepublikovaný výsledek laboratoře.

#### 4.1.1. Mitochondriální genom druhu *Zschokkella nova*

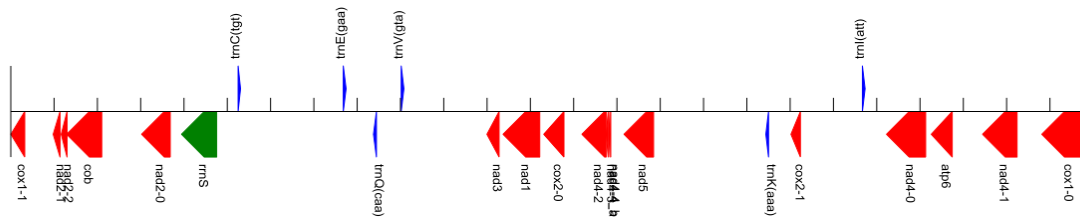
Celková velikost cirkulárního mt genomu druhu *Z. nova* je 24,860 bp s GC obsahem 32,8 % (G 10,9 %; C 21,9 %; A 45,3 %; T 21,7 %). V programu Geneious bylo predikováno 13 ORF. Jejich pozice a směr jsou uvedeny v tabulce 1 v příloze. Následnou analýzou programy HHpred a MITOS bylo z těchto 13 ORF anotováno 6 genů (Obrázek 11), a to jako geny pro cytochrom b (cob), podjednotku 1 cytochrome c oxidázy (cox1), podjednotku 2 cytochrom c oxidázy (cox2) a podjednotky 1,2,3 NADH dehydrogenázy (NAD1/2/3).

*Zschokkella nova*  
24,860 bp



**Obrázek 11.** Model mitochondriálního genomu druhu *Z. nova* s vyznačenými nalezenými ORF a anotovanými geny. Modře je znázorněn GC obsah.

Programem MITOS bylo predikováno 9 protein kódujících genů z nichž 6 bylo následnou (zpětnou) analýzou programem HHpred potvrzeno (Tabulka 2, příloha). MITOS identifikoval dále gen pro RNA malé ribozomální podjednotky (*rrnS*), gen pro RNA velké ribozomální podjednotky (*rrnL*) identifikován nebyl. Predikované geny byly značně segmentované (Obrázek 12).



**Obrázek 12.** Výsledek anotace genomu *Z. nova* získaný programem MITOS. Červeně jsou znázorněny protein kódující geny, zeleně rRNA geny a modře tRNA geny.

Na základě porovnání dat získaných z programů Geneious, HHpred a MITOS bylo potvrzeno 6 genů znázorněných v tabulce 11 i s jejich pozicí získanou kombinací pozic z programů a jejich výslednému překryvu.

**Tabulka 11.** Nalezené geny u druhu *Z. nova* a jejich pozice získaná překryvem pozic z programu Geneious a MITOS.

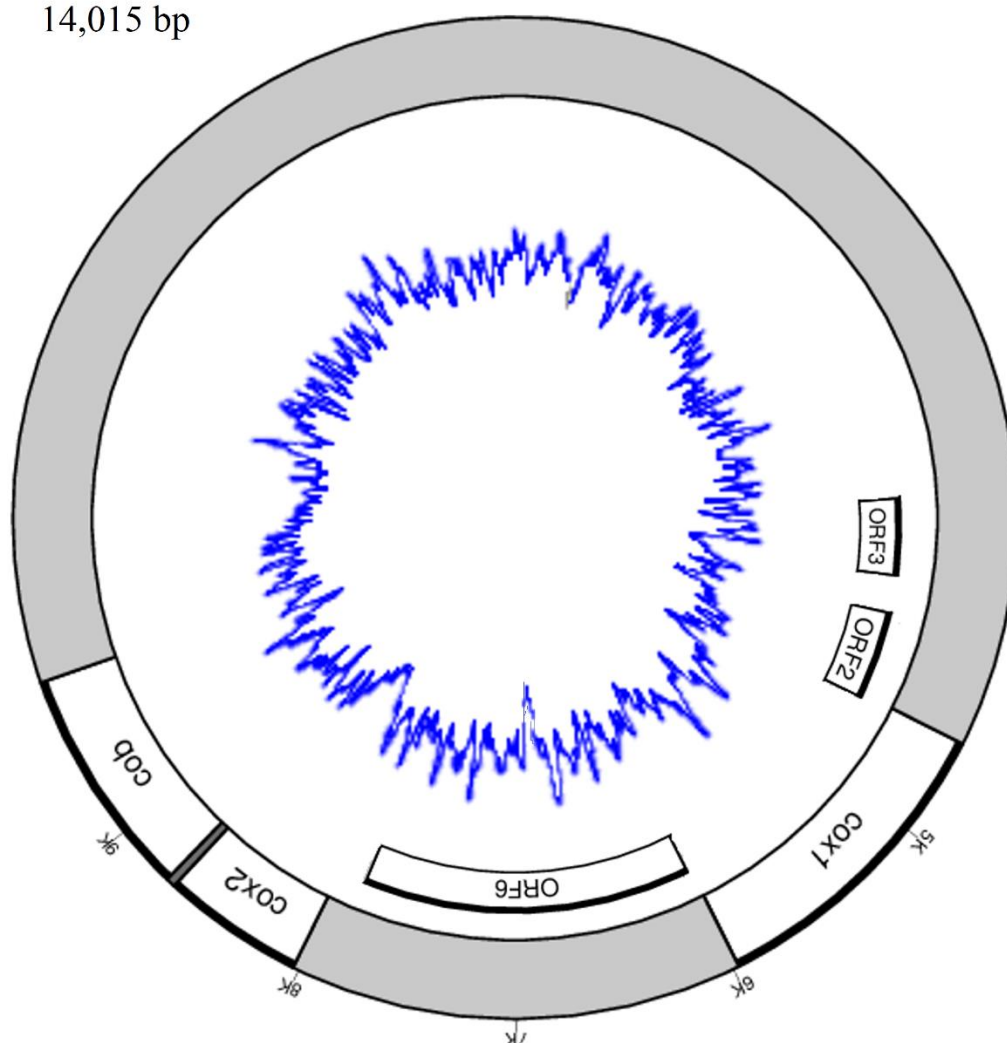
Gen	Pozice
COX1	2,3813 – 2,4859
COX2	12,310 – 12,777
COB	1,292 – 2,101
NAD1	11,370 – 12,218
NAD2	13,191 – 13,751
NAD3	10,998 – 11,279

#### 4.1.2. Mitochondriální genom druhu *Sphaerospora molnari*

Církulární molekula mitochondriálního genomu druhu *S. molnari* (Obrázek 13) má celkovou velikost 14,015 bp. s 27,2% obsahem GC (G 10,6 %; C 16,6 %; A 47,6 %; T 25,2 %). Celkem 6 ORF bylo identifikováno programem Geneious a 3 z nich byly programy HHpred a MITOS dále určeny jako *cob*, *cox1* a *cox2* (Tabulka 3, přílohy).

*Sphaerospora molnari*

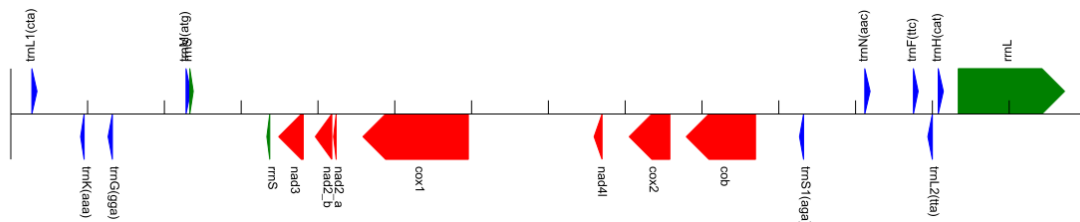
14,015 bp



**Obrázek 13.** Model mitochondriálního genomu druhu *S. molnari* s vyznačenými nalezenými ORF a anotovanými geny. Modře je znázorněn GC obsah.



Stejné složení genů bylo identifikováno programem MITOS a ověřeno programem HHpred. Jednalo se o geny pro cob, cox1 a cox2 (Tabulka 4, přílohy). Z 6 určených ORF byly anotovány 3 protein kódující geny. MITOS dále identifikoval rrnL a krátký úsek genu rrnS (Obrázek 14).



**Obrázek 14.** Výsledek anotace genomu *S. molnari* získaný programem MITOS. Červeně jsou znázorněny protein kódující geny, zeleně rRNA geny a modře tRNA geny.

Oběma programy potvrzené geny jsou znázorněny v tabulce 12 i s jejich překrývajícími se pozicemi.

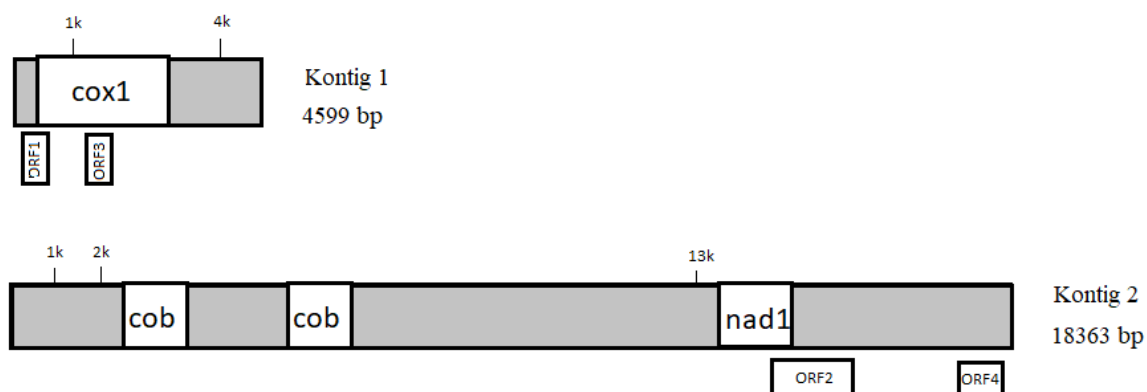
**Tabulka 12.** Nalezené geny u druhu *S. molnari* a jejich pozice získaná překryvem pozic z programu Geneious a MITOS.

Gen	Pozice
cox1	4,586-5,959
cox2	8,053-8,583
cob	8,796-9,698

### 4.1.3. Mitochondriální genom druhu *Myxidium lieberkuehni*

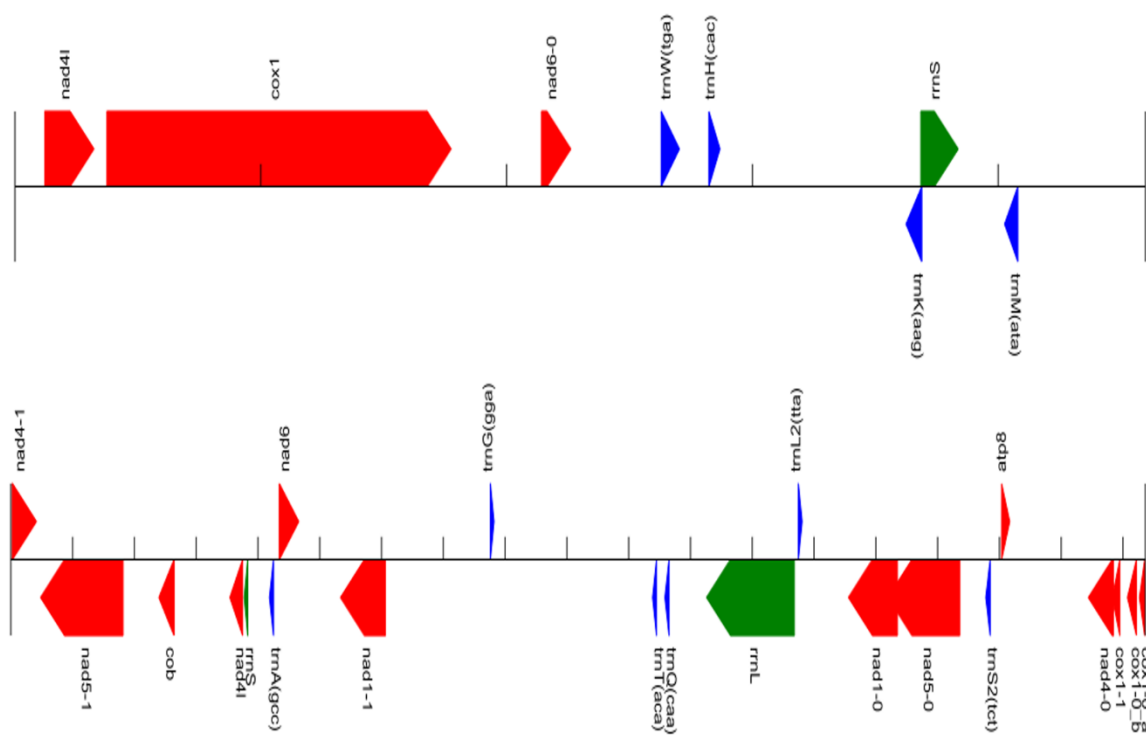
V této práci se nepodařilo získat celý mt genom druhu *M. lieberkuehni*. Byly však identifikovány 2 kontigy (Obrázek 15) s délkami 4,599 bp a 18,363 bp, které mají charakter mitochondriální DNA. Jejich GC obsah byl 29,7 % (G 21,4 %; C 8,3 %; A 21,9 %; T 48,5 %) a 28,2 % (G 8,1 %; C 20,1 %; A 47,5 %; T 24,2 %). Bylo nalezeno 3 a 5 ORF. Jako mitochondriální byly určeny tři ORF jako gen pro *cox1* u kontigu 1 a geny *cob* a *NAD1* u kontigu 2 (Tabulka 5, příloha).

#### *Myxidium lieberkuehni*



**Obrázek 15.** Vybrané kontigy druhu *M. lieberkuehni* s vyznačenými nalezenými ORF a anotovanými geny.

Analýzou programem MITOS (Obrázek 16) byly identifikovány 3 geny na kontigu 1 a 7 segmentovaných genů na kontigu 2 (Tabulka 6, příloha). Zpětnou HHpred analýzou byly potvrzeny geny pro *cox1* na kontigu 1 a pro *cob*, *cox1* a *NAD1* na kontigu 2.



**Obrázek 16.** Výsledek anotace vybraných kontigů druhu *M. lieberkuehni* získaný programem MITOS. Červeně jsou znázorněny protein kódující geny, zeleně rRNA geny a modře tRNA geny.

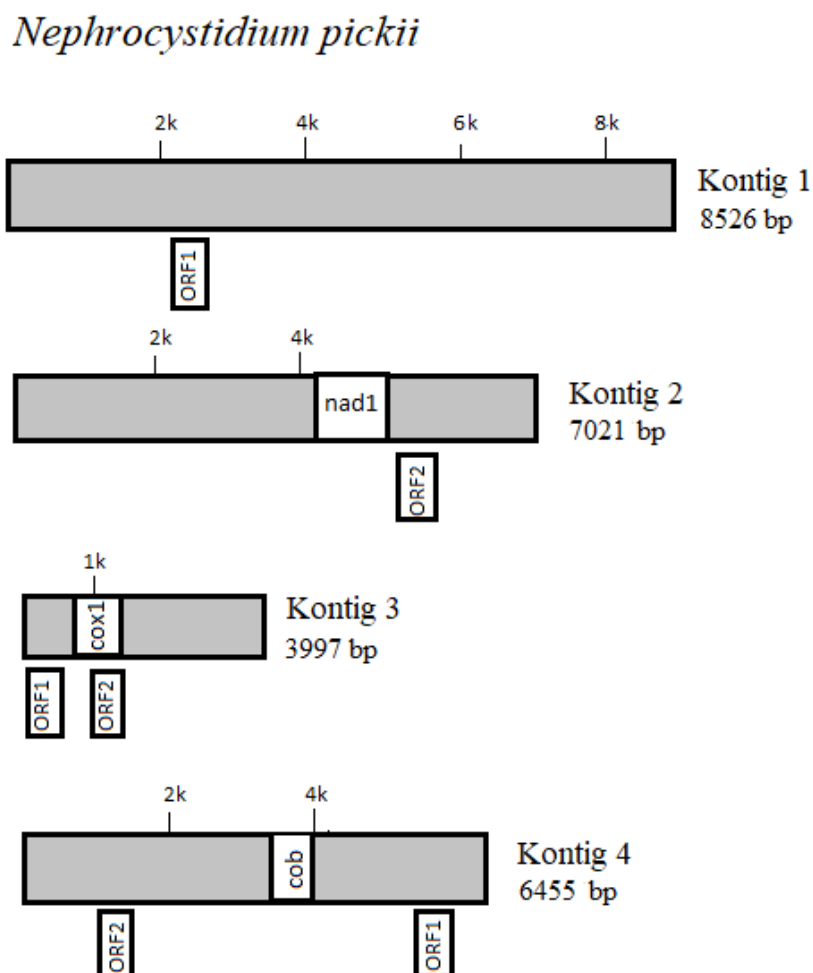
Porovnáním dat z obou programů byly potvrzeny 3 geny rozložené na 2 kontizích (Tabulka 13).

**Tabulka 13.** Nalezené geny u a jejich pozice na jednotlivých kontizích druhu *M. lieberkuehni* získaná překryvem pozic z programu Geneious a MITOS.

Kontig	Gen	Pozice
1	cox1	375-1,775
2	cob	2,398-2,643
	nad1	13,559-14,350

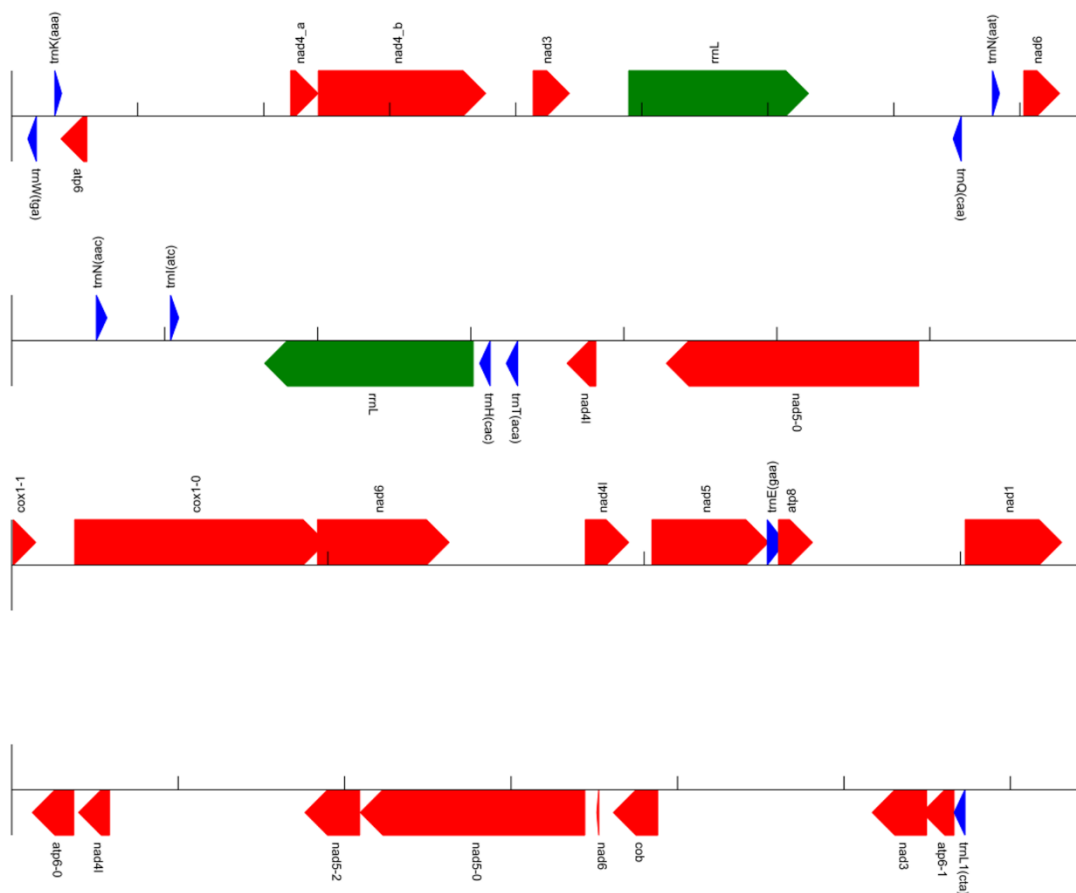
#### 4.1.4. Mitochondriální genom druhu *Nephrocystidium pickii*

Pro tento druh se nepodařilo získat celistvou mitochondriální DNA. Blastem byly identifikovány 4 kontigy s délkami 8,526 bp, 7,021 bp, 3,997 bp a 6,445 bp, které vykazovaly mitochondriální charakter (Obrázek 17). Tyto úseky se však následným re-assembly nespojily do delších úseků. LA PCR s primery navrženými do koncových částí sekvencí těchto kontigů za účelem jejich spojení pomocí sekvencí LA PCR ampliconů byla neúspěšná. GC obsah kontigů byl 21 % (G 12,9 %; C 8,1 %; A 15,2 %; T 62,8 %); 25,4 (G 8,0 %; C 17,4 %; A 45,8 %; T 28,8 %); 23,1 % (G 16,2 %; C 6,9 %; A 28,0 %; T 48,9 %); 22,8 % (G 6,8 %; C 16,0 %; A 51,7 %; T 25,5 %). Programem Geneious byl určený následující počet ORF- 1,2,3 a 3. Ty byly dále identifikovány jako geny pro NAD1, cox1 a cob na kontizích 2,3 a 4 (Tabulka 7, přílohy).



Obrázek 17. Vybrané kontigy druhu *N. pickii* s vyznačenými nalezenými ORF a anotovanými geny.

Programem MITOS bylo predikováno 9 genů z nichž 3 byly potvrzeny následnou analýzou programem HHpred (Tabulka 8, přílohy). Tyto geny byly pro *cox1*, *cob* a *NAD3* (Obrázek 18).



**Obrázek 18.** Výsledek anotace vybraných kontigů druhu *N. pickii* získaný programem MITOS. Červeně jsou znázorněny protein kódující geny, zeleně rRNA geny a modře tRNA geny.

Překryvem dat získaných z obou programů byly potvrzeny geny *cox1* a *cob*. Jejich výsledné pozice jsou zaznamenány v tabulce 14.

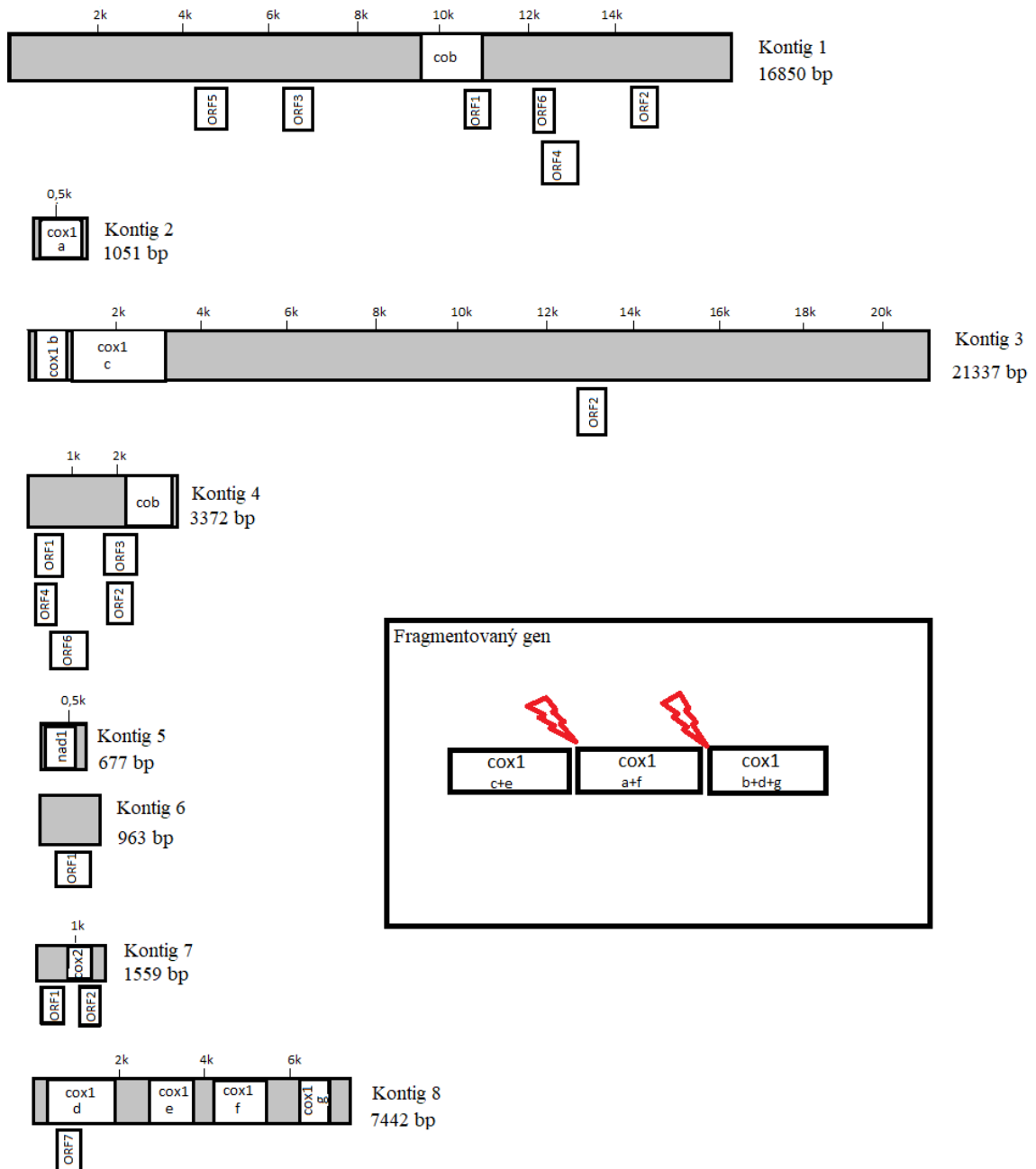
**Tabulka 14.** Nalezené geny a jejich pozice na jednotlivých kontizích druhu *N. pickii* získaná překryvem pozic z programu Geneious a MITOS.

Kontig	Gen	Pozice
3	<i>cox1</i>	719-994
4	<i>cob</i>	3,616-3,882

#### 4.1.5. Mitochondriální genom druhu *Zschokkella* sp.

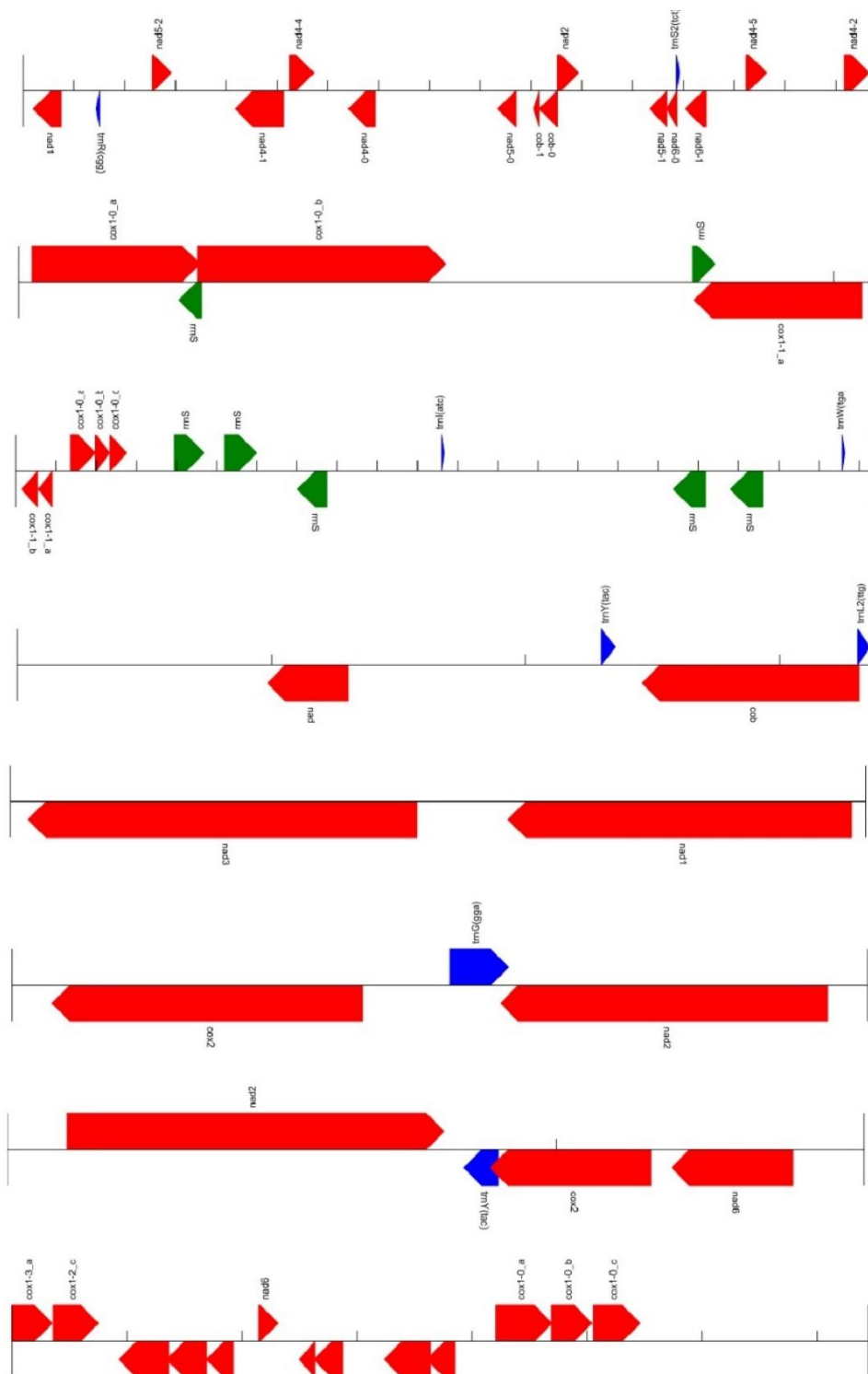
U druhu *Zschokkella* sp. se podařilo získat částečný mitochondriální genom. Blast analýzou bylo identifikováno 8 kontigů (Obrázek 19) mitochondriálního charakteru s délkami 16,850 bp, 1,051 bp, 21,337 bp, 3,372 bp, 677 bp, 963 bp, 1,559 bp a 7,442 bp. Celkový obsah GC nukleotidů v kontizích byl 46,5 % (G 23,1 %; C 23,3 %; A 28,3 %; T 25,3 %); 48,4 % (G 24,5 %; C 24 %; A 25,4 %; T 26,2 %); 45,5 % (G 22,7 %; C 22,8 %; A 27,2 %; T 27,3 %); 50,4 % (G 22,5 %; C 27,9 %; A 31,3 %; T 18,3 %); 44,6 % (G 18,5 %; C 26,1 %; A 39,1 %; T 16,3 %); 45,9 % (G 21,4 %; C 24,5 %; A 36,3 %; T 17,8 %); 43,9 % (G 20,1 %; C 23,9 %; A 25,1 %; T 30,9 %); 49,1 % (G 24,6 %; C 24,5 %; A 25,9 %; T 25,1 %). Programem Geneious byl predikován následující počet ORF u jednotlivých kontigů- 7 (kontig 1), 1 (kontig 2), 6 (kontig 3), 6 (kontig 4), 1 (kontig 5 a 6), 3 (kontig 7) a 10 (kontig 8). Analýzou programem HHpred z nich byly anotovány geny pro cob na kontigu 1 a 4, cox1 na kontigu 2,3 a 8, cox2 na kontigu 7 a NAD1 na kontigu 5 (Tabulka 9, přílohy).

*Zschokkella* sp.



**Obrázek 19.** Vybrané kontigy druhu *Zschokkella* sp. s vyznačenými nalezenými ORF a anotovanými geny. Ve výřezu jsou znázorněny fragmenty genu spojené do kompletního genu.

Programem MITOS byly predikovány geny pro *cob*, *cox1* a *NAD1/2/3/4/5/6* (Tabulka 10, přílohy). Tyto geny byly v některých případech značně segmentovány (Obrázek 20).



**Obrázek 20.** Výsledek anotace vybraných kontigů druhu *Zschokkella* sp. získaný programem MITOS.



Oběma programy potvrzené geny (Tabulka 15) byly pro cob, cox1 a NAD1 na různých kontizích.

**Tabulka 15.** Nalezené geny a jejich pozice na jednotlivých kontizích druhu *Zschokkella* sp. získaná překryvem pozic z programu Geneious a MITOS.

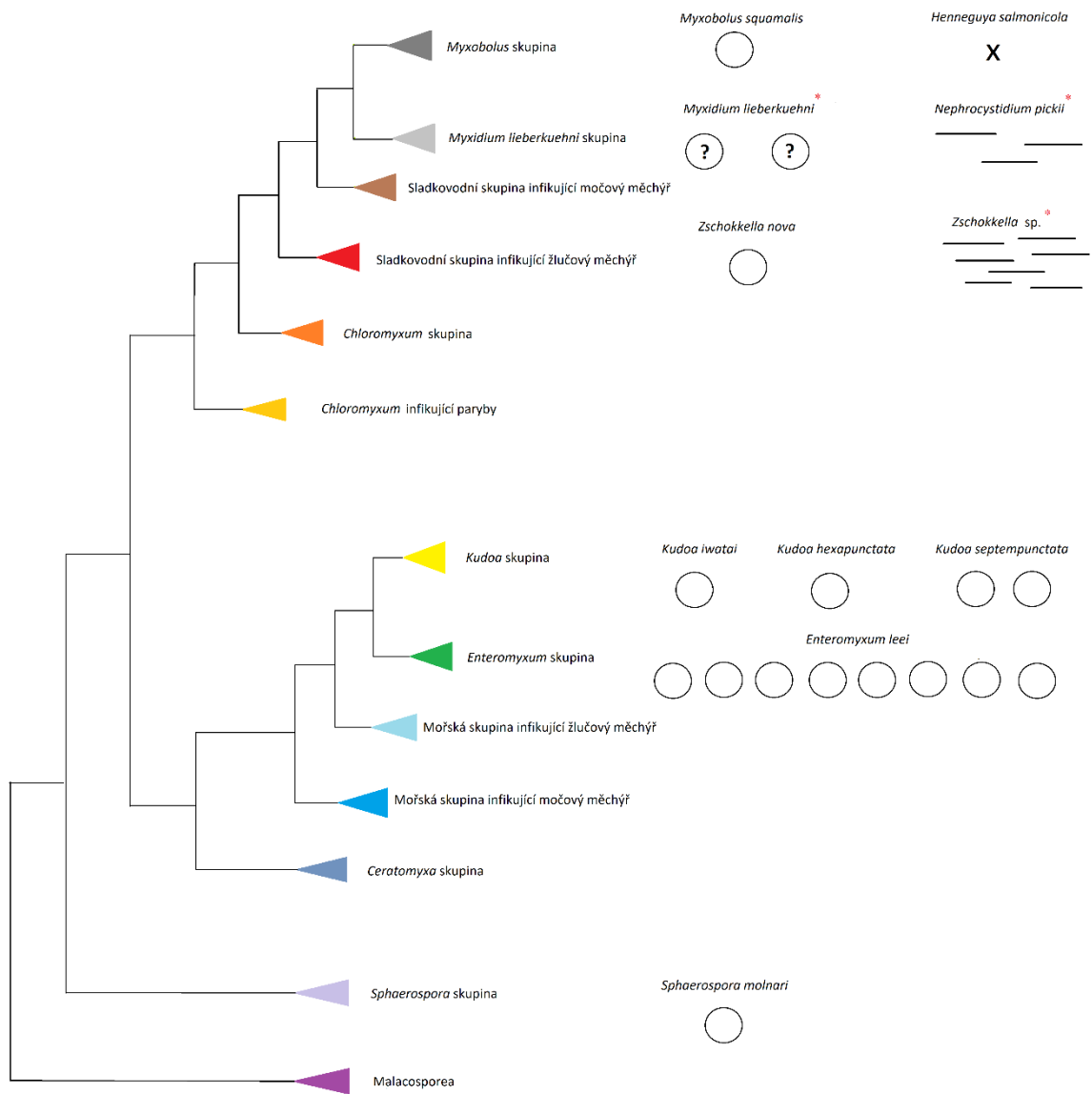
Kontig	Gen	Pozice
1	cob	10,055-10,524
2	cox1	193-525 (a)
3	cox1	138-548 (b)
		1,361-2,756 (c)
4	Cob	2,460-3,314
5	nad1	395-667
7	cox2	880-1,173
8	cox1	360-752 (d)
		3,234-3,614 (e)
		4,284-5,041 (f)
		5,050-5,460 (g)

U protein-kódujícího genu pro cox1 byla navíc zjištěna fragmentace (Obrázek 19). Fragmenty c + e / b + d + g / a + f byly totožné a nacházely se na různých kontizích viz. Tabulka 16.

**Tabulka 16.** Přehled fragmentů genu cox1 a jejich pozice na jednotlivých fragmentech mt genomu druhu *Zschokkella* sp.

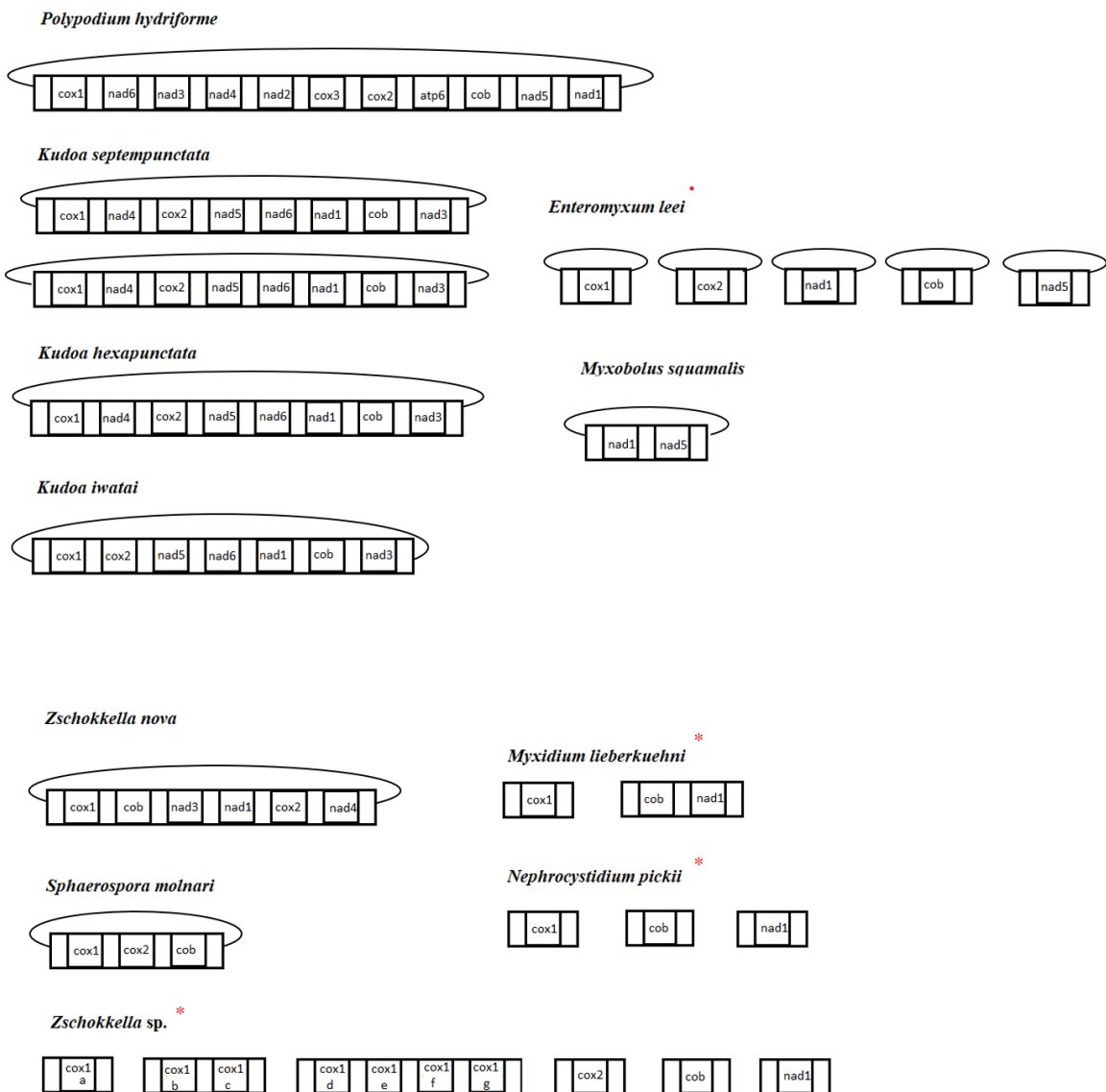
Fragment	Kontig
a	2
b	3
c	3
d	8
e	8
f	8
g	8

#### 4.1.6. Struktura mitochondriálního genomu



**Obrázek 21.** Grafické znázornění evoluce struktury mt genomu myxozoi. Topologie následuje Chang et al. (2015). \* částečný genom s identifikovanými mitochondriálními geny, x u druhu *H. salmonicola* značí ztrátu mt genomu.

Schéma evoluce struktury mitochondriálního genomu myxozoi je znázorněno na obrázku 21. Na schématu jsou namapovány i získané kontigy u druhů *Zschokkella* sp., *N. pickii* a *M. lieberkuehni*, které se nepodařilo zkompletovat do jednoho dlouhého úseku.

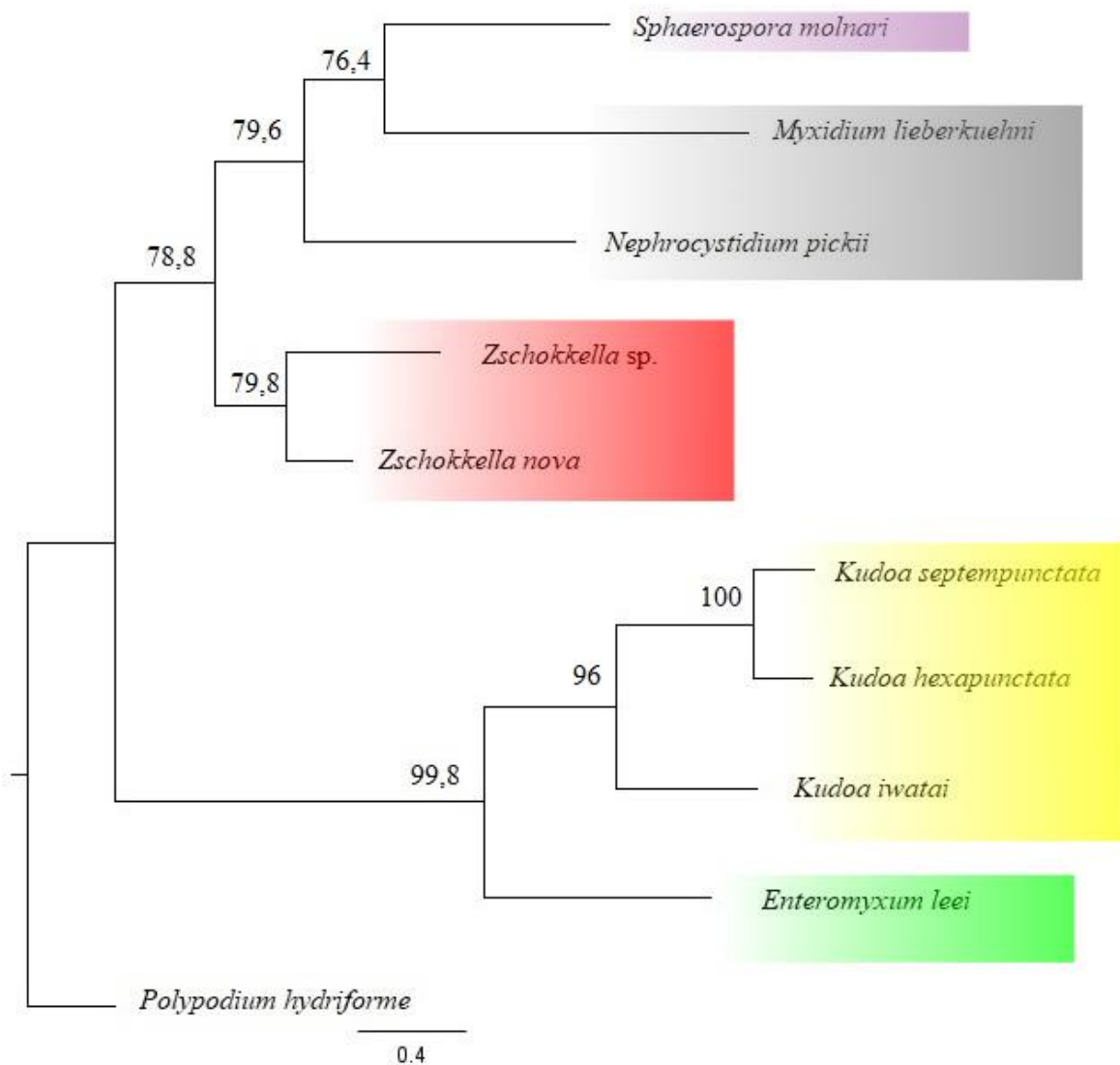


**Obrázek 22.** Graficky znázorněné pořadí genů již anotovaných a v této práci získaných genomů.

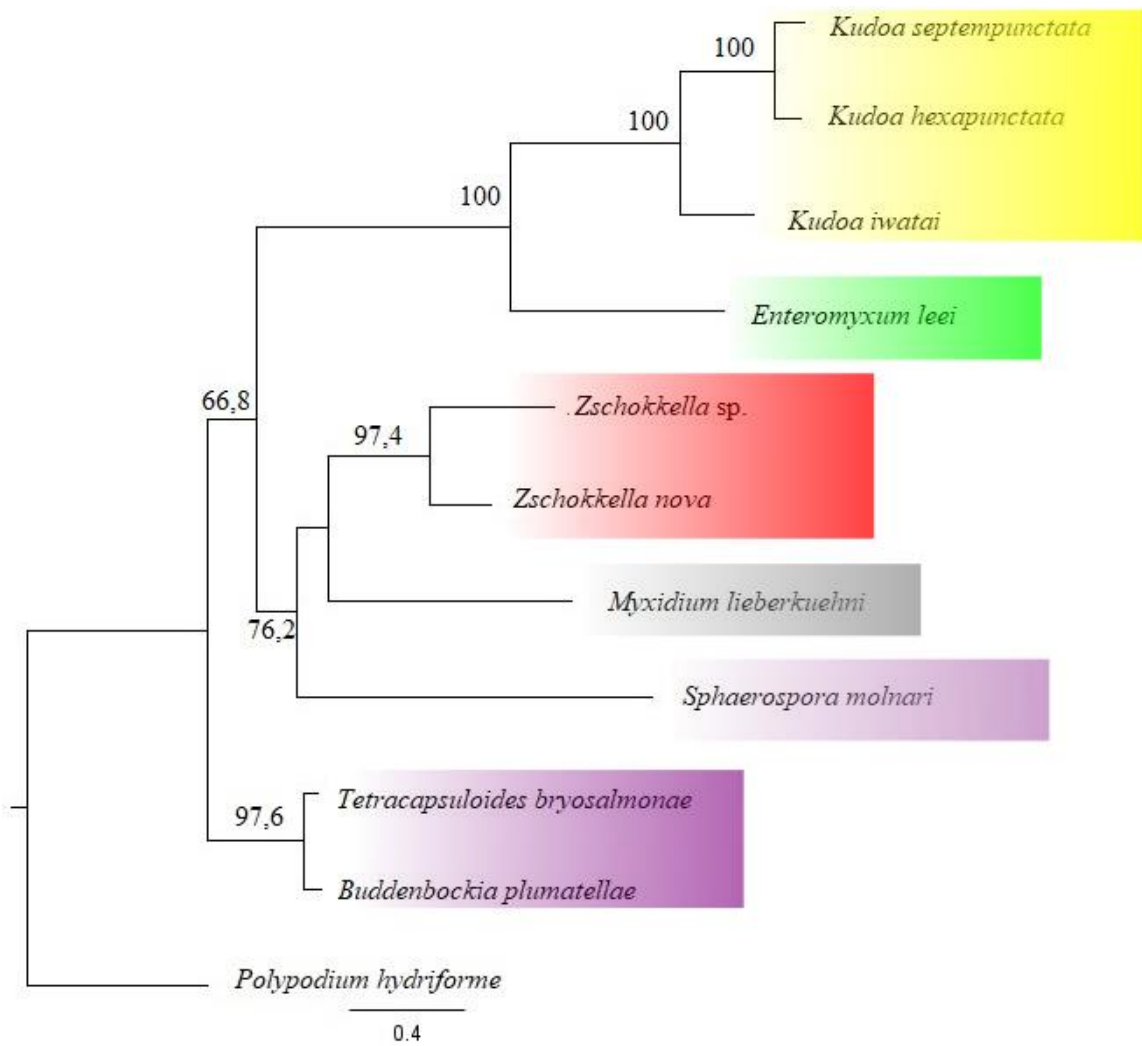
\* částečný genom s identifikovanými mitochondriálními geny, • u druhu *E. leei* značí fragmentaci mt genomu.

Na základě sumarizace dosavadních poznatků a nově získaných sekvencí bylo graficky znázorněno pořadí genů mitochondriálního genomu myxozoí (Obrázek 22). Žádný z nově anotovaných genomů nesdílí stejné pořadí genů s již popsány druhy.

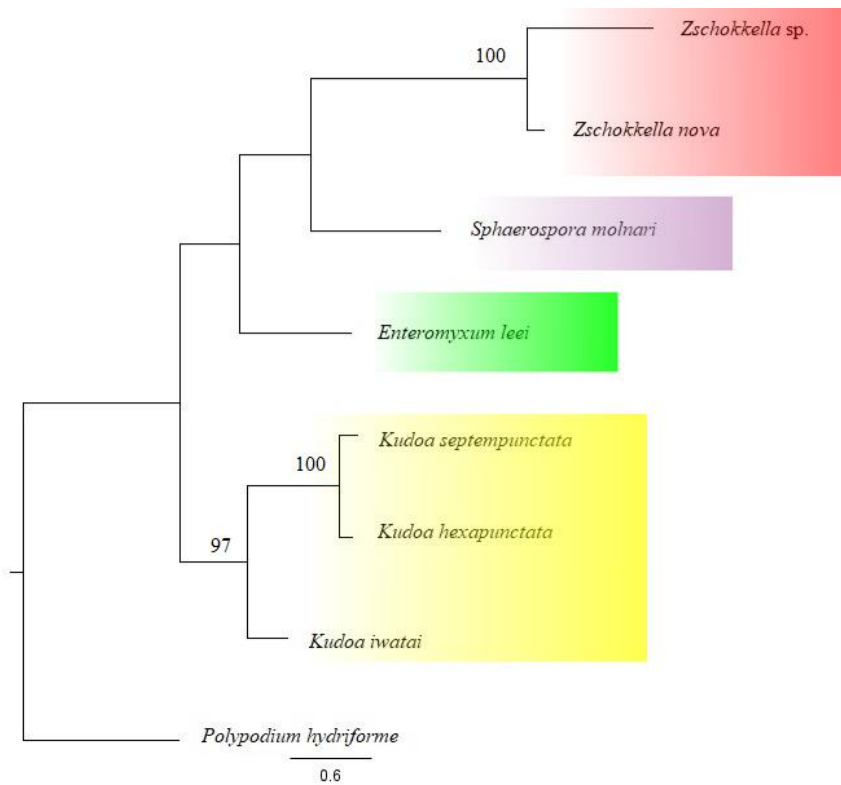
## 4.2. Fylogenetická analýza



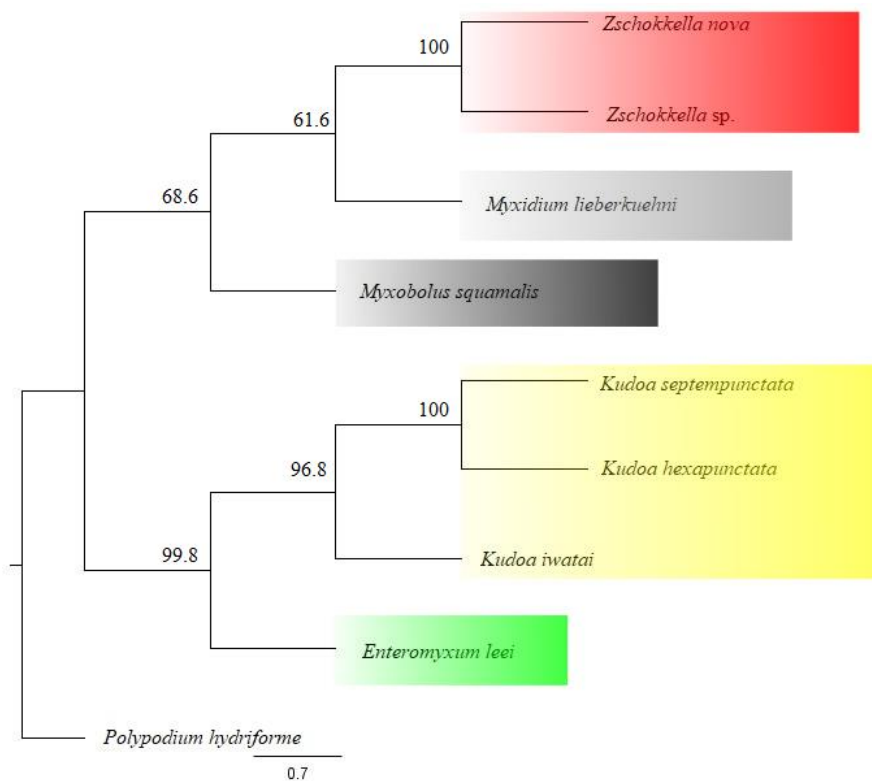
**Obrázek 23.** Fylogenetický strom myxozoi sestaven na základě analýzy sekvencí pro cob metodou ML. Jednotlivá čísla uvedena u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapů. Podpory pod 50 % nejsou znázorněny.



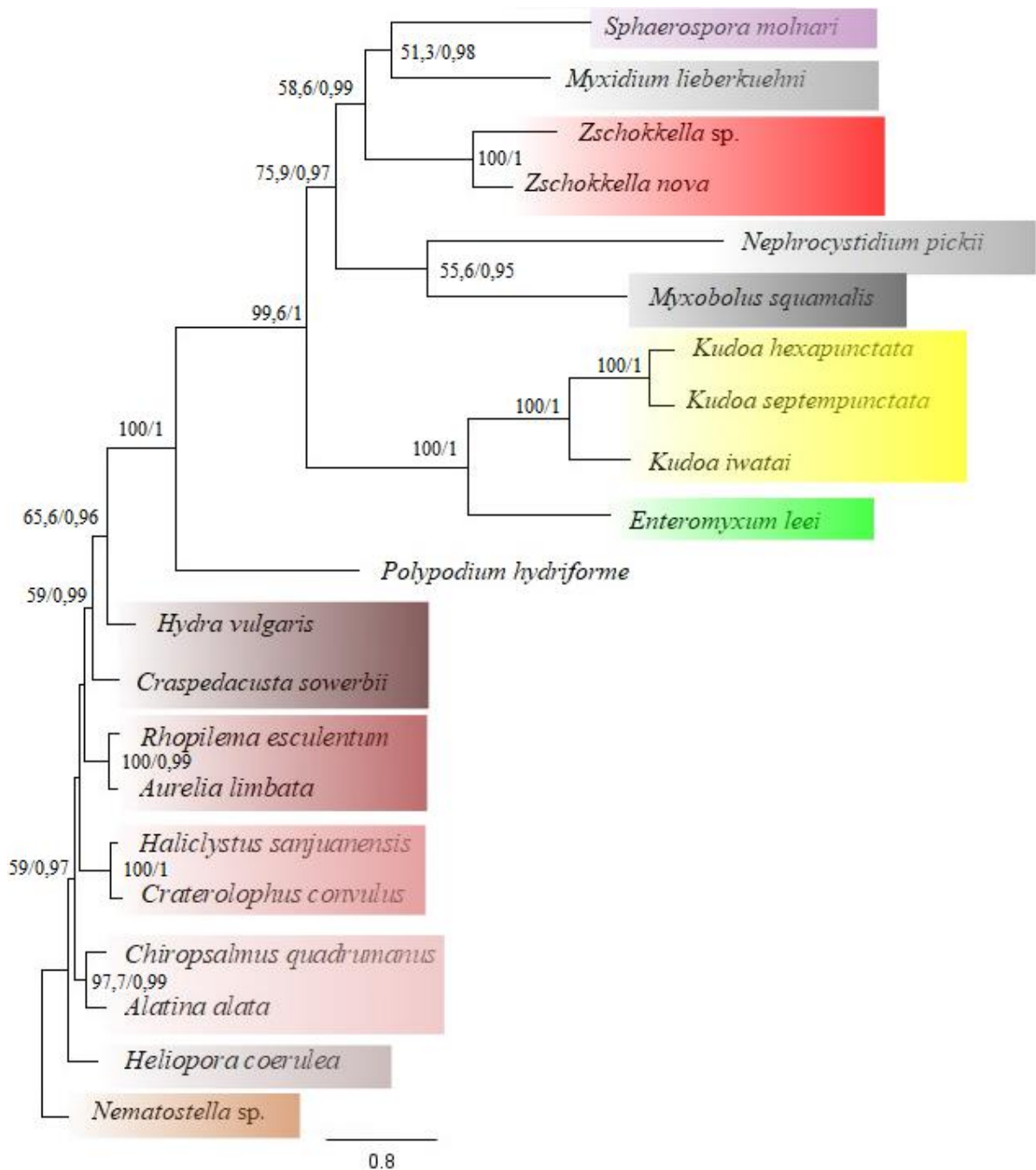
**Obrázek 24.** Fylogenetický strom myxozoi sestaven na základě analýzy sekvencí pro *cox1* metodou ML. Jednotlivá čísla uvedena u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapů. Podpory pod 50 % nejsou znázorněny.



**Obrázek 25.** Fylogenetický strom myxozoí sestaven na základě analýzy sekvencí pro *cox2* metodou ML. Jednotlivá čísla uvedena u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapů. Podpory pod 50 % nejsou znázorněny.



**Obrázek 26.** Fylogenetický strom myxozoí sestaven na základě analýzy sekvencí pro *nad1* metodou ML. Jednotlivá čísla uvedena u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapů. Podpory pod 50 % nejsou znázorněny.



**Obrázek 27.** Fylogenetické vztahy vybraných zástupců z kmene Cnidaria na základě analýzy čtyř konkatenovaných protein-kódujících genů (cob, cox1, cox2, nad1). U uzlů jsou uvedeny hodnoty bootstrapů vyšší než 50 % a posterior probabilities (PP) vyšší než 0.50.

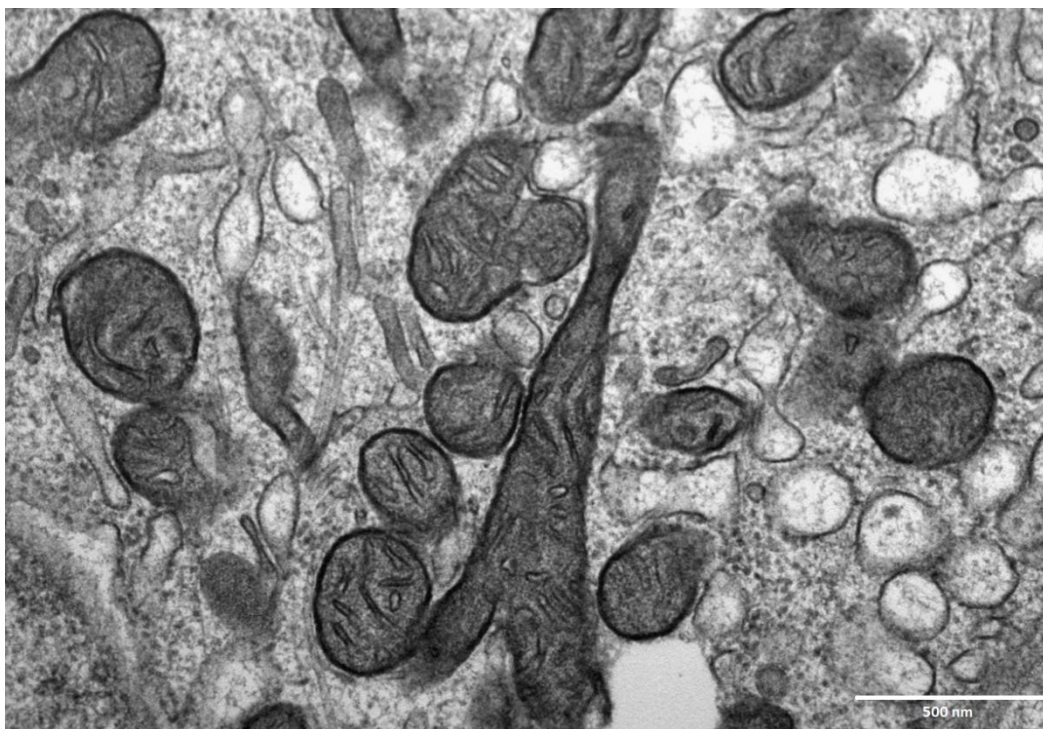
Fylogenetické stromy rekonstruované na základě genů pro mt protein cob, cox1, cox2 a nad1 je uvedeny na obrázcích 23 až 26. Geny jednotlivých druhů použité pro fylogenetické analýzy jsou znázorněny v tabulce 9. Jako outgroup byl použit druh *Polypodium hydriforme*, který spolu s Myxozoi tvoří skupinu Endocnidozoa.

Dále byla provedena fylogenetická analýza na základě konkatenátu mitochondriálních genů pro cob, cox1, cox2 a nad1 (Obrázek 27). U všech zástupců myxozoi je možné pozorovat dlouhé větve, které vykazují extrémní rychlost evoluce. Podobně dlouhé větvení je možné pozorovat i u druhu *Polypodium hydriforme*.

### 4.3. Mikroskopická analýza

#### 4.3.1. Mitochondrie

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie byla ověřena funkčnost izolačního kitu Abcam (ab110171) před samotnou extrakcí mitochondriální DNA. Na obrázku 28 a 29 je výsledek TEM mitochondrie druhu *Nephrocystidium pickii* s viditelnými kristami.



**Obrázek 28.** Snímek z transmisní elektronové mikroskopie provedené na na mitochondrie obohacené frakce.





**Obrázek 29.** Detail mitochondrie druhu *Nephrocystidium pickii* z transmisní elektronové mikroskopie.

#### **4.3.2. Mitochondriální DNA**

Pro vizualizaci mitochondriální DNA byla využita modifikovaná metoda transmisní elektronové mikroskopie s velmi nízkým kontrastem. Výsledky jsou však ve velmi nízké kvalitě, tudíž bylo rozhodnuto je v rámci diplomové práce nepublikovat.

## 5. Diskuse

Mitochondriální genom žahavců je v některých případech nestandardní a jeho studium je tedy poměrně náročný úkol. Například mitogenom skupiny Cubozoa zůstal dlouhou dobu neobjasněn (Smith et al., 2012). Důvodem se ukázal velmi neobvyklý charakter mitogenomu fragmentovaného do 18 lineárních chromozomů. Stejně tak i mitogenom druhu *Hydra magnipapillata* je fragmentován a ani jeho získání nebylo snadné. Bylo tedy otázkou, jaký mitogenom mají Myxozoa, která vlivem adaptace na parazitický způsob života redukovala tělní plán (Holzer et al., 2018) do podoby jednoduchých plasmodiálních útvarů, ve kterých vznikají spory pro přenos z hostitele do hostitele. Parazitismus obecně vede k redukci jaderného genomu, což je možné pozorovat i na popsáných genomech myxozoi, která mají jeden z nejmenších jaderných genomů mezi živočichy (Guo et al., 2022). Nebylo tedy možná až takovým překvapením, že další redukcí přisuzovanou parazitismu je ztráta mitochondriálního genomu u druhu *Henneguya salmonicola* (Yahalomi et al., 2020). Mitochondriální genom myxozoi je jen velmi málo prozkoumaný. Z dosavadních poznatků je však zřejmé, že i blízké druhy mají velice odlišný charakter mitochondriálního genomu a dochází zde ke změnám jako je fragmentace či úplná ztráta (Takeuchi et al., 2015; Yahalomi et al., 2017; Yahalomi et al., 2020). Hlavním cílem této práce tedy bylo získat kompletní či částečný mitochondriální genom vybraných zástupců myxozoi z různých evolučních linií, popsat charakter genomu a zjistit, zdali je jeho fragmentace jev vyskytující se ve více evolučních liniích myxozoi.

Studium mitochondriálního genomu výrazně znesnadňuje několik proměnných. Jednou z hlavních překážek, zaznamenaných v průběhu získávání molekulárních dat, se projevila nízká výtěžnost DNA. Ta je dána především poměrně nízkým vstupním materiálem pro izolaci DNA, kdy není možné získat potřebné množství těchto mikroskopických parazitů. To je navíc násobeno tím, že v práci byla využívána pouze mitochondriální DNA s co nejmenší příměsí jaderné DNA. Proto byl v této práci využit postup izolace mtDNA z mitochondriální frakce. Zde mohlo dojít k dalšímu snížení už tak malé koncentrace DNA vycházející z velikosti zkoumaného parazita. Dále bývá také pozorován fenomén přesunu části mitochondriálního genomu do jádra (tzv. NUMTs), tyto jaderné úseky mohou být během PCR s nespecifickými primery naamplifikovány spolu s mitochondriálními úseky a vykazovat falešně pozitivní signál reakce (Wei et al., 2022). Další proměnnou je vysoká evoluční rychlost, znesnadňuje jak identifikaci protein-kódujících genů, tak i genů

kódujících RNA ribozomálních podjednotek. Tento fenomén by úplně vylučoval možnost klasického získávání mitochondriálních genomů popsaného v metodice Burger et al. (2007), která spočívá v amplifikaci dlouhých překrývajících se úseků DNA na základě univerzálních primerů specifických pro Metazoa. K vyhnutí se tomuto problému bylo v této práci využito metody sekvenování nové generace, přesněji byla zvolena Oxford nanopore metoda. Tato metoda na jednu stranu sice umožňuje získání dlouhých úseků, ty jsou ale na druhou stranu poměrně nepřesné. Z tohoto důvodu byla provedena korekce dlouhými BTseq ready získaných pomocí LA PCR se specifickými primery.

Výše zmíněným postupem byly získány sekvence celého mitochondriálního genomu druhu *Zschokkella nova* a částečného mitochondriálního genomu druhů *Myxidium lieberkuehni*, *Nephrocystidium pickii*, a *Zschokkella* sp. K dispozici jsem měla navíc již kompletní mitogenom druhu *Sphaerospora molnari*. Mitochondriální genom druhu *Z. nova* byl získán spojením kontigů mitochondriálního charakteru identifikovaných blast analýzou. Překryv těchto kontigů pak umožnil uzavřít kruhovou molekulu. Následná LA PCR amplifikace se specifickými primery a BTseq sekvenace dlouhých úseků byla z větší části úspěšná. Několik míst se však nepodařilo pokrýt a zůstaly tak s nekvalitním čtením získaným ON sekvenací. U zbylých tří druhů se nezdařila kompletace kratších úseků do jednoho dlouhého a vzniklo tak několik různě dlouhých kontigů, které byly blast analýzou identifikovány jako kontigy nesoucí mtDNA. Absence kontigů, které by umožnily spojení všech identifikovaných kontigů do jednoho celku a uzavření předpokládané kruhové DNA lze vysvětlit tím, že díky velké odlišnosti od „queries“ z důvodu vysoké evoluční rychlosti genomu nedokázala BLAST analýza najít v ON datech všechny mitochondriální kontigy. Alternativním vysvětlením by mohla být případná fragmentace genomu do několika cirkulárních či teoreticky i lineárních molekul mitochondriální DNA. K zjištění charakteru mitogenomu zkoumaných myxozoi byla využita metoda LA PCR. Do koncových částí kontigů byly navrženy specifické primery a mnoha různými kombinacemi použitých primerů při LA PCR, které měly „propojit“ jednotlivé kontigy či spojit jednotlivé kontigy do kruhové DNA. Možným důvodem pro selhání těchto LA PCR s celou řadou specifických primer párů byla chybovost sekvencí ON, dle kterých byly specifické primery navrženy (v případě absence „polishování“ BTseq metodou). Dalším možným vysvětlením by ale mohlo být to, že jednotlivé kontigy představují části fragmentovaného genomu a nelze je tedy spojit do jedné cirkulární molekuly, jako je tomu v případě vysoce fragmentovaného genomu *E. leei* (Yahalomi et al., 2017).

Takzvané „polishování“ ON readů dlouhými BTseq sekvencemi je významné i v případě anotace genomu. Pokud si porovnáme množství anotovaných genů u „polishované“ molekuly druhu *Z. nova* a méně „polishovaných“ kontigů, můžeme pozorovat nižší počet nalezených genů u méně „polishovaných“ kontigů. Jedním z možných vysvětlení je, že u chybových sekvencí z ON může dojít k posunu čtecího rámce a výskytu stop kodonů. Nicméně získaný počet anotovaných genů je v porovnání s podobnými studii stejný, či dokonce vyšší. Například v již anotovaném genomu druhu *M. squamalis* byly identifikovány pouze dva protein-kódující geny, a to nad1 a nad5 (Yahalomi et al., 2020). Zdá se tedy, že i u plně „polishovaného“ genomu by nemuselo dojít k anotaci většího počtu genů, která znemožňuje identifikaci pozměněných genů pomocí BLAST. Hlavním důvodem je nejspíše již zmíněná vysoká evoluční rychlost mitochondriálních genů. Programem HHpred bylo zjištěno, že v některých případech nalezené ORF zahrnují transmembránové domény, které jsou typické pro některé mitochondriální geny. Toto zjištění by mohlo naznačovat, že by identifikované ORF mohly představovat mt geny, jejichž vysoká evoluční rychlost znemožnila jejich identifikaci.

Cirkulárnost mitochondriálního genomu lze předpokládat nejen na základě dosavadních studií druhů *E. leei*, *Kudoa* spp., *M. squamalis*, ale i studie druhu *P. hydriforme* spolu s kterým tvoří Myxozoa skupinu Endocnidozoa (viz Obrázek 7). K linearizaci mt genomu medusozoi nejspíše došlo až po odštěpení Endocnidozoi od Medusozoi (Novosol et al., 2022). To by mohl být podpůrný fakt pro odhalování evolučního původu myxozoi a mohl by tak vést k hlubšímu pochopení toho, kdy došlo k oddělení myxozoi od volně žijících žahavců. Otázkou zůstává, zdali u některých fylogenetických linií myxozoi nedošlo v průběhu evoluce k nezávislé linearizaci mitogenomu. Nepřímým důkazem by pak mohla být neschopnost amplifikovat zbytek mitochondriálního genomu pomocí LA PCR u druhů jako je např. *M. lieberkuehni*, kde selhala PCR snažící se doamplifikovat (spojit) zbytek kruhové molekuly. V tomto případě má známý kontig velikost přesahující 18 kbp, což dle dosavadních poznatků odpovídá velikosti celé molekuly mitogenomu (či jednoho fragmentu v případě druhu *E. leei*). Kromě lineárního charakteru mitogenomu by tato situace mohla být vysvětlena i neobvykle velkým mitogenomem, jako je to v případě druhu *Polypodium hydriforme* (Novosolov et al., 2022), u něhož byla metodicky amplifikace dlouhého úseku také neúspěšná.

Další otázkou je fragmentace mitogenomu myxozoi do několika cirkulárních molekul. Nezdá se, že v kompletnosti mitogenomů druhů *M. lieberkuehni*, *N. pickii* a *Zschokkella* sp. by mohl být, jak je již výše zmíněno, objasněn i tímto jevem. Možnost, že i mitochondriální genom druhu *M. squamalis* charakterizován jednou kruhovou molekulou (Yahalomi et al., 2020), by mohl být fragmentovaný není zcela nereálná. U tohoto druhu se podařilo identifikovat pouze dva geny. Navíc nebyl identifikován gen pro *cox1*, který je známý u všech ostatních druhů. Tato neobvyklá situace by šla vysvětlit tím, že se *cox1* nachází na jiné molekule DNA fragmentovaného genomu, kterou se zatím nepodařilo identifikovat.

Velikost mitochondriálních genomů se příliš nelišila od velikosti již sekvenovaných druhů. Publikované druhy s jednou cirkulární molekulou, tedy *K. hexapunctata* a *K. iwatai*, mají velikost 18,219 a 15,442 bp (Takeuchi et al., 2015). V této práci zkoumané druhy *Z. nova* a *S. molnari* mají velikost 24,860 a 14,015 bp. Z evolučního hlediska je zajímavé, že nejbližší žahavec *Polypodium hydriforme* má extrémně velký mitogenom (Novosolov et al., 2022), přičemž *S. molnari*, která je reprezentantem sesterské linie ke všem myxosporeím a mohli bychom u ní předpokládat ancestrální charakter, má genom naopak relativně malý. Můžeme se tedy domnívat, že *P. hydriforme* zvětšilo velikost genomu až po oddělení myxozoi. Bylo by tedy velmi zajímavé znát mitogenom malacosporií, vůbec první odštěpující se evoluční linie myxozoi, a tedy nejbližší příbuzné linie k původním žahavcům. Velikost zbylých zkoumaných druhů, u kterých byl v této práci získán pouze částečný genom, je otázkou. Jeden z kontigů *M. lieberkuehni* má přes 18 kb a jak již bylo diskutováno výše, mitogenom tohoto druhu může být poměrně veliký.

Pokud se zaměříme na pořadí genů v genomu, můžeme pozorovat poměrně velkou odlišnost v jeho uspořádání (Obrázek 22) mezi jednotlivými druhy. Stejné uspořádání se nachází pouze u dvou zástupců rodu *Kudoa*, *K. septempunctata* a *K. hexapunctata*. Třetí zástupce tohoto rodu se známým genomem, *K. iwatai*, postrádá protein kódující gen *nad4*. V tomto případě se však nejspíše jedná pouze o neschopnost tento gen anotovat. Žádný z nově anotovaných genomů nesdílí stejné pořadí genů s již popsanými druhy. Obecně bývá pořadí genů na blízké fylogenetické vzdálenosti dobře zachováno (Tamames et al., 1997). Během evoluce dochází ke ztrátě genového řádu a u vzdálenějších druhů je stupeň zachování genového řádu v genomu obvykle velmi nízký (Huynen & Bork, 1998). Nicméně mitogenom metazoi má poměrně stabilní uspořádání, a i v rámci žahavců, kteří jsou známí neobvyklým mitogenomem, je pořadí poměrně stabilní (Kayal et al., 2012). V případě myxozoi by zjištěná odlišnost uspořádání genů u fylogeneticky blízkých druhů mohla souviset s již dříve zmíněnou

vysokou evoluční rychlostí tohoto kmene. Zmíněná evoluční rychlost má za následek, jak bylo diskutováno výše, problémy v anotaci genů, a proto i námi zjištěné pořadí nemusí být přesné, respektive odpovídat skutečnosti z důvodu přítomnosti neidentifikovaných genů. To, že pořadí genů u myxozoi je ale velmi proměnlivé, lze předpokládat z již získaných dat.

U druhu *Zschokkella* sp. byla pozorována fragmentace genu pro *cox1*. Fragmentace mitochondriálního genu byla popsána například u zástupců čeledi Diplonemidea (Kaur et al., 2020). V jejich případě jsou jednotlivé genové fragmenty nazývány moduly. Chromozomy obsahující jednotlivé moduly jsou prepisovány odděleně. Modulové transkripty, jsou následně připojeny k jejich příbuzným sousedním modulům pocházejících z jiných chromozomů. Transkripty (mRNA a rRNA) jsou tak sestaveny prostřednictvím masivního trans-splicingu, jehož mechanismus zůstává neznámý (Moreira et al., 2016). U myxozoi prozatím podobná fragmentace popsána nebyla.

Dále byla v práci studována fylogeneze mitochondriálních genů. Jedním z důvodů bylo i ověření toho, že identifikované úseky nejsou části jaderných mitochondriálních pseudogenů, které by byly odhaleny právě fylogenetickou analýzou. Provedená fylogenetická analýza konkatenovaných genů víceméně podpořila předchozí fylogenetické studie založené na analýze mitochondriálních dat (Yahalomi et al., 2017; Novosolov et al., 2022), která na rozdíl od multigenových analýz genů kódovaných v jádře, umísťují Myxozoa s *P. hydriforme* do blízké příbuznosti hydrozoi. Ovšem tato pozice je pravděpodobně ovlivněna artefaktem, který plyne z nerovnoměrné evoluce analyzovaných taxonů (Siddall & Whiting, 1999). I v této diplomové práci Myxozoa a *P. hydriforme* vykazují extrémní rychlost evoluce, kterou lze pozorovat z délky větví (Obrázek 27). Co se týká vztahů v rámci myxozoi, můžeme pozorovat nejasné klastrování druhu *S. molnari*. Tento druh spolu s ostatními zástupci rodu *Sphaerospora* tvoří skupinu sesterskou ke všem myxosporeím a to na základě většiny analýz. Nicméně tato fylogenetická pozice není vždy stabilní. V práci Bartošová et al. (2009) například zástupce tohoto rodu klastroval ke sladkovodní skupině myxosporeí na základě LSU rDNA analýzy. Přesně takovou příbuznost odhalila konkatenovaná analýza několika mitochondriálních genů. Podobně je tomu i v případě fylogeneze na základě jednotlivých genů, kdy *cob* gen dokonce umístil *S. molnari* do blízké příbuznosti k *M. lieberkuehni*. V tomto případě tvoří *Sphaerospora* skupinu se zástupci sladkovodní skupiny infikující močový měchýř a vylučovací soustavu a odpovídalo by to obecnému trendu myxozoi, které klastrují podle lokalizace v hostiteli (Fiala, 2006). Ve všech analýzách klastruje mořský druh *Zschokkella* sp. ke sladkovodní linii.

Toto větvení je již u některých mořských druhů popsáno, například ve studii Fiala (2006) a souhlasí to i s analýzou SSU rDNA genu tohoto druhu, která byla kontrolně provedena (data nejsou ukázána). Postavení druhu *E. leei* v analýze na základě genu pro *cox2* je odlišné od předešlých analýz. V tomto případě se nejpravděpodobněji jedná o artefakt analýzy. Není předpokladem, že toto větvení odpovídá skutečné fylogenezi. Spíš se jedná o výsledek analýzy jednoho genu, který nemá dostatečný fylogenetický signál a i vzájemné vztahy taxonů jsou zde jen velmi slabě bootstrapově podpořeny.

Mapování struktury dosavadně publikovaných mitochondriálních genomů a v této práci nově získaných poznatků (Orázek1, přílohy) na fylogenezi žahavců podpořilo umístění skupiny Endocnidozoa dle Chang et al. (2015) mimo Medusozoa, které mají lineární chromozomy. Zároveň lze ze získané kruhové molekuly u druhu *S. molnari* a publikované molekuly druhu *P. hydriforme* usuzovat, že mitochondriální geny myxozoi jsou pravděpodobně odvozeny z jedné kruhové ancestrální molekuly, což se shoduje s předpokladem Yahalomi et al., (2017). Následně tedy došlo k fragmentaci na několik kruhovitých molekul v rámci mořské skupiny (*E. leiii*), popřípadě není úplně vyloučena ani fragmentace ve sladkovodní linii, viz diskuse výše (*M. lieberkuehni*). Tato původní molekula může být dokonce i ztracena (*H. salmonicola*). Tato magisterská práce nemůže plně zodpovědět otázku evoluce charakteru mitochondriálního genomu myxozoi, protože studium mitogenomu této unikátní a v mnoha směrech zvláštní skupiny žahavců je velmi náročné a přináší řadu úskalí, které se musí řešit nestandardními postupy získávání mitogenomů u myxozoi.

## 6. Závěr

Podařilo se mi získat sekvenci celého mitochondriálního genomu druhu *Zschokkella nova*. Tento genom je tvořen jednou kruhovitou molekulou o velikosti téměř 25 kbp. U druhů *Myxidium lieberkuehni*, *Nephrocystidium pickii*, a *Zschokkella* sp. jsem identifikovala částečný mitogenom v podobě nepřekrývajících se kontigů mitochondriálního charakteru.

Získané genomy spolu s genomem druhu *Sphaerospora molnari* poskytnutým školitelem jsem následně anotovala. Celkem se mi podařilo identifikovat 6 protein-kódujících genů, a to *cob*, *cox1*, *cox2*, *nad1*, *nad2* a *nad3* a geny pro RNA ribozomálních podjednotek. Pořadí těchto genů bylo mezi druhy velmi variabilní a neodpovídá tak všeobecnému dogmatu, kdy pořadí genů blízce příbuzných druhů bývá dobře zachováno. Zároveň jsem u druhu *Zschokkella* sp. zaznamenala fragmentaci genu pro *cox1*, která doposud u myxozoí nebyla popsána.

Fylogenetické analýzy jednak nepřímou potvrdily správnost získaných mitochondriálních dat (vyloučení možnosti sekvencí jako pseudogenů v jaderné DNA), ale také naznačily potřebu věnovat pozornost fylogenetickému postavení druhů rodu *Sphaerospora*, jejichž postavení nereflektovalo známou pozici odhalenou klasickou analýzou SSU rDNA.

Mapování popsaných genomů na fylogenezi žahavců poskytlo lepší pohled na evoluci jejich mitochondriálního genomu. Díky nově zjištěné kruhové molekule u druhu *Sphaerospora molnari*, jako první odvětvující se skupině v rámci myxosporeí, lze usuzovat, že ancestrálním typem je u nich právě jedna kruhová molekula mitochondriální DNA. Z dat se navíc můžeme domnívat, že k fragmentaci mohlo dojít nejen v mořské skupině myxozoí, ale i v její sladkovodní větvi (u druhu *M. lieberkuehni*). Tyto úvahy však budou muset být podpořeny dalšími daty získanými v probíhajícím výzkumu naší laboratoře.



## 7. Seznam použité literatury

- Aguilera, P., Barry, T., Tovar, J.** (2008). *Entamoeba histolytica* mitosomes: Organelles in search of a function. *Exp. Parasitol.* 118(1), 10–16.
- Americus, B., Lotan, T., Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D.** (2020). A comparison of the structure and function of nematocysts in free-living and parasitic cnidarians (myxozoa). *Int. J. Parasitol.* 50(10-11), 763–769.
- Andersson, S. G., Kurland, C. G.** (1999). Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2(5), 535–541.
- Armstrong, M.R., Blok, V.C., Phillips, M.S.** (2000). A multipartite mitochondrial genome in the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Genetics.* 154, 181–192.
- Bartošová-Sojková, P., Fiala, I., Hypša, V.** (2009). Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53, 81–93
- Bartošová-Sojková, P., Fiala, I.** (2020). Myxozoa: starobyílí paraziti neustále opředeni záhadami / Myxozoa: Ancient Parasites Forever Enshrouded in Mysteries *Živa.* 4, 162–167.
- Bernt, M., Braband, A., Schierwater, B., Stadler, P. F.** (2013). Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69(2), 328–338.
- Bernt, M., Donath A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritsch, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F.** (2013). MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69(2), 313–319.
- Blasco-Costa, I., Cutmore, S.C., Milner, T.L., Nolan, M.J.** (2016). Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. *Syst Parasitol.* 93:295–306.
- Boore, J. L.** (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic. Acids. Res.* 27(8), 1767–1780.
- Boore, J. L.** (2006). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Nautilus Macromphalus* (mollusca: Cephalopoda). *BMC Genom.* 7(1), 1–13.
- Boore, J.L., Brown, W.M.** (2000). Mitochondrial genomes of Galathealinum, Helobdella, and Platynereis: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Mol. Biol. Evol.* 17(1),87–106.
- Braband, A., Cameron, S.L., Podsiadlowski, L., Daniels, S.R., Mayer, G.** (2010). The mitochondrial genome of the onychophoran *Opisthopatus cinctipes* (Peripatopsidae) reflects the ancestral mitochondrial gene arrangement of Panarthropoda and Ecdysozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 285–292.
- Burger, G., Lavrov, D.V., Forget, L., Lang, B.F.** (2007). Sequencing complete mitochondrial and plastid genomes. *Nat. Protoc.* 2(3),603–14.
- Burki, F.** (2016). Mitochondrial Evolution: Going, Going, Gone. *Curr. Biol.* 26(10), 410–412.

- Callejón, R., Nadler, S., De Rojas, M., Zurita, A., Petrášová, J., Cutillas C.** (2013). Molecular characterization and phylogeny of whipworm nematodes inferred from DNA sequences of *cox1* mtDNA and 18S rDNA. *Parasitol. Res.* 112(11), 3933–49.
- Cameron, S. L., Yoshizawa, K., Mizukoshi, A., Whiting, M. F., Johnson, K. P.** (2011). Mitochondrial genome deletions and minicircles are common in lice (Insecta: Phthiraptera). *BMC Genom.* 12,1–15.
- Canning, E.U., Curry, A., Feist, S.W., Longshaw, M., Okamura, B.** (1999). *Tetracapsula bryosalmonae* n. sp. for PKX organism, the cause of PKD in salmonid fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19, 203–206.
- Canning, E.U., Tops, S., Curry, A., Wood, T.S., Okamura, B.** (2002). Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 280–295.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Joshi, S. K.** (2016). Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Rev. Fish. Sci.* 25(3), 184–217.
- Dyková, I., Lom, J.** (1988). *Chloromyxum reticulatum* (Myxozoa: Myxosporea) in the liver of burbot (*Lota lota* L.) and its migration to the final site of infection. *Eur. J. Protistol.* 23, 258–261.
- Elson, J.L., Lightowers, R.N.** (2006). Mitochondrial DNA clonality in the dock: can surveillance swing the case? *Trends. Genet.* 22, 603–607.
- Evans, N.M., Holder, M.T., Barbeitos, M.S., Okamura, B., Cartwright, P.** (2010). The phylogenetic position of Myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2733–2746.
- Feist, S.W., Longshaw, M., Canning, E.U., Okamura, B.** (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Dis. Aquat. Organ.* 45(1),61–68.
- Feist, S., Longshaw, M.** (2006). Phylum Myxozoa. In *Fish diseases and disorders: Volume 1: Protozoan and Metazoan infections* (2nd ed.). *CABI.* 1,230–296.
- Fiala, I.** (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Int J Parasitol.* 36(14),1521-34.
- Fiala, I., Bartošová-Sojková, P., Okamura, B., Hartikainen, H.** (2015). Adaptive radiation and evolution within the Myxozoa. In *Myxozoan evolution, ecology and development* *Springer* 1,69–84.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3,294–299.
- Frey, T. G., Mannella, C. A.** (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25(7), 319–324.
- Gasser, R.B., Zhu, X., McManus, D.P.** (1999). NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *Int. J. Parasitol.* 29,1965–70.

- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G.** (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*. 101(4), 301–320.
- Goldberg, A.V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R., Embley, T.M.** (2008). Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature*. 452(7187), 624–8.
- Gookin, J.L., Stebbins, M.E., Hunt, E., Burlone, K., Fulton, M., Hochel, R., Talaat, M., Poore, M., Levy, M.G.** (2004). Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and giardia infection. *J. Clin. Microbiol.* 42(6), 2707–2710.
- Grabner, D.S., El-Matbouli, M.** (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Dis. Aquat. Organ.* 79, 133–139.
- Gray, M.W.** (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb. perspect. biol.* 1,4-9.
- Green, M.R., Sambrook, J.** (2019). Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR). *Cold Spring Harb. Protoc.* 1,2019(3).
- Grover, A., Sharma, P.C.** (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 290–302.
- Gruhl, A.** (2015). Myxozoa In Evolutionary developmental biology of invertebrates: Introduction, non-bilateria, acoelomorpha, xenoturbellida, chaetognatha. *Springer* 1, 165–177.
- Guo, Q., Atkinson, S.D., Xiao, B., Zhai, Y., Bartholomew, J.L., Gu, Z.** (2022). A myxozoan genome reveals mosaic evolution in a parasitic cnidarian. *BMC Biol.* 20(1):51.
- Hackstein, J. H. P., Tjaden, J., Huynen, M.** (2006). Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Curr. Genet.* 50(4), 225–245.
- Haen, K.M., Pett, W., Lavrov, D.V.** (2010). Parallel loss of nuclear-encoded mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases and mtDNA-encoded tRNAs in Cnidaria. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2216–2219.
- Hallett, S.L., Bartholomew, J.L.** (2012). *Myxobolus cerebralis* and *Ceratomyxa shasta*. In Fish parasites: pathobiology and protection. *CABI*. 1,131–162.
- Harrison, R. G.** (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4(1), 6–11.
- Hartikainen, H., Gruhl, A., Okamura, B.** (2014). Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Mol Phylogenet Evol.* 76, 261–269.
- Hausmann, K., Hülsmann, N., Radek, R.** (2003). Protistology. 3rd completely revised edition. *E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung* 379 pp.
- Haqqi, T.M., Sarkar, G., David, C.S., Sommer, S.S.** (1988). Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 16, 11844–11844.
- Henriquez, F.L., Richards, T.A., Roberts, F., McLeod, R., Roberts, C.W.** (2005). The unusual mitochondrial compartment of *Cryptosporidium parvum*. *Trends. Parasitol.* 21(2):68–74.

- Holland, J.W., Okamura, B., Hartikainen, H., Secombes, C.J.** (2011). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proc. Royal Soc. B.* 278, 546–553.
- Holzer, A.S., Bartošová-Sojková, P., Born-Torrijos, A., Lövy, A., Hartigan, A., Fiala, I.** (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: A cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Mol. Ecol.* 27(7), 1651–1666.
- Hrabcová, M.** (2015). Biology, life cycle and phylogeny of malacosporeans in fish and bryozoans. Mgr. Thesis. 60 pp.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.** (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 17(8),754–5.
- Huynen, M.A., Bork, P.** (1998). Measuring genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95,5849–5856.
- Hwang, U.W., Kim, W.** (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasitol.* 37, 215–28.
- Chan, A.H.E., Chaisiri, K., Saralamba, S. Morand, S., Thaenkam, U.** (2021). Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. *Parasites Vectors* 14, 233.
- Chang, E.S., Neuhof, M., Rubinstein, N.D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D., Cartwright, P.** (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(48), 14912–14917.
- Chen, C., Chiou, C.Y., Dai, C.F., Chen, C.A.** (2008). Unique mitogenomic features in the scleractinian family Pocilloporidae (Scleractinia: Astrocoeniina), *Mar. Biotech.* 10,538–553.
- Chinnery, P.F., Schon, E.A.** (2003). Mitochondria. *JNNP.* 74, 1188–1199.
- Choudhary, K., Verma, A.K., Swaroop, S., Agrawal, N.** (2015). A review on the molecular characterization of digenean parasites using molecular markers with special reference to ITS region. *Helminthologia.* 52, 167–87.
- Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J. R., Beggs, A. D., Dilthey, A. T., Fiddes, I. T., Malla, S., Marriott, H., Nieto, T., O'Grady, J., Olsen, H. E., Pedersen, B. S., Rhie, A., Richardson, H., Quinlan, A. R., Snutch, T. P., Tee, L., Paten, B., Phillippy, A. M., Simpson, J. T., Loman, N. J., Loose M.** (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.* 36(4), 338–345.
- Jiménez-Guri, E., Philippe, B., Okamura, B., Holland, H.W.P.** (2007). *Buddenbrockia* Is a Cnidarian Worm. *Science.* 317, 116–118.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivarès, C.P.** (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 414(6862):450–453.
- Katoh, K., Standley, D.M.** (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4):772–80.

- Kaur, B., Záhonová, K., Valach, M., Faktorová, D., Prokopchuk, G., Burger, G., Lukeš, J.** (2020). Gene fragmentation and RNA editing without borders: eccentric mitochondrial genomes of diplomemids. *Nucleic. Acids. Res.* 48(5):2694–2708.
- Kaur, H., Gupta, A., Kaur, P.** (2023). The Cnidarian Journey of Myxozoa. In Biodiversity: Threats and conservation. *CRC Press.* 1, 209–219.
- Kayal, E., Lavrov, D.V.** (2008). The mitochondrial genome of *Hydra oligactis* (Cnidaria, Hydrozoa) sheds new light on animal mtDNA evolution and cnidarian phylogeny. *Gene.* 410, 177–186.
- Kayal, E., Bentlage, B., Collins, A.G., Kayal, M., Pirro, S., Lavrov, D.V.** (2012). Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians. *Genome Biol Evol.* 4(1), 1–12.
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.L., El-Matbouli, M., Desser, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffmann, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, R.J., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E., Xiao, C.** (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48(4),395–413.
- Kocher, T., Thomas, W., Meyer, A., Edwards, S., Pääbo, S., Villabanc, F., Wilson, A.** (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS.* 86(16), 6196–6200.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., Pevzner, P. A.** (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* 37(5), 540–546.
- Lavrov, D.V., Brown, W.M. and Boore, J.L.** (2004). Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan) crustacean relationships. *Sciences*, 271(1538), 537–544.
- Lavrov, D.V., Pett, W.** (2016). Animal Mitochondrial DNA as We Do Not Know It: mt-Genome Organization and Evolution in Nonbilaterian Lineages. *Genome Biol. Evol.* 8(9):2896–2913.
- Lindmark, D.G., Müller, M.** (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248(22), 7724–7728.
- Lom, J., Dyková, I.** (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol.* 53(1), 1–36.
- Lom, J., Pavlásková, M., Dyková, I.** (1987). Brain thelohanellosis due to *Thelohanellus oculileucisci* (Myxozoa: Myxosporea) in *Gobio gobio*. *Folia Parasitol.* 34(4),375–377.
- Lom, J., Dyková, I.** (1997). Ultrastructural features of the actinosporean phase of myxosporea (Phylum Myxozoa): a comparative study. *Acta Protozool.* 36, 83–103.
- Lom, J., Artur, J. R.** (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J. Fish Dis.* 12, 151–156.
- Longshaw, M., Le Deuff, R.M., Harris, A.F., Feist, S.W.** (2002). Development of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *J. Fish. Dis.* 25, 443–449.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., Samuelson, J.** (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ('crypton') in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2198–2205.

- Margulis, L.** (1970). Origin of Eukaryotic Cells, *Yale University Press*. 349 pp.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S.** (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* 16(14), 551–560.
- McGurk, C., Morris, D.J., Bron, J.E., Adams, A.** (2005). The morphology of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) spores released from *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *J. Fish Dis.* 28, 307–312.
- McPherson, R. A., McPherson, R. A., Pincus, M. R.** (2021). Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods (24th Edition) *Elsevier*. 1618 pp.
- Medina, M., Collins, A.G., Takaoka, T.L., Kuehl, J.V., Boore, J.L.** (2006). Naked corals: Skeleton loss in Scleractinia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9096–9100.
- Mishra, P., Chan, D.C.** (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 634–646.
- Molnár, K.** (2002). Site preference of fish myxosporeans in the gill. *Dis. Aquat. Org.* 48, 197–207.
- Monteiro, A.S., Okamura, B. and Holland, P.W.H.** (2002). Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan. *Mol. Biol. Evol.* 19, 968–971.
- Moreira, S., Valach, M., Aoulad-Aissa, M., Otto, C., Burger, G.** (2016). Novel modes of RNA editing in mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 44:4907–4919.
- Morris, D.J., Adams, A.** (2008). Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology.* 135, 1075–1092.
- Navdeep, S., Chandel** (2015). Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles, *Cell Metab.* 22(2), 204–206.
- Nguyen, L., Minh, B., Q., Schmidh, T. H. A., von Haeseler, A.** (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies, *Mol Biol Evol.* 32:268–274.
- Nielsen, C.V., Kjøie, M., Székely, C., Buchmann, K.** (2002). Comparative analysis of 18S rRNA genes from *M. aeglefini* Auerbach, 1906 isolated from cod, plaice and dab, using PCR-RFLP. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22, 201–205.
- Novosolov, M., Yahalomi, D., Chang, E.S., Fiala, I., Cartwright, P., Huchon, D.** (2022). The Phylogenetic Position of the Enigmatic, *Polypodium hydriforme* (Cnidaria, Polypodiozoa): Insights from Mitochondrial Genomes. *Genome Biol Evol.* 14(8),112.
- Okamura, B., Curry, A., Wood, T.S., Canning, E.U.** (2002). Ultrastructure of *Buddenbrockia* sp. identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa. *Parasitology* 124, 215–223.
- Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L.** (2015). Cnidarian Origins of the Myxozoa. In Myxozoan evolution, ecology and development. *Springer*. 1, 45–68.

- Pagliarini, D.J., Rutter, J.** (2013). Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev.* 27(24):2615–27.
- Poon, R.W.S., Tam, E.W.T., Lau, S.K.P., Cheng, V.C.C., Kwok, Y.Y., Schuster, R.K., Woo, P.C.Y.** (2017). Molecular identification of cestodes and nematodes by *cox1* gene real-time PCR and sequencing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 89, 185–90.
- Pote, L.M., Hanson, L.A., Shivaji, R.** (2000). Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia). *J. Aquat. Anim. Health.* 12, 230–240.
- Raimond, R., Marcadé, I., Bouchon, D., Rigaud, T., Bossy, J.-P., Souty-Grosset, C.,** (1999). Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics.* 151, 203–210.
- Rose, J.D., Marrs, G.S., Lewis, C., Schisler, G.** (2000). Whirling behaviour and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health.* 12, 107–118.
- Shao, Z., Graf, S., Chaga, O., Lavrov, D.** (2006). Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene.* 381, 92–101.
- Shiflett, A.M., Johnson, P.J.** (2010). Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 409–29.
- Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Desser, S. S., Cone, D. K.** (1995). The demise of a phylum of protist; Phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *Journal of parasitology* 8, 961–967.
- Siddall, M. E., Whiting, M. F.** (1999). "Long-Branch Abstractions". *Cladistics.* 15: 9–24.
- Smith, D.R., Kayal, E., Yanagihara, A.A., Collins, A.G., Pirro, S., Keeling, P.J.** (2012). First complete mitochondrial genome sequence from a box jellyfish reveals a highly fragmented linear architecture and insights into telomere evolution. *Genome Biol. Evol.* 4, 52–8.
- Smothers, J.F., Dohlen, von C.D., Smith, L.H., Spall R.D.** (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science.* 265,1719–1721.
- Söding, J., Biegert, A., Lupas, A.N.** (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic. Acids Res.* 33, 244–248.
- Stamatakis, A.** (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30(9):1312–3.
- Suga, K., Welch, D.B.M., Tanaka, Y., Sakakura, Y., Hagiwara, A.** (2008). Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1129–1137.
- Székely, C., Hallett, S., Atkinson, S., Molnár, K.** (2009). Complete life cycle of *Myxobolus rotundus* (Myxosporidia: Myxobolidae), a gill myxozoan of common bream *Abramis brama*. *Dis. Aquat. Org.* 85, 147–55.
- Štöle, A.** (1899). Actinomyxidies, nouveau groupe de Mésozoaires parents des Myxosporidies. *Bull. Intl. Acad. Sci. Bohème,* 22, 1–12.

- Taanman, J.W.** (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Bioenergetics* 2,103–123.
- Tachezy, J.** (2019). “Mitosomes in Parasitic Protists,” in *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes, Microbiology Monographs 9, Springer Nature*. 1, 205–242.
- Technau, U., Steele, R.E.** (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development*. 138(8):1447–1458.
- Takeuchi, F., Sekizuka, T., Ogasawara, Y., Yokoyama, H., Kamikawa, R., Inagaki, Y., Nozaki, T., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T., Kuroda, M.** (2015). The Mitochondrial Genomes of a Myxozoan Genus *Kudoa* Are Extremely Divergent in Metazoa. *PLoS One*. 0(7):e0132030.
- Tamames, J, Ouzounis, C, Casari, G, Valencia, A.** (1997). Conserved clusters of functionally related genes in two bacterial genomes. *J. Mol. Evol.*44:66–73.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L. B., Sutak, R.** (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 127–128.
- van Hoek, A. H., Akhmanova, A. S., Huynen, M. A., Hackstein, J. H.** (2000). A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 17(1), 202–206.
- Voigt, O., Erpenbeck, D., Wörheide, G.** (2008). A fragmented metazoan organellar genome: the two mitochondrial chromosomes of *Hydra magnipapillata*. *BMC Genomics*. 26(9), 350.
- Wahli, T., Knuesel, R., Bernet, D., Segner, H., Pugovkin, D., Burkhardt-Holm, P., Escher, M. Schmidt-Posthau, H.** (2002). Proliferative kidney disease in Switzerland: current state of knowledge. *J. Fish. Dis.* 25, 491–500.
- Waldner, K, Borkovec, M, Borgwardt, F, Unfer, G, El-Matbouli, M.** (2021). Effect of water temperature on the morbidity of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) to brown trout (*Salmo trutta*) under laboratory conditions. *J. Fish Dis.* 44(7),1005–1013.
- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., Au, K.F.** (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat. Biotechnol.* 39(11), 1348–1365.
- Wei, W., Schon, K.R., Elgar, G., Orioli, A., Tanguy, M., Giess, A., Tischkowitz, M., Caulfield, M.J., Chinnery, P.F.** (2022). Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes. *Nature*. 611(7934):105–114.
- Weill, R.** (1938). L'interpretation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses cuninides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereaux* 13, 727–744.
- Wiens, J.J.** (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst. Biol.* 56, 875–8.
- Wolf, K., Markiw, M.E.** (1984). Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*. 225, 1449–1452.
- Yahalomi, D., Atkinson, S. D., Neuhof, M., Chang, E. S., Philippe, H., Cartwright, P., Huchon, D.** (2020). A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: Henneguya) lacks a mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117(10),5358–5363.



**Yahalomi, D., Haddas-Sasson, M., Rubinstein, N. D., Feldstein, T., Diamant, A., Huchon, D.** (2017). The Multipartite Mitochondrial Genome of *Enteromyxum leei* (Myxozoa): Eight Fast-Evolving Megacircles. *Mol. Biol. Evol.* 34(7), 1551–1556.

**Yan, C., Duanmu., X, Zeng, L., Liu, B., Song, Z.** (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells.* 8(4), 379.

**Yokoyama, H., Urawa, S.** (1997). Fluorescent labelling of actinospores for determining the portals of entry into fish. *Dis. Aquat. Org.* 30, 165–169.

**Yokoyama, H.** (2003). A Review: Gaps in Our Knowledge on Myxozoan Parasites of Fishes. *Fish Pathol.* 38, 125–136.

**Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A.N., Alva, V.** (2018). A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J. Mol. Biol.* 430(15), 2237–2243.

#### **Online zdroje:**

**Google** (Online) GoogleEarth (cit. 16.03.2023).

Dostupné z: <https://earth.google.com/web/search/Vevang>

**Takara Bio—Home** (online) Takara Bio Inc. (cit. 13.03.2023).

Dostupné z: <https://www.takarabio.com/products/pcr/long-range-pcr/la-taq-products>

**MtViz** (online) Schwarmintelligenz und Komplexe Systeme (cit. 25.03. 2023).

Dostupné z: <https://www.pacosy.informatik.uni-leipzig.de>

**Mitos** (online) Schwarmintelligenz und Komplexe Systeme (cit. 20.03. 2023).

Dostupné z: <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>

## 8. Přílohy

**Tabulka 1.** Seznam nalezených ORF u druhu *Zschokkella nova*, jejich pozice a srovnání jejich anotace dvěma odlišnými programy.

ORF	Začátek	Konec	Směr	Hhpred (pravděpodobnost v %)	Mitos
10	515	2,254	<-	cob (100)	cob + nad5
12	2,191	3,465	<-		
1	2,53	3,12	->		
5	9,792	10,316	<-		
4	11,337	12,461	<-	nad1 (100)	nad1
11	12,121	13,149	<-	cox2 (100)	cox2 + nad1/4
3	13,083	14,501	<-	nad2 (84,89)	nad4
9	14,018	16,252	<-		
2	20,094	21,152	<-		
8	20,252	20,974	<-		
7	21,203	24,859	<-		
6	21,203	25,315	<-	cox1 (100)	cox1 + cox3 + cob + atp6 + nad3/4
13	10,971	11,33	<-	nad3 (90,63)	nad3

**Tabulka 2.** Geny kódující proteiny druhu *Zschokkella nova* detekovány programem MITOS, jejich pozice a srovnání s výsledkem programu HHpred.

Začátek	Konec	Mitos	Hhpred (pravděpodobnost v %)
3	323	cox1-1	cox1 (98,72)
980	1138	nad2-1	nad3 (45,53)
1166	1300	nad2-2	
1292	2101	cob	cob (100)
3022	3684	nad2-0	
10998	11279	nad3	nad1 (81,28)
			nad3 (79,89)
11370	12218	nad1	nad1 (99,62)
12310	12777	cox2-0	cox2 (99,75)
13191	13751	nad4-2	nad2 (62,62)
			nad4 (61,61)
13754	13798	nad4-3	
13814	13837	nad4-4_a	
13847	13858	nad4-4_b	
14164	14847	nad5	
18020	18238	cox2-1	
20226	21131	nad4-0	
21260	21745	atp6	
22445	23242	nad4-1	
23813	24859	cox1-0	cox1 (100)

**Tabulka 3.** Seznam nalezených ORF u druhu *S. molnari*, jejich pozice a srovnání jejich anotace dvěma odlišnými programy.

ORF	Začátek	Konec	Směr	Hhpred (pravděpodobnost v %)	Mitos
3	3,336	3,785	<-		nad5
2	4,008	4,523	<-		
4	4,547	5,974	<-	cox1 (100)	cox1
6	5,974	7,896	<-		nad2 + nad4
5	8,029	8,715	<-	cox2 (100)	cox2
1	8,673	9,764	<-	cob (100)	cob

**Tabulka 4.** Geny kódující proteiny druhu *S. molnari* detekovány programem MITOS, jejich pozice a srovnání s výsledkem programu HHpred.

Začátek	Konec	Mitos	Hhpred (pravděpodobnost v %)
3,489	3,809	nad3	
3,966	4,181	nad2_b	
4,203	4,238	nad2_a	
4,586	5,959	cox1	cox1 (99,98)
7,596	7,7	nad4l	
8,053	8,583	cox2	cox2 (99,53)
8,796	9,698	cob	cob (99,89)

**Tabulka 5.** Seznam nalezených ORF na kontizích druhu *M. lieberkuehni*, jejich pozice a srovnání jejich anotace dvěma odlišnými programy.

Contig	ORF	Začátek	Konec	Směr	Hhpred (pravděpodobnost v %)	Mitos
1	1	7	330	->		nad6
	2	351	2,285	->	cox1 (100)	cox1
	3	1,079	1,414	<-		cox1
2	1	2,197	2,676	<-	cob (57.02)	cob
	3	6,537	7,016	<-	cob (57.02)	cob
	5	13,445	14,401	<-	nad1(98.81)	nad1
	2	14,355	15,413	<-		nad5
	4	17,3	17,95	<-		nad4

**Tabulka 6.** Geny kódující proteiny druhu *M. lieberkuehni* detekovány programem MITOS, jejich pozice a srovnání s výsledkem programu HHpred.

Contig	Začátek	Konec	Mitos	Hhpred (pravděpodobnost v %)
1	122	322	nad4l	
	375	1775	cox1	cox1 (100)
	2143	2262	nad6-0	
2	23	415	nad4-1	
	484	1818	nad5-1	
	2398	2643	cob	cob (52,7)
	3547	3753	nad4l	
	4347	4661	nad6	
	5338	6063	nad1-1	
	13559	14350	nad1-0	nad1 (98,88)
	14199	15359	nad5-0	
	16037	16168	atp8	
	17441	17848	nad4-0	
	17828	17950	cox1-1	
	18073	18219	cox1-0_b	cox1 (97,4)
	18267	18353	cox1-0_a	

**Tabulka 7.** Seznam nalezených ORF na kontizích druhu *N. pickii*, jejich pozice a srovnání jejich anotace dvěma odlišnými programy.

Contig	ORF	Začátek	Konec	Směr	Hhpred (pravděpodobnost v %)	Mitos
1	1	2,467	2,775	->		nad4
2	1	4,118	4,597	<-	nad1 (84,82)	nad1
	2	5,037	5,456	<-		nad4
3	1	1	321	->		cox1 + nad5
	3	719	1,042	->	cox1 (88,34)	cox1
	2	979	1,308	->	nad3 (32,88)	cox1
4	2	1,385	1,684	<-	cox (28,6)	nad6
	3	3,601	3,915	<-	cob (94,86)	cob
	1	5,469	5,771	<-		nad5

**Tabulka 8.** Geny kódující proteiny druhu *N. pickii* detekovány programem MITOS, jejich pozice a srovnání s výsledkem programu HHpred.

Contig	Začátek	Konec	Mitos	Hhpred (pravděpodobnost v %)
1	392	598	atp6	
	2214	2432	nad4_a	
	2434	3762	nad4_b	
	4139	4426	nad3	
	8032	8316	nad6	
2	3630	3818	nad4l	
	4279	5928	nad5-0	
3	6	77	cox1-1	
	200	994	cox1-0	cox1 (96,27)
	968	1384	nad6	
	1815	1952	nad4l	
	2026	2394	nad5	
	2426	2533	atp8	
	3016	3321	nad1	
	4	125	373	atp6-0
4	403	588	nad4l	
	1763	2092	nad5-2	
	2095	3444	nad5-0	
	3517	3528	nad6	
	3616	3882	cob	cob (94,75)
	5171	5497	nad3	nad3 (20,54)
	5471	5662	atp6-1	

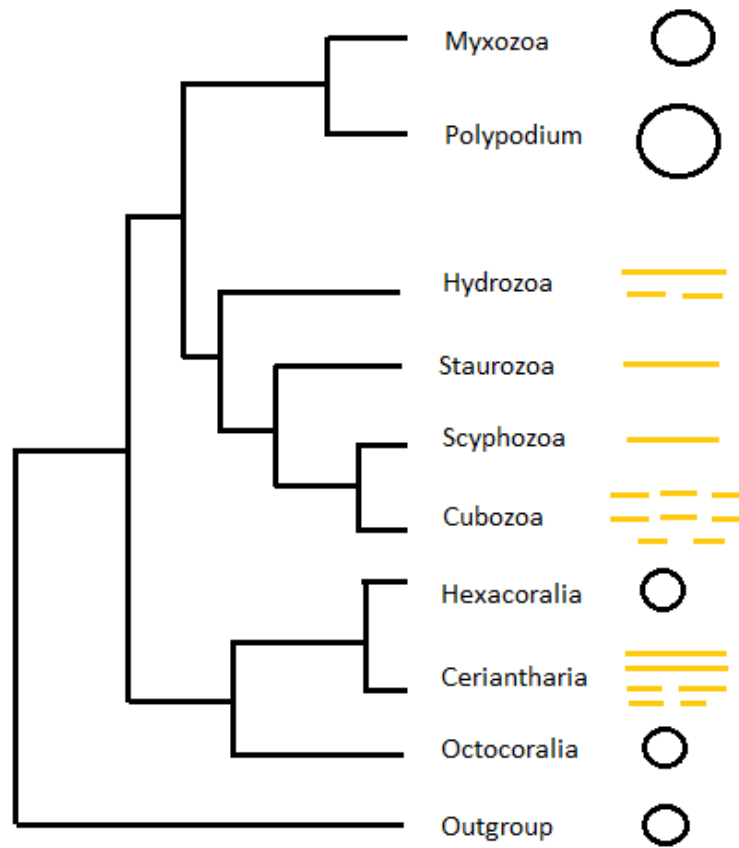
**Tabulka 9.** Seznam nalezených ORF na kontizích druhu *Zschokkella* sp., jejich pozice a srovnání jejich anotace dvěma odlišnými programy.

Contig	ORF	Začátek	Konec	Směr	Hhpred (pravděpodobnost v %)	Mitos
1	5	4,463	5,158	<-		cox1
	3	6,237	7,001	<-		nad4
	7	9,655	10,566	<-	cob (98,25)	cob
	1	10,322	10,963	->		cob + nad2
	6	12,238	12,924	<-		
	4	12,755	13,612	<-		nad5
	2	14,148	14,861	->		nad6
2	1	193	780	->	cox1 (99,54)	cox1
3	6	120	578	<-	cox1 (99,39)	cox1
	5	509	946	<-	cox1 (99,56)	cox1 + nad6
	3	1,331	2,065	->	cox1 (99,77)	cox1a + cox1b
	1	1,960	2,385	->	cox1 (99,57)	cox1
	4	2,316	2,774	->	cox1 (99,39)	cox1
	2	13,246	13,830	->		
4	1	461	919	->		
	4	472	903	<-		
	6	840	1,295	<-		
	3	1,846	2,277	<-		
	2	1,835	2,293	->		
	5	2,214	3,335	<-	cob (99,97)	cob
5	1	356	667	<-	nad1 (89,41)	nad1
6	1	476	919	<-		nad2
7	1	47	901	->		
	3	862	1,173	<-	cox2 (92,05)	cox2
	2	1,186	1,509	<-		nad6
8	4	330	1,013	->	cox1 (99,48)	cox1
	8	686	1,381	<-	cox1 (99,28)	cox1
	7	741	1,184	<-		cox1
	10	1,378	1,896	<-	cox1 (95,34)	cox1a + cox1b
	9	2,839	3,264	<-	cox1 (99,57)	cox1
	6	3,159	3,614	<-	cox1 (99,19)	cox1a + cox1b
	5	4,284	4,769	->	cox1 (99,31)	cox1a + cox1b
	2	4,664	5,089	->	cox1 (99,57)	cox1 + nad6
	1	5,02	5,544	->	cox1 (99,43)	cox1
	3	6,155	6,592	->	cox1 (98,28)	cox1

**Tabulka 1010.** Geny kódující proteiny *Zschokkella* sp. detekovány programem MITOS, jejich pozice a srovnání s výsledkem programu HHpred.

Contig	Začátek	Konec	Mitos	Hhpred (pravděpodobnost v %)
450	200	742	nad1	
	2,548	2,922	nad5-2	
	4,175	5,134	nad4-1	
	5,254	5,727	nad4-4	
	6,405	6,932	nad4-0	
	9,346	9,708	nad5-0	
	10,055	10,165	cob-1	cob (96,04)
	10,162	10,524	cob-0	cob (98,66)
	10,523	10,942	nad2	
	12,343	12,675	nad5-1	
	13,037	13,450	nad6-1	
	14,235	14,642	nad4-5	
	16,168	16,662	nad4-2	
453	17	223	cox1-0_a	cox1 (97,24)
	220	525	cox1-0_b	cox1 (99,62)
	830	1,036	cox1-1_a	cox1 (97,24)
463	138	548	cox1-1_b	cox1 (99,26)
	557	907	cox1-1_a	cox1 (99,61)
	1,361	1,99	cox1-0_a	cox1 (99,79)
	1,987	2,337	cox1-0_b	cox1 (97,24)
	2,346	2,756	cox1-0_c	cox1 (99,26)
465	985	1,302	nad1	
	2,460	3,314	cob	cob (100)
620	15	323	nad3	nad3 (95,79)
	395	667	nad1	nad1 (85,61)
621	46	396	cox2	cox2 (91,31)
	551	919	nad2	
	110	796	nad2	
	880	1,173	cox2	cox2 (92,25)
	1,210	1,431	nad6	
2633	1	351	cox1_3_a	cox1 (99,61)
	360	752	cox1_2_c	cox1 (99,15)
	929	1,366	cox1_1_c	cox1 (99,25)
	1,690	1,923	cox1_2_a	cox1 (97,34)
	1,344	1,694	cox_1_2_b	cox1 (98,32)
	2,499	2,633	cox1_3_c	
	2,624	2,878	cox1_3_b	cox1 (98,65)
	3,234	3,638	cox1_1_a	cox1 (99,39)
	3,605	3,853	nad1	cox1 (95,80)
	4,209	4,694	cox1_0_a	cox1 (99,31)
	4,691	5,041	cox1_0_b	cox1 (99,61)

	5,050	5,460	cox1_0_c	cox1 (99,26)
--	-------	-------	----------	--------------



**Obrázek 1.** Grafické znázornění evoluce struktury mitochondriálního genomu žahavců.