

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Morfologická a molekulární charakterizace druhů rodu
***Ceratomyxa* (Myxozoa) u ryb z čeledi Clinidae z pobřeží**
jižní Afriky

Diplomová práce

Bc. Tereza Tomková

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

České Budějovice 2016

Tomková, T., 2016: Morfologická a molekulární charakterizace druhů rodu *Ceratomyxa* (Myxozoa) u ryb z čeledi Clinidae z pobřeží jižní Afriky. [The morphological and molecular study of *Ceratomyxa* species (Myxozoa) in clinid fish from the tip of South Africa. Mgr. Thesis, in Czech.]- 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The subject of this master thesis is to morphologically and molecularly characterize *Ceratomyxa* species (Myxozoa) found in clinid fish from the tip of South Africa. Molecular characterisation of those species was done based on SSU rDNA and morphological structure of those parasites was examined. It was determined whether some of morphologically identical parasites represent in fact, different species. Phylogenetic relationships between different species in connection with their natural habitats were analysed and a correlation between population structure of *Ceratomyxa* species and their host species was discussed.

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených pramenů a literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě archivované Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 22. 4. 2016

.....

Tereza Tomková

Poděkování

Děkuji RNDr. Ivanu Fialovi, Ph.D. za možnost vypracování diplomové práce právě pod jeho vedením, za jeho ochotu a odborné rady. Dále děkuji svému kolegovi Bc. Jiřímu Kyslíkovi za podporu a spolupráci během celého studia a také všem členům laboratoře rybí protistologie.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1 Obecná charakteristika skupiny Myxozoa.....	3
2.2 Morfologická struktura myxozoí.....	4
2.3 Fylogenetické postavení myxozoí – historie a současnost	5
2.4 Onemocnění – přenos, faktory prostředí, průběh a významní zástupci.....	7
2.5 Charakteristika a životní cyklus třídy Myxosporea	9
2.6 Rod <i>Ceratomyxa</i>	11
2.7 Hostitelský druh – <i>Clinus cottoides</i>	14
2.8 Druhy rodu <i>Ceratomyxa</i> u paslizonovitých ryb.....	15
3. Cíle práce	16
4. Metodika práce	17
4.1 Materiál.....	17
4.2 Metody.....	18
4.2.1 Metody studie morfologie	18
4.2.1.1 Světelná mikroskopie	18
4.2.2 Molekulární metody	18
4.2.2.1 Izolace DNA	18
4.2.2.2 Nested PCR	19
4.2.2.3 Gelová elektroforéza a extrakce PCR produktů.....	20
4.2.2.4 DNA klonování za pomoci vektoru.....	20
4.2.2.5 Sekvenace	20
4.2.2.6 Fylogenetické analýzy	21
5. Výsledky	22
5.1 Charakterizace nalezených druhů rodu <i>Ceratomyxa</i>	22
5.2 Fylogenetické vztahy	28
6. Diskuze	32
7. Závěr	36
8. Přílohy	38
9. Zdroje	39

Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonucleid acid – deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate – deoxyribonukleotid trifosfát
ddNTP	dideoxyribonucleotide triphosphate – dideoxyribonukleotid trifosfát
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonucleic acid – ribonukleová kyselina

1. Úvod

Parazitismus jako vysoce specializovaná životní strategie organismů je jednou z nejrozšířenějších evolučních strategií života vůbec. V dnešní době se dokonce předpokládá, že každý organismus může být hostitelem rovnou několika dalších parazitických organismů. Tento fakt vede k závěru, že značná část organismů jsou parazité a tedy že největší počet ze všech organismů žije parazitickým způsobem života. Parazitický způsob života nalézáme u organismů v každé významné taxonomické skupině, a to od bakterií a virů až po obratlovce. Tento fenomén se také v přírodě vyskytuje v rozličném množství forem a strategií (Volf, Horák a kol. 2007).

Z hlediska lidského zdraví bylo Světovou zdravotnickou organizací (WHO) stanoveno deset nejvýznamnějších infekčních onemocnění na světě. Osm z těchto deseti infekčních onemocnění je parazitárních či parazity přenášených (www.who.int).

Není tedy pochyb o tom, že výzkumná činnost v tomto oboru biologie nabývá stále více na významu. Ačkoli došlo za posledních několik desetiletí v této oblasti výzkumu k velkému množství zásadních objevů, parazitická onemocnění i nadále zůstávají klíčovými tématy humánní i veterinární medicíny. Současný trend pozorovaný u některých infekčních onemocnění je takový, že se postupně zvyšují počty infikovaných osob, zvětšuje se areál rozšíření daného onemocnění, což následně zvyšuje riziko vzniku pandemií. Zmíněná nejvýznamnější lidská infekční onemocnění se týkají převážně tropického a subtropického podnebného pásu, jejich výzkumem se ale v současnosti zabývají laboratoře ve vyspělých zemích prakticky po celém světě (Volf, Horák a kol. 2007). Z výsledků unikátní studie, kterou vypracovali vědci z institutu CERGE-EI a Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR a která srovnává celkový a špičkový publikační výkon ČR a dalších států, vyplývá, že v rámci České republiky si v přírodních vědách stojí nejlépe také právě parazitologie. Ta podle autorů zaujímá v mezinárodním srovnání velice solidní pozici a produkce článků v této vědní disciplíně je nadprůměrná (Jurajda, Kozoubek, Münich, Škoda 2015).

Odvětví parazitologie zabývající se studiem parazitů ryb je velice bohaté. Parazity, kteří využívají rybu jako mezihostitele nebo ji napadají jako hostitele definitivního, můžeme nalézt v rozličných skupinách organismů – viry (Vira), bakterie (Bacteria), houby (Fungi), mikrosporidie (Microsporidia), améboidní protista (Amoebozoa), bičíkovci (Flagellata), výtrusovci (Apicomplexa), nálevníci (Ciliophora), jednorodí (Monogenea), tasemnice (Cestoda), vrtejší (Acanthocephala), hlístice (Nematoda), korýši (Crustacea) či

rybomorky (Myxozoa) (Eiras a kol. 2008).

První zástupci myxozoi byli objeveni na počátku 19. století (Jurine 1825; Müller 1841) a od té doby stále narůstá počet nově popsanych druhů. V počátečních fázích výzkumu těchto organismů nebyl jejich možný ekonomický dopad považován za příliš důležitý. Toto se radikálně změnilo s rozšířením akvakultury v pozdních letech 20. století. V současné době je známo mnoho onemocnění ryb, jež jsou způsobována parazity ze skupiny Myxozoa. Ekonomicky nejvýznamnější jsou nákazy lososovitých a kaprovitých ryb, ale také mořských ryb chovaných v klecových chovech. Patrně nejznámějšími příklady onemocnění ryb jsou např. zánětlivé onemocnění ledvin (proliferative kidney disease) způsobované druhem *Tetracapsuloides bryosalmonae*, ceratomyxóza (ceratomyxosis) způsobovaná zástupcem *Ceratomyxa shasta* či tzv. „whirling disease“ způsobované druhem *Myxobolus cerebralis* (Feist 2008). Všechny zmíněné druhy parazitů najdeme u lososovitých ryb.

2. Literární přehled

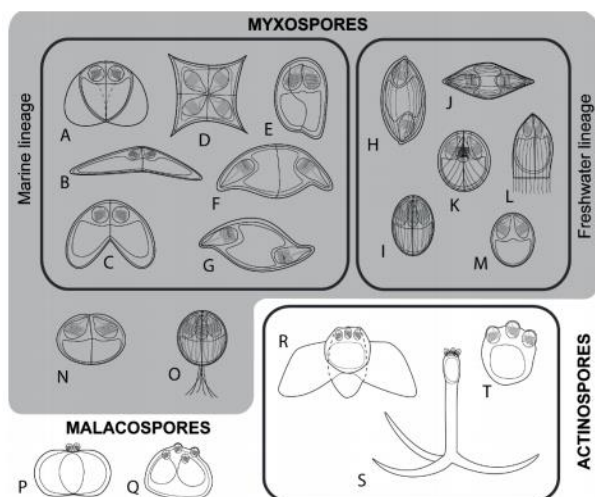
2.1 Obecná charakteristika skupiny Myxozoa

Myxozoa Grassé, 1970 byla až do roku 1995 považována za kmen v rámci protozoí (Sniddall a kol. 1995). Ačkoli dnes již s jistotou víme, že se jedná o parazitickou skupinu patřící do mnohobuněčných živočichů (Metazoa) (Nielsen 2001), Myxozoa jsou tradičně v odborných publikacích prezentována společně se skupinou Protista, a to především kvůli mikroskopické velikosti jejich těla. Myxozoa jsou tedy obligátní mnohobuněční endoparazité především vodních bezobratlých a obratlovců. Mají redukovanou velikost těla a sekundárně přešli k parazitickému způsobu života (Lom a Dyková 2006). Myxozoa mají komplexní životní cyklus zahrnující bezobratlého hostitele, jenž je definitivní, i obratlovčího hostitele, jenž je mezihostitelem (Wolf a Markiw 1984). Typickým útvarem, který Myxozoa vytváří v těle obou typů hostitele, jsou mnohobuněčné spory s přítomností pólových váčků. Jedná se tedy o vysoce odvozené a morfologicky zjednodušené zástupce žahavců (Cnidaria) (Jiménez-Guri a kol. 2007; Collins 2009; Holland a kol. 2010). Tato skupina zahrnuje v současné době přes 2 400 zástupců řazených do přibližně 65 rodů (Fiala a kol. 2015), čímž významně přispívají k celkové diverzitě kmene žahavců, jenž obsahuje přes 10 000 popsaných druhů (Zhang 2011). Skupina Myxozoa je dělena na dvě třídy – Myxosporea Bütschli, 1881 a Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw a Okamura, 2000. Značná část zástupců skupiny Myxozoa parazituje na rybách (Osteichthyes) či obojživelnících (Amphibia) a kroužkovcích (Annelida) a patří do třídy Myxosporea. Třída Malacosporea reprezentuje pouze nepatrnou část celkové biodiverzity myxozoí. Její zástupci parazitují v tělních dutinách vodních mechovek (Bryozoa), z nichž jsou uvolňována infekční stádia, která mohou následně infikovat ledvinné kanálky ryb (Hedrick a kol. 2004; Grabner a El-Matbouli 2010). Jediným zástupcem malacosporeí, u něž byl kompletně zmapován životní cyklus, je druh *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Feist a kol. 2001; Morris a Adams 2006).

2.2 Morfologická struktura myxozoi

Klasifikace myxozoi je založená především na morfologii myxospory – vývojového stádia typického pro Myxozoa. V současné době už víme, že tento systém klasifikace je nedostačující. Třída Myxosporea zahrnuje veliké množství tzv. morfotypů (viz Obr. 1), jejichž rysy mohou často poskytovat specifické informace potřebné pro klasifikaci myxosporeí. Některé rysy jsou však obecné, sdílené všemi zástupci (Fiala a Bartošová 2010). Klasifikace na úrovni druhu je tedy založena na detailnějších informacích o struktuře spory, např. počet závitů vláken pólových váček, počet a tvar chlopní spory, vzájemné polohy a velikosti pólových váček aj. (Lom a Artur 1989). Obvykle se každá spora skládá z několika buněk, které obsahují nejčastěji jeden až čtyři pólové váčky a jednu či více sporoplazem (tj. vlastních infekčních améboidních zárodků). Morfologické uspořádání pólových váček je totožné s morfologickým uspořádáním cnidocytů žahavců (Sniddal a kol. 1995). Toto je typické uspořádání spory v tzv. myxosporeové části životního cyklu myxosporeí, ve fázi aktinosporeové má spora nejčastěji formu tzv. triactinomyxonu (tj. triradiálně souměrná spora) a svým tvarem připomíná kotvu. Sporoplazma takovéto spory obsahuje velké množství infekčních buněk (Lom a Dyková 1992).

Molekulární a morfologické analýzy ukázaly, že v rámci třídy Malacosporea můžeme nalézt parazity, kteří v konečném hostiteli – sladkovodní mechovce – vytváří červovité stádium (např. *Buddenbrockia plumatellae*), zatímco jiní zástupci (např. *Tetracapsuloides bryosalmonae*) v nich vytvářejí vakovité stádium či podlouhlé vakovité útvary s laloky (nepopsaný druh) (Canning a Okamura 2004; Bartošová-Sojková a kol. 2014; Hartikainen a kol. 2014). V mezihostiteli jsou pak Malacosporea morfologicky uniformní, jedná se o kulovité stádium se dvěma buňkami obsahujícími pólové váčky.



Obr. 1: (A – O) Morfotypy myxozoi – vybraní zástupci z každé fylogenetické skupiny. (A) *Bipteria*, (B) *Ceratomyxa*, (C) *Ceratonova*, (D) *Kudoa*, (E) *Parvicapsula*, (F) *Enteromyxum*, (G) mořské *Myxidium*, (H) sladkovodní *Myxidium*, (I) sladkovodní *Chloromyxum*, (J) *Myxidium lieberkuehni*, (K) *Chloromyxum careni*, (L) *Hoferellus*, (M) *Myxobolus*, (N) *Sphaerospora*, (O) mořské *Chloromyxum*. (P – Q) Morfotypy malacosporaeí, (P) malakospora *Tetracapsuloides* z rybiho mezihostitele, (Q) malakospora *Tetracapsuloides* ze sladkovodní mechovky. (R – T) Běžné morfotypy aktinospor, (R) aurantiactinomyxon, (S) triactinomyxon, (T) tetractinomyxon. (Zdroj: Kodádková 2014).

2.3 **Fylogenetické postavení myxozoi – historie a současnost**

Myxozoa (respektive jedna ze dvou tříd myxozoi, a to Myxosporea), jež získala status samostatného kmene v roce 1970 (Grassé 1970), byla objevena v první polovině 19. století (Jurine 1825). V roce 1882 byla tato skupina organismů přiřazena do výtrusovců (Sporozoa) (Bütschli 1882). Sporozoa byla skupinou zahrnující jednobuněčné, spory formující parazity zvířat. Myxozoa byla do této skupiny zařazena např. spolu s gregarinami, haemosporidii či kokciemi. V rozporu s tímto faktem byla přítomnost některých znaků, jako např. absence centrioly, tubulární kristy mitochondrií v některých taxonech či specifický typ mitózy charakteristický pro některá Protista. Tato skutečnost naznačovala, že by se mohlo jednat o organizmy ze skupiny Protista.

Domněnka o mnohobuněčném původu spor myxozoi vyslovená v roce 1899 (Štolc 1899) byla v následujících letech několikrát potvrzena (Emery 1909; Ikeda 1912). Navzdory tomuto relativně brzkému objevení mnohobuněčnosti, byla však Myxozoa ještě dlouhou dobu v odborné literatuře řazena ke skupině Protista (např. Hyman 1940; Kudo 1966; Margulis a Schwartz 1998).

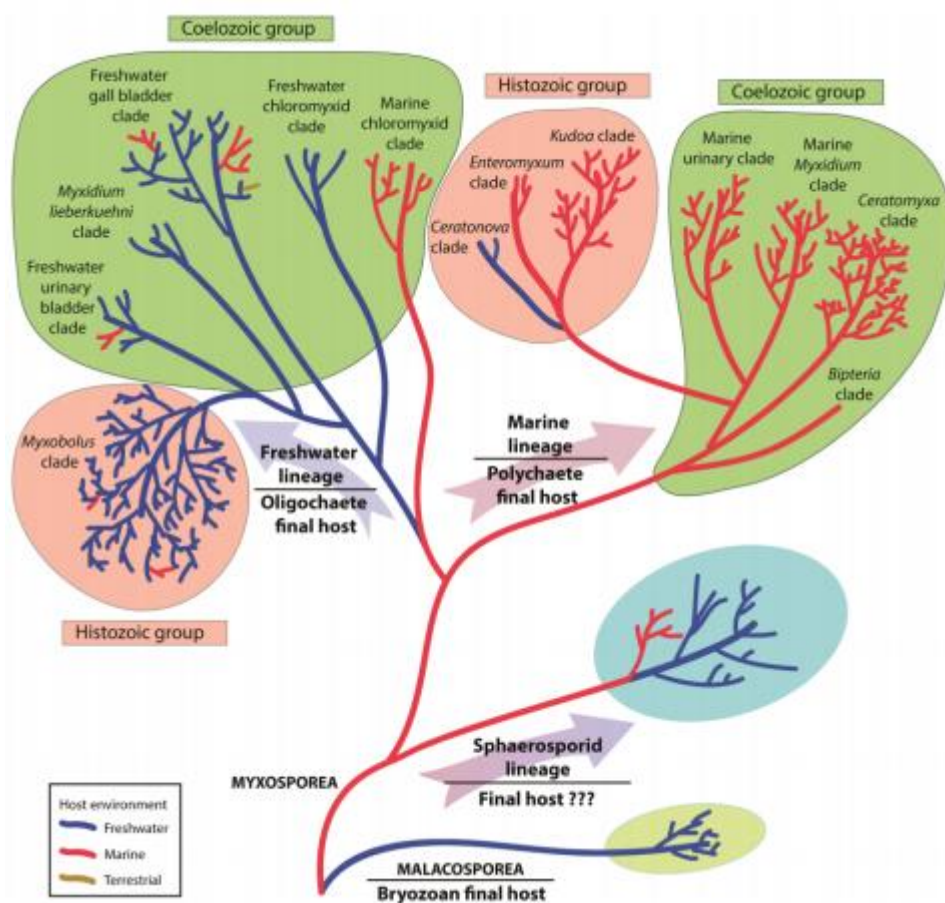
Později začala být zdůrazňována podobnost mezi intracelulárními organelami žahavců, nematocystami, a intracelutárními organelami myxozoi, pólovými váčky (Weill 1938). Mnozí autoři pak o mnoho let později znovu podpořili tuto hypotézu, jež naznačovala, že by Myxozoa mohla být řazena právě mezi žahavce (např. Lom 1990). Definitivní tečku za pochybnostmi o mnohobuněčném původu udělali Smothers a kol. (1994), kteří jako první získali sekvenci SSU rDNA myxozoi a fylogenetickou analýzou prokázali původ myxozoi v rámci mnohobuněčných živočichů. Přítomnost mnohých morfologických znaků u myxozoi, jako např. oddělení somatických a pohlavních buněk, specifické, desmozomu podobné buněčné spoje či strukturní a funkční diference buněk, podporovala tvrzení o umístění v rámci metazoi. Naopak znaky, které dříve naznačovaly příslušnost myxozoi ke skupině Protista, začaly být v pozdějších letech považovány za méně informativní. Např. tubulární kristy mitochondrií byly zjištěny u mnohých skupiny napříč celými eukaryoty včetně volně žijících žahavců (Griparic a van der Blik 2001).

Dlouhou dobu však nebylo zcela jasné přesné umístění myxozoi v rámci metazoi. Různé studie přinášely v závislosti na analyzovaných genech a použitých fylogenetických metodách odlišné výsledky. Myxozoa tak byla na základě výsledků SSU rDNA analýzy přiřazena např. na bázi trojlístých (Bilateria), a to jako sesterská skupina hlístic (Nematoda) (Smothers a kol. 1994; Schegel a kol. 1996). Tvrzení o pozici v rámci trojlístých bylo v dalších letech několikrát podpořeno v různých studiích (Zrzavý a kol. 1998; Siddall a Whiting 1999; Zrzavý a Hypša 2003). Další studie založená na SSU rDNA

analýze v kombinaci s morfologickými daty však došla k závěru, že jsou Myxozoa řazena mezi žahavce (Siddall a kol. 1995).

Definitivní rozklíčování zařazení myxozoí v rámci metazoí přinesly až studie prováděné na zástupci *Buddenbrockia plumatellae*. Ač tento červovitý organizmus připomíná při povrchovém prozkoumání příslušníka trojlístých, studie z roku 2007 prokázala, že se jeho pohybový aparát skládá ze čtyř bloků svaloviny, jež jsou tetraradiálně distribuované, stejně jako je tomu u žahavců (Jiménez-Guri a kol. 2007). Dalším důkazem o příslušnosti myxozoí k žahavcům bylo objevení minikolagenů, specifických proteinů žahavců, které se podílejí na formování nematocysty (Holland a kol. 2010). Další výsledky analýz některých strukturních (protein-kódujících) genů přinesly obdobné výsledky (Jiménez-Guri a kol. 2007; Nesnidal a kol. 2013).

V rámci myxozoí rozlišujeme v současnosti (po odštěpení linie malacosporéí) tři základní linie – sladkovodní linii myxosporeí, mořskou linii myxosporeí a linii zahrnující sférospory *sensu stricto* (viz Obr. 2).



Obr. 2: Schématické znázornění evoluce myxozoí založené na SSU rDNA datech (Zdroj: Fiala a Bartošová-Sojková 2014).

2.4 Onemocnění – přenos, faktory prostředí, průběh a významní zástupci

Mnozí zástupci skupiny Myxozoa mohou způsobovat často i velice významné ekonomické ztráty, a to zejména v chovech ryb, ale také v jejich přirozených populacích. Tento fakt představuje v současné době velikou výzvu pro vědce, kteří se snaží porozumět tomu, jak přesně mohou Myxozoa ovlivňovat populace ryb, jaké konkrétní faktory mají vliv na rozvoj a následné šíření infekcí a konečně, jakým způsobem by tedy bylo možné těmto onemocněním předcházet či zmírnit jejich dopad (Okamura a kol. 2015). V současné době je jedním z problémů v této oblasti nedostatek dat z dlouhodobých výzkumů, která jsou nezbytná pro určení prevalence a závažnosti konkrétního onemocnění, a také odlišná metodologie používaná v různých studiích. Značná část dostupných dat se týká především umělých chovů ryb, přirozené populace jsou v tomto ohledu jen málo prozkoumány. Nekompletní údaje o životních cyklech mořských zástupců myxozoi jsou další překážkou k pochopení např. způsobu přenosu dané infekce (Fontes a kol. 2015).

V současné době jsou již také dostupné studie, které podporují tvrzení, že např. teplota vody, salinita vody, potrava hostitele či proudění vody mohou ovlivnit přenos parazita a následné onemocnění. Zároveň se také očekává, že rozšíření areálu výskytu a obsazování nových prostředí může být v dnešní době významně ovlivněno mezinárodním obchodem, cestovatelskými a rekreačními aktivitami, rychlejším transportem i zvyšováním propojenosti jednotlivých částí světa (Fontes a kol. 2015).

Patogen se nejprve po uvolnění z těla definitivního hostitele zachytí ve formě zralých aktinospor na povrchu těla ryby (vystřelení pólových váčků umožní přichycení ke kožní tkáni). Penetrací kůže či skrze žábry následně proniká do rybího těla améboidní zárodek (sporoplazma). V epitelální tkáni pak dochází k dělení sporoplasmy a postupně dochází k migraci do definitivního místa infekce, proliferaci plasmodií a tvorbě myxospor. Ty mohou z těla mezihostitele odcházet defekací nebo spolu s močí. Z tkání ryby se spory mohou uvolnit pouze po úhynu ryby a rozkladu tkáně (Okamura a kol. 2015). Zdravotní problémy ryb jsou spjaté s nadměrným pomnožením vegetativních stádií (plasmodií) ve tkáních či orgánech ryb. Ne u všech infikovaných ryb (např. u druhu *Myxobolus cerebralis*) se musí nutně rozvinout onemocnění, tj. některé ryby vykazují různou náchylnost k infekci tímto parazitem (Vincent 2002).

Mezi nejvýznamnější zástupce ze skupiny Myxozoa, jež mohou způsobovat výrazné ekonomické ztráty, patří např. *Myxobolus cerebralis*, *Ceratonova shasta*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, *Henneguya ictaluri*, *Enteromyxum leei*, *Kudoa thyrssites* a *Parvicapsula*

pseudobranchicola (Okamura a kol. 2015). Většinou se jedná o napadení lososovitých ryb, ale infikovaní mohou být velice často také např. kapři či sumci (Feist 2008).

Patrně nejvíce patogenním zástupcem ze skupiny Myxosporea je druh *Ceratonova shasta*, který způsobuje u infikovaných lososovitých ryb např. úbytek tělesné hmotnosti, tmavnutí kůže, letargii či puchýřky v ledvinách. Parazituje především v ledvinách, slezině, žlučníku, játrech, pohlavních orgánech a trávicím traktu. Výskyt tohoto onemocnění je zaznamenán na rybách žijících v oblasti Tichého oceánu. Jednotlivé symptomy se liší podle druhu ryby a také podle aktuálního vývojového stádia (Bartholomew a kol. 1989). Dalším významně patogenním zástupcem je *Myxobolus cerebralis*. Tento druh napadá taktéž lososovité ryby, především ty mladé. Infikovaná ryba pak trpí onemocněním, které nazýváme „whirling disease“. Toto onemocnění má u ryb vysokou míru mortality a je obvykle doprovázeno jak morfologickými, tak behaviorálními změnami. Mezi ně patří např. plavání v kruzích, deformace částí těla (nejvýraznější na ocasu) či zkrácení čelistí (Bartholomew a kol. 2002). Dalším druhem je *Kudoa thyrssites* napadající taktéž lososovité ryby. Tento zástupce myxozoí znehodnocuje maso ryb z umělých chovů, neboť způsobuje posmrtnou lyzi svalové tkáně (Kent a Poppe 1988). Významným patogenním účinkem zástupce *Enteromyxum leei* popsáným u ryb z oblasti Středozemního moře je tvorba střevních katarů (Diamant a kol. 1994). *Heneguya ictaluri* je dalším patogenním druhem z třídy Myxosporea. Parazituje na sumcích chovaných ve farmách především v oblasti jihovýchodního pobřeží USA. V roce 2003 bylo potvrzeno, že je tento parazit původcem „proliferative gill disease“. Žábra napadených ryb jsou obvykle křehká, oteklá, lehce krvácí a chrupavka žebních oblouků se může lámat. Napadené ryby se navzdory nízkým hladinám kyslíku pohybují v mělčinách, kde mohou jen obtížně dýchat. Celkově toto onemocnění výrazně zvyšuje mortalitu u napadených ryb (Pote a kol. 2003). *Parvicapsula pseudobranchicola* může u lososovitých ryb zásadně zvýšit mortalitu. Důvodem je nejčastěji napadení pseudobranchií (prvních redukovaných žabních oblouků), jež může zcela zničit v případě, že je ryba výrazně infikovaná. Předpokládá se, že tok krve proudící přes masivně poškozená pseudobranchia je částečně přerušeno, dochází ke krvácení očí, anemii a patrně také slepotě (Karlsbakk a kol. 2010) *Tetracapsuloides bryosalmonae* je důležitým zástupcem třídy Malacosporea. U nakažených jedinců způsobuje tento parazit proliferativní onemocnění ledvin, které se může projevat např. celkovou bledostí či patrným zvětšením ledvin (Sterud a kol. 2007; Wahli a kol. 2007).

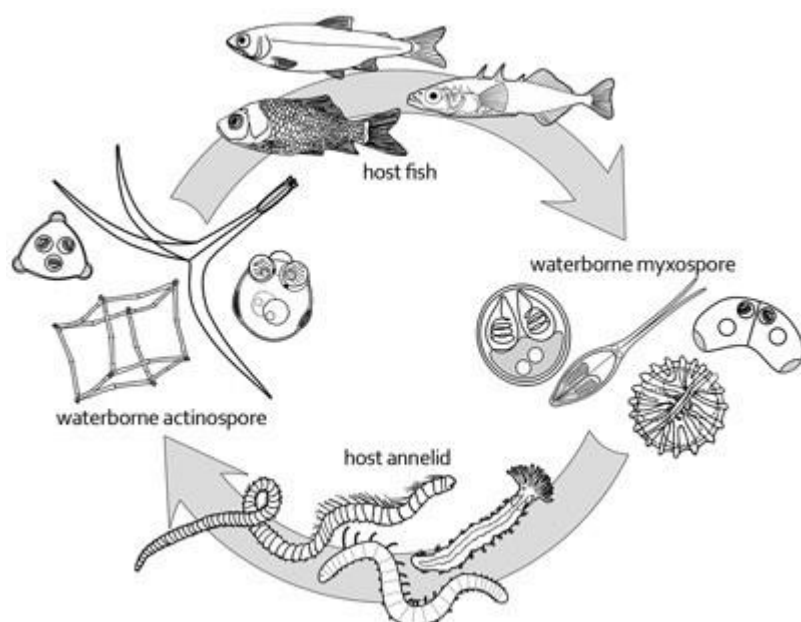
2.5 Charakteristika a životní cyklus třídy Myxosporea

Myxosporea mají komplexní životní cyklus, který zahrnuje bezobratlého i obratlovčího hostitele. Každý z těchto dvou hostitelů produkuje odlišné typy spor (Lom 1996). Až do roku 1984 byla tato skupina považována za monoxenní parazity (Markiw a Wolf 1984). Definitivními hostiteli jsou pro tuto skupinu zástupci kmene kroužkovců. Mezihostitelem bývají nejčastěji ryby, ale infikovaní mohou být taktéž obojživelníci a plazi. Infekce parazity ze skupiny Myxozoa byla však zaznamenána i u savců a ptáků (Théodoridès a kol. 1981; Bartholomew a kol. 2008; Prunescu a kol. 2007).

Vůbec prvním zástupcem této třídy, u něž byl popsán kompletní životní cyklus, je druh *Myxobolus cerebralis* (Markiw a Wolf 1984). Tento druh zůstává dodnes hojně využíván jako modelový organizmus pro demonstraci životního cyklu myxosporeí (viz Obr. 3). Komplexní cyklus můžeme v zásadě rozdělit do dvou samostatných fází. Každá z těchto dvou fází probíhá v odlišném hostiteli a na jejích koncích jsou uvolňované odlišné typy spor. Nazýváme je fáze myxosporeová a fáze aktinosporeová (Lom 1996). První fáze – myxosporeová – je započata kontaktem aktinospory, jež byla uvolněna z těla konečného hostitele, s pokožkou či epiteliální tkání žáber mezihostitele, tedy nejčastěji ryby. Dochází k uvolnění pólových váčků a ukotvení jejich vláken ve tkáni hostitele. Pólový váček se otevírá a uvolňuje se sporoplazma, která vstupuje do kůže. Probíhá tzv. presporogonická etapa, během níž sporoplazma proliferuje a vytváří zcela specifické útvary – tzv. „buňka v buňce“. Tyto struktury charakteristické právě pro skupinu Myxozoa můžeme popsat jako sekundární endogenně vzniklé buňky, které se nacházejí uvnitř buněk primárních. Tato mnohobuněčná stádia migrují intercelulárně do tkání definitivní infekce, kde pokračuje jejich proliferace. Vyvíjí se plazmodium, jež může být podle lokalizace ve tkáni dvojího typu, a to coelozoické (tj. nacházející se v tělních dutinách – převážně v dutinách žlučových cest či vylučovací soustavy) a histozoické (tj. nacházející se ve tkáni např. jater, ledvin, pohlavních žláz či v kůži). Vývoj finálních myxospor probíhá během tzv. sporogonické fáze, při které se výrazně dělí v předešlé (presporogonické) fázi vzniklé primární i sekundární linie buněk (Markiw a Wolf 1984).

Vývoj definitivní aktinospory, která má většinou triradiálně souměrnou strukturu a která je uvolňovaná z těla konečného hostitele – typicky kroužkovce (Annelida), zřídka sumýšovce (Sipunculida), zahrnuje pohlavní rozmnožování (Lom a Dyková 2006). Můžeme jej rozčlenit na tři samostatné fáze – schizogonie, gametogonie a sporogonie. Schizogonie zahrnuje přilnutí spory k epiteliální tkáni hostitele a následné mnohonásobné dělení sporoplasmy, jež vede ke vzniku vícejaderných stádií. Gametogonie zahrnuje vlastní mitotické i meiotické dělení somatických i generativních buněk za vzniku

zygot obalených somatickými buňkami. Třetí fáze – sporogonie – je tvorba samotné spory doprovázená mitotickým dělením a diferenciací buněk v periferní oblasti. Tímto způsobem vzniká aktinospora, která může napadnout opět mezihostitele a celý životní cyklus se tak uzavírá (Markiw a Wolf 1984). Většina zástupců myxosporeí s popsaným životním cyklem se vyskytuje ve sladkovodním prostředí (Fiala a kol. 2015). Vývojové cykly mořských zástupců jsou jen velmi málo probádané a pouze u několika druhů byly kompletně zmapované, a to konkrétně u druhů *Ceratomyxa auerbachii*, *Gadimyxa atlantica*, *Sigmomyxa sphaerica*, dvou druhů z rodu *Parvicapsula* a dvou druhů z rodu *Ellipsomyxa*. Všichni mají definitivního hostitele třídy mnohoštětinatců (Polychaeta) (Køie a kol. 2004; Køie a kol. 2007; Køie a kol. 2008).

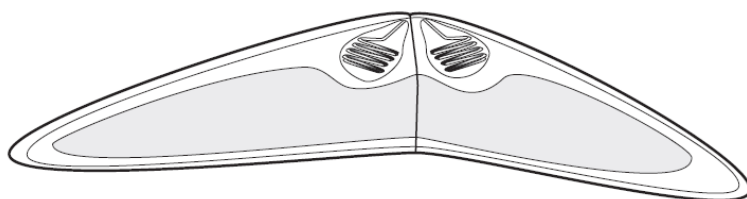


Obr. 3: Životní cyklus myxosporeí (Zdroj: © S. Atkinson).

2.6 Rod *Ceratomyxa*

Rod *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 je druhý největší rod myxosporeí, který zahrnuje v současnosti 243 druhů, z nichž většina jsou parazité mořských ryb (Lom a Dyková 2006; Gunter, Burger a Adlard 2010; Fiala a kol. 2015). Převážná část z nich je coelozoických, vzácně histozoických, a u ryb napadají především žlučníky. Jsou prakticky celosvětově rozšířené a někteří zástupci mohou způsobovat závažná onemocnění ryb – zejména trávicího traktu (Lom a Dyková 1992; Eiras 2006; Fiala a kol. 2015). Pouze několik málo druhů bylo zkoumáno z hlediska jejich ultrastruktury, např. *Ceratomyxa globulifera* (Desportes a Théodoridès 1982), *Ceratomyxa labracis* a *Ceratomyxa diplodae* (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla 1993) a další.

Zástupci rodu *Ceratomyxa* vytváří protáhlé spory, jež mají obvykle poloměsíčitý, vejčitý, okrouhlý či kulovitý tvar. Chlopně mají tvar kónický a v délce přesahují axiální průměr spor. Sporoplazma, která má dvě jádra, nevyplňuje celou dutinu spory. Trofozoiti zástupců rodu *Ceratomyxa* bývají nejčastěji disporičtí, někdy ale mohou být monosporičtí až polysporičtí (Lom a Dyková 1992) (viz Obr. 4).



Obr. 4: Schématická kresba spory zástupce rodu *Ceratomyxa*. (Zdroj: Lom a Dyková 2006).

Všechny druhy rodu *Ceratomyxa* se známou sekvencí SSU rDNA klastrují v jedné skupině v rámci mořské linie myxosporeí (viz Obr. 5) (Gunter a kol. 2009, Fiala a kol. 2015).

Kmen Cnidaria

Nezařazený podkmen Myxozoa

Třída Myxosporea

Řád Bivalvulida

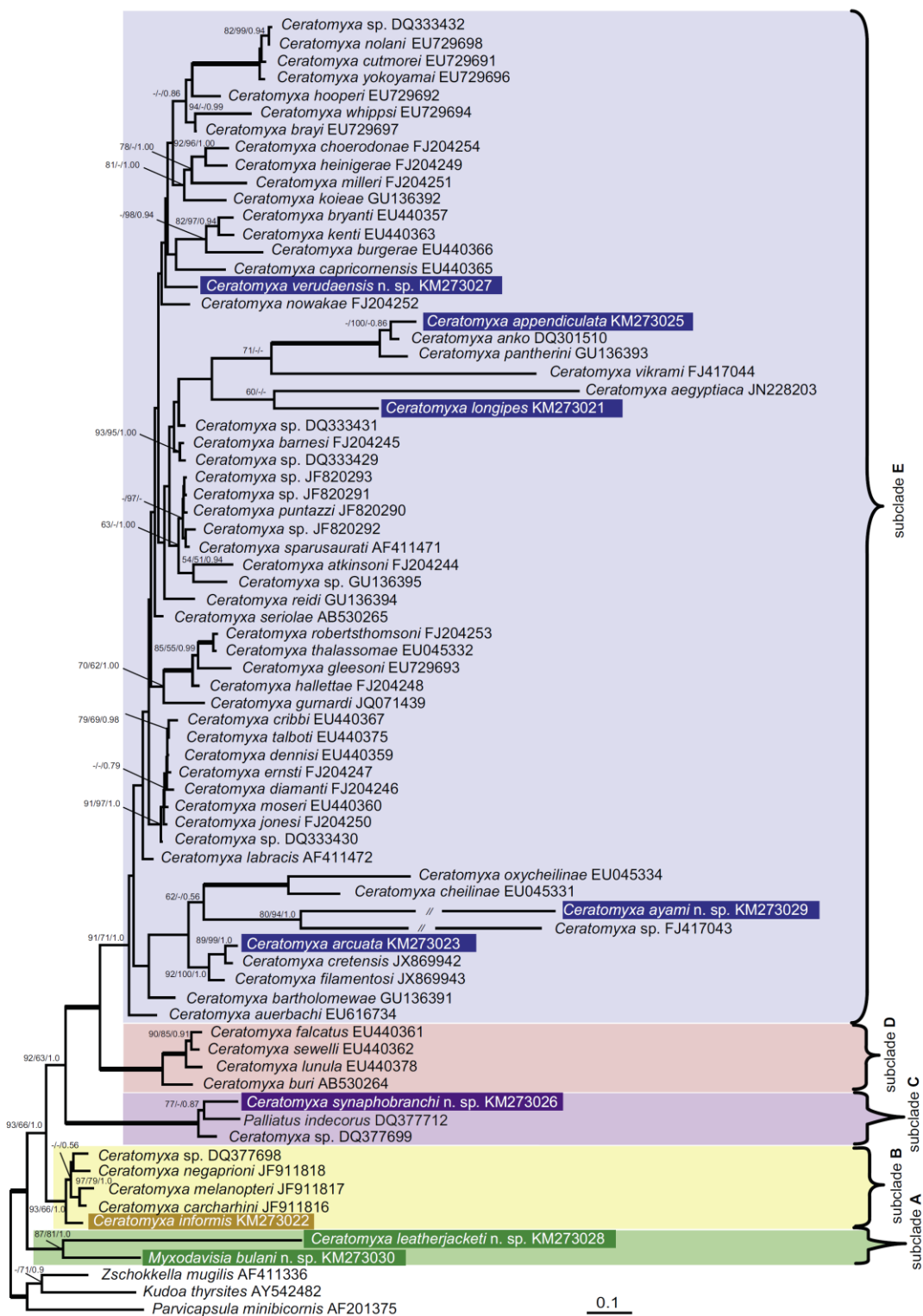
Podřád Variisporina

Rodina Ceratomyxidae: Rod *Ceratomyxa*

Obr. 5: Taxonomické zařazení rodu *Ceratomyxa* v rámci skupiny Myxozoa (Zdroj: Fiala a kol. 2015).

Výjimkou byl až donedávna druh *Ceratonova shasta*, jež byl původně (pod starším názvem *Ceratomyxa shasta*) klasifikován jako příslušník rodu *Ceratomyxa*. Jeho zcela unikátní biologické znaky a nejasná fylogenetická pozice však vedli v závěru k přesunutí tohoto druhu do nově vzniklého rodu *Ceratonova* Atkinson, Foott, Bartholomew, 2014. Zástupci rodů *Ceratomyxa* a *Ceratonova* jsou morfologicky stejní, ale liší se jednak místem, ve kterém probíhá sporulace – žlučník u rodu *Ceratomyxa* a střeva u rodu *Ceratonova* a dále také místem, kde probíhá životní cyklus – mořské prostředí u rodu *Ceratomyxa* a sladká voda u rodu *Ceratonova*. Samozřejmě je zde také odlišnost v SSU rDNA sekvencích.

Recentní studie ukazují, že rod *Ceratomyxa* byl první větvící se skupinou v rámci mořské linie třídy Myxosporea. K těmto výsledkům došly různé studie, a to nehledě na použitou fylogenetickou metodu či zvolený marker (Fiala a kol. 2015, Fiala a Bartošová 2010). Toto zjištění koresponduje s předchozími analýzami a naznačuje, že spory podobné myxosporám rodu *Ceratomyxa* byly ancestrálním morfotypem mořských myxosporeí. Ke „znovuobjevení“ tohoto morfotypu došlo u zástupců rodu *Ceratonova* mnohem později v evoluci mořské větve myxosporeí. Z výsledků nedávné rozsáhlé analýzy bylo zjištěno, že rod *Ceratomyxa* klastruje celkem do 5 podskupin. Evolučně nejmladší podskupina je zároveň také podskupinou druhově nejbohatší. V provedené analýze byly zahrnuty druhy pocházející z různých geografických oblastí Atlantického, Tichého i Indického oceánu a bylo zjištěno, že zástupci z různých lokalit klastrují spolu v rámci stejných podskupin a není tu zřejmý fylogeografický patern.



Obr. 6: SSU rDNA fylogenetický strom rodu *Ceratomyxa* vytvořený metodou maximum likelihood. Čísla nodů udávají maximum likelihood/ maximum parsimony podporu uzlů a Bayesian „posterior probabilities“ vyšší než 50 %, respektive 0,5 pro Bayesovskou analýzu. Zvýrazněné větve značí nody s nejvyšší podporou uzlů.

2.7 Hostitelský druh – *Clinus cottoides*

Hostitelský druh *Clinus cottoides* („Bluntnose klipfish“) patří do třídy paprskoploutvých ryb (Actinopterygii), jež je sesterským taxonem třídy nozdratých (Sarcopterygii). Tato velice rozmanitá a evolučně úspěšná třída je jednou z nejvýznamnějších součástí skupiny obratlovců. Přestože celá třída není charakterizovaná silnými a odvozenými znaky, je považována za monofyletickou (Nelson 2006). Předpokládá se, že tyto dvě třídy mají společného předka, některé fosilní nálezy totiž vykazují kombinace znaků obou tříd (Cloutier a Arraia 2004; Zhu a Yu 2004). V rámci třídy paprskoploutvých pak patří *Clinus cottoides* do řádu ostnoploutví (Perciformes) a čeledi paslizonovitě (Clinidae). Řád ostnoploutví je nejdiverzifikovanějším řádem ze všech řádů ryb a je také největším řádem skupiny obratlovců. Zahrnuje 20 podřádů, 160 čeledí, přes 1 500 rodů a více než 10 000 druhů. Obecně jsou ostnoploutví dominantní skupinou ryb ve všech světových oceánech a obývají zejména tropické a subtropické oblasti. Zástupci čeledi paslizonovití obývají mořské prostředí Atlantického, Indického i Tichého oceánu, a to primárně v mírném pásu severní i jižní polokoule. Jedná se většinou o malé zástupce s maximální délkou těla dospělého do 60 cm. Rod *Clinus* patří do skupiny Clinini (celkem 11 rodů a 53 druhů). Jedná se o ovoviviparní jedince zpravidla žijící u dna. Samci těchto druhů ryb mají gonopodium (Nelson 2006; <http://www.iucnredlist.org/details/178997/0>). *Clinus cottoides* je velice běžný endemický druh jižní Afriky. Obývá nejčastěji přílivové mělčiny, brakické vody a místa s výskytem makroskopických řas. Živí se malými korýši (Wilson 2009).

Studie z roku 2008 (Von der Heyden) ukázala, že v oblasti pobřeží Jihoafrické republiky existuje vlivem silné přírodní bariéry mezi Atlantickým a Indickým oceánem prokazatelná diference dvou populací rodu *Clinus cottoides*. Analýzy mitochondriálních i ribosomálních dat jedinců pocházejících ze 14 různých lokalit na západním, jižním a východním pobřežím Jihoafrické republiky prokázaly, že jedinci vyskytující se v lokalitách východní části pobřeží vytváří samostatnou populaci, geneticky odlišnou od jedinců vyskytujících se v lokalitách jižní a západní části pobřeží. Bylo zjištěno, že mezi těmito dvěma geografickými oblastmi nedochází u ryb druhu *Clinus cottoides* k žádnému toku genů a že je tedy populace efektivně izolována. Ve zbylých oblastech byl prokázán pozoruhodně symetrický tok genů. Odhadovaná doba divergence těchto dvou populací činí nejméně 68 000 let (Von der Heyden a kol. 2008).

2.8 Druhy rodu *Ceratomyxa* u paslizounovitých ryb

U paslizounovitých ryb pocházejících z oblasti jižní Afriky bylo doposud popsáno pět druhů myxosporeí (Ali 2000, Reed a kol. 2007, Bartošová-Sojková a kol. 2015), z toho dva jsou zástupci rodu *Ceratomyxa*. Ve žlučníku paslizounovitých ryb druhu *Clinus cottoides* z pobřežních oblastí jižní Afriky byl popsán druh *Ceratomyxa cottoidii* Reed, Basson, Van As a Dyková, 2007. Tento druh je charakterizován široce oválnou až srpkovitou sporou o rozměrech 6.5 – 8.0 (7.0 ± 0.6) μm délky \times 17.0 – 22.0 (18.2 ± 1.7) μm šířky. Vegetativní stádia jsou disporická a volně se pohybují ve žlučovém měchýři. Jsou většinou kulovitá, případně protáhlá s četnými granuly. Typovým hostitelem je *Clinus cottoides Valenciennes*, 1836; jako typová lokalita byla stanovena oblast De Hoop v jižní Africe (Reed a kol. 2007).

Druhým zástupcem je druh *Ceratomyxa dehoopi* Reed, Basson, Van As a Dyková, 2007. *Ceratomyxa dehoopi* má sporu ve tvaru půlměsíce s mírně konvexní přední a konkávní zadní částí spory o rozměrech 4.0 – 5.5 (4.5 ± 0.5) μm délky \times 12.0 – 17.5 (15.4 ± 1.4) μm šířky. Plasmodia jsou téměř kulovitá s četnými granuly a dlouhými výběžky. Typovým hostitelem je *Clinus superciliosus* Linnaeus, 1758; jako typová lokalita byla stanovena oblast De Hoop v jižní Africe. Druh popsán také na lokalitě Jeffreys Bay (Reed a kol. 2007).

7. Cíle práce

Cílem práce bylo:

- Molekulárně-taxonomicky charakterizovat druhy rodu *Ceratomyxa* nalezené u hostitelů pocházejících z čeledi Clinidae, a to na základě SSU rRNA genu.
- Parazity morfologicky charakterizovat a určit, zda některé morfologicky identické druhy reprezentují ve skutečnosti komplex více druhů.
- Zjistit příbuzenské vztahy mezi jednotlivými vyšetřovanými druhy rodu *Ceratomyxa* a posoudit jejich příbuzenské vztahy, a to v souvislosti s jejich místem výskytu a konkrétním druhem hostitele.

4. Metodika práce

4.1 Materiál

Pro část experimentu věnující se morfologické charakterizaci myxosporeí byly použity vzorky žlučníků a jater konkrétních paslizounovitých ryb pocházejících z Jižní Afriky (viz Tab. 1).

Pro molekulární charakterizaci myxosporeí byly použity vzorky DNA izolované z jater a žlučníků konkrétních paslizounovitých ryb pocházejících z jižní Afriky (viz Tab. 1).

Tab. 1: Vzorky DNA izolované z různých orgánů paslizounovitých ryb pocházejících z lokalit v jižní Africe.

DNA	Hostitelský druh	Lokalita sběru (viz Obr. 17)	Orgán
1464	<i>Clinus acuminatus</i>	Mouille point	žlučník
1532	<i>Clinus acuminatus</i>	Mouille point	žlučník
1533	<i>Clinus acuminatus</i>	Mouille point	játra
1534	<i>Clinus acuminatus</i>	Mouille point	játra
1535	<i>Clinus acuminatus</i>	Mouille point	žlučník
1517	<i>Clinus brevicristatus</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1518	<i>Clinus brevicristatus</i>	False Bay	žlučník
1470	<i>Clinus cottoides</i>	Jeffreys Bay	žlučník
1474	<i>Clinus cottoides</i>	Jeffreys Bay	žlučník
1475	<i>Clinus cottoides</i>	Jeffreys Bay	žlučník
1476	<i>Clinus cottoides</i>	Jeffreys Bay	žlučník
1498	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1499	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1500	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1501	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1502	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1503	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1504	<i>Clinus cottoides</i>	Jongensfontain (Still Bay)	žlučník
1459	<i>Clinus superciliosus</i>	Cape Columbine	žlučník
1461	<i>Clinus superciliosus</i>	Cape Columbine	žlučník
1460	<i>Clinus superciliosus</i>	Cape Columbine	žlučník
1463	<i>Clinus superciliosus</i>	Cape Columbine	žlučník
1462	<i>Clinus superciliosus</i>	Cape Columbine	žlučník
1519	<i>Clinus superciliosus</i>	Kommetje	žlučník
1520	<i>Clinus superciliosus</i>	Kommetje	žlučník
1523	<i>Clinus superciliosus</i>	Kalk bay	žlučník
1529	<i>Clinus superciliosus</i>	Mouille point	žlučník
1531	<i>Clinus superciliosus</i>	Mouille point	žlučník

Tab. 1 – pokračování: Vzorky DNA izolované z různých orgánů paslízounovitých ryb pocházejících z lokalit v jižní Africe.

DNA	Hostitelský druh	Lokalita sběru (viz Obr. 17)	Orgán
1530	<i>Clinus superciliosus</i>	Mouille point	játra
1540	<i>Clinus superciliosus</i>	Jacobs Bay	žlučník
1541	<i>Clinus superciliosus</i>	Jacobs Bay	žlučník
1449	<i>Muraenoclinus dorsalis</i>	Mouille point	žlučník
1456	<i>Muraenoclinus dorsalis</i>	Mouille point	žlučník
1457	<i>Muraenoclinus dorsalis</i>	Mouille point	žlučník
1477	<i>Clinus cottoides</i>	Sea View (Camp Beach View)	žlučník
1478	<i>Clinus cottoides</i>	Sea View (Camp Beach View)	žlučník
1479	<i>Clinus cottoides</i>	Sea View (Camp Beach View)	žlučník
1480	<i>Clinus cottoides</i>	Sea View (Camp Beach View)	žlučník
1481	<i>Clinus cottoides</i>	Sea View (Camp Beach View)	žlučník

4.2 Metody

4.2.1 Metody studia morfologie

4.2.1.1 Světelná mikroskopie

Prohlížení vzorků bylo prováděno optickým mikroskopem značky Olympus BX51. Případné pořízení fotografií umožnil digitální fotoaparát značky Olympus DP70.

4.2.2 Molekulární metody

4.2.2.1 Izolace DNA

DNA byla izolována z jater a žlučníků jednotlivých vyšetřovaných ryb (viz Tab. 1), a to fenol-chloroformovou směsí. Fenol a chloroform jsou organické látky nemísitelné s vodou, což způsobuje, že po přidání do buněčného lyzátu vytváří dvě fáze (vrstvy). Po důkladném promíchání dochází k denaturaci a následnému vysrážení bílkovin, jež můžeme centrifugací koncentrovat v tzv. fázovém rozhraní a poté je snadno odstranit. Jestliže se při extrakci využívá fenol ekvilibrovaný neutrálním či alkalickým puftrem, zůstávají nukleové kyseliny (DNA i RNA) koncentrované ve vodné fázi. Následně bývají nukleové kyseliny koncentrovány a přečištěny precipitací alkoholem (Šmarda a kol. 2005). V našem případě byla použita sada pro izolaci DNA od firmy Roche s.r.o. – Diagnostic Division (Praha, ČR).

4.2.2.2 Nested PCR

Nested PCR (tzv. odstupňovaná PCR/ PCR využívající vnější a vnitřní primery) je vysoce citlivou modifikací standardní PCR metody. Nested PCR zamezuje amplifikaci nechtěných úseků DNA, a to díky použití dvou různých typů primerů (tzv. vnější a vnitřní primery). Probíhá ve dvou krocích – v prvním kroku vzniká za použití vnějších primerů produkt, který je využit v následném amplifikačním kroku za použití vnitřních primerů, které jsou specifické pro vnitřní část sekvence amplifikované vnějšími primery (Šmarda a kol. 2005). V našem případě byla použita Taq-Purple polymeráza (Top-Bio, Česká republika), vnější primery ERIB 1 a ERIB 10 (Barta a kol. 1997) a vnitřní primery 18S-cerR a 18S-cerF (Fiala a kol. 2015) – oba typy primerů byly syntetizované společností Generi-Biotech s.r.o. (Hradec Králové, ČR).

Tab. 2: Množství jednotlivých komponent použitých pro Nested PCR.

Komponenta	Objem [μ l]
voda	16,5
Taq-Purple polymeráza (1U/ μ l)	1
reverse primer (20 μ M)	1
forward primer (20 μ M)	1
10x Taq-Purple pufr	2,5
dNTPs (250 μ mol)	2
DNA	1
celkový objem reakce	25

Tab. 3: Primery a jejich odpovídající sekvence použité pro Nested PCR.

Primer	Sekvence (5' – > 3')
Erib 1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG
Erib 10	CTCCGCAGGTTACCTACGG
18S-cerR	GTACAAGAGGCAGAGACGTAT
18S-cerF	CTWGTTGGTADGGTAGTG

Tab. 4: Cyklus Nested PCR.

Kroky PCR	Primární PCR	Sekundární PCR
Počáteční denaturace	95°/ 3 min	95°/ 3 min
Denaturace	94°/ 1 min	94°/ 1 min
Nasedání primerů	52°/ 1 min	55°/ 1 min
Extenze/ Elongace	72°/ 1 min 40 s	72°/ 1 min 15 s
Finální elongace	72°/ 10 min	72°/ 10 min
Chlazení	10°/ ∞	10°/ ∞

Poznámka: V primární i sekundární PCR proběhlo vždy celkem 30 cyklů.

4.2.2.3 Gelová elektroforéza a extrakce PCR produktů

Gelová elektroforéza je jednou z nejpoužívanějších separačních metod molekulární biologie vůbec. Pracuje se schopností pohybu nabitých molekul v elektrickém poli, čímž je umožněna specifická separace fragmentů nukleových kyselin podle jejich velikosti. Záporně nabitě fragmenty DNA získávají svůj náboj především díky přítomnosti fosfátových skupin. Nukleové kyseliny se tedy v elektrickém poli pohybují vždy směrem k anodě. K separaci se využívá nejčastěji agarózový gel (Šmarda a kol. 2005). V našem případě byl použit 1% agarózový gel. Extrakce PCR produktů byla provedena pomocí Gel/ PCR Fragments Extraction Kit dle předepsaného protokolu dodavatele Geneaid Biotech Ltd.

4.2.2.4 DNA klonování za pomoci vektoru

Tvorba DNA klonů (DNA klonování, klonování genů či molekulární klonování) pomocí vektoru, tj. tvorba identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA pomocí vektoru se provádí množением rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*). Tato metoda zahrnuje dva typy DNA molekul – DNA organismu, která má být primárně namnožena a DNA živého hostitele. Do genomu hostitele se vnese tzv. insert (fragment DNA, který je určen k namnožení) a následně se využívá přirozené schopnosti hostitele replikovat vlastní genom včetně vloženého insertu. Na místě insertu se v původním genomu nacházel některý z tzv. reporterových genů, což umožňuje pozdější selekci klonů obsahujících rekombinantní DNA (Šmarda a kol. 2005). V našem případě byl jako vektor použit plazmid – pDrive Cloning Vector (Qiagen). Ligace byla provedena pomocí Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen) podle příloženého manuálu, a to při 14 °C po dobu 2 hodin. Vektor byl pomnožen v kompetentních buňkách DH5 α . Extrakce plazmidových vektorů byla provedena pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit dle instrukcí výrobce (Roche s.r.o).

4.2.2.5 Sekvence

Sangerova metoda (enzymová metoda) sekvenování využívá DNA, jejíž sekvence má být stanovena, jako maticí pro syntézu komplementárních řetězců DNA různé délky. Tvorba řetězce na maticové DNA je započata od místa, na něž je připojen sekvenčně specifický primer, a ukončena v místě, kde je do rostoucího řetězce namísto standardního dNTP inkorporován jeho analog 2',3'-ddNTP, který díky chybějící 3'-OH skupině znemožní DNA-polymeráze pokračovat v připojování nukleotidů. Důležitý je fakt, že

ddNTPs jsou do rostoucího řetězce DNA inkorporovány DNA-polymerázou podle pravidel o párování bazí (Šmarda a kol. 2005). V našem případě byly jednotlivé fragmenty DNA sekvenovány za použití Sangerovy metody u společnosti SeqMe s.r.o. (Dobříš, ČR). Sekvenační reakce obsahovaly 1 µl příslušného primeru (10 µM) a 9 µl izolovaného produktu PCR. Tento režim byl použit, pokud byl získán PCR produkt dobré kvality (koncentrace DNA min. 100 ng), který byl přímo izolován z agarózového gelu. Pokud se jednalo o plazmidovou rekombinantní DNA získanou DNA klonováním, množství daného plasmidu bylo v reakční směsi upraveno na 500 ng. Sekvenování nukleotidového pořadí produktů bylo vždy prováděno obousměrně.

4.2.2.6 Fylogenetické analýzy

Všechny kroky fylogenetické analýzy byly provedeny v programu Geneious (v 8.0.1). Pro konstrukci fylogenetických stromů byly sestaveny kompletní „datasety“ skládající se jednak ze získaných sekvencí SSU rDNA zmiňovaných druhů rodu *Ceratomyxa* a jednak z SSU rDNA sekvencí dalších druhů rodu *Ceratomyxa* vyhledaných v genové bance. Alignmenty byly vytvořeny v programu MAFFT v7.017 (Katoh a kol. 2002) pomocí E-INS-i metody. Pro prohlížení a upravování alignmentů byl použit program SEAVIEW 3.2 (Galtier a kol. 1996). Tyto úpravy se týkaly zejména odstranění evidentně nehomologických úseků vyskytujících se v hypervariabilních úsecích genu.

Konstrukce fylogenetických stromů byla provedena třemi metodami – maximum likelihood (ML – maximální pravděpodobnost), maximum parsimony (MP – maximální úspornost) a Bayesovskou metodou (BI). Maximum likelihood stromy byly vytvořeny v programu RaxML (Stamatakis 2006) s GTRGAMMA modelem. Analýza metodou maximum parsimony byla provedena v programu PAUP* (Swofford 2002) s heuristickým způsobem vyhledávání, náhodným přiřkládáním taxonů a poměrem Ts: Tv = 1: 2. Bootstrapová metoda byla založena na analýze 500 generovaných datasetů. Bayesovská metoda byla realizována v programu MrBayes v3.0 (Ronquist a Huelsenbeck 2003), a to ve dvou paralelních řetězcích s 1 000 000 generací. „Burn-in“ byl nastaven na hodnotu jedné pětiny z celkového počtu generací. Pro kontrolu správnosti nastavení hodnoty „burn-in“ byl použit program Tracer v1.4.1 (Rambaut a Drummond 2007).

Vizualizace všech získaných fylogenetických stromů byla umožněna programem FigTree (Rambaut 2009) a grafická uprava byla provedena v programu Illustrator CS6.

5. Výsledky

5.1 Charakterizace nalezených druhů rodu *Ceratomyxa*

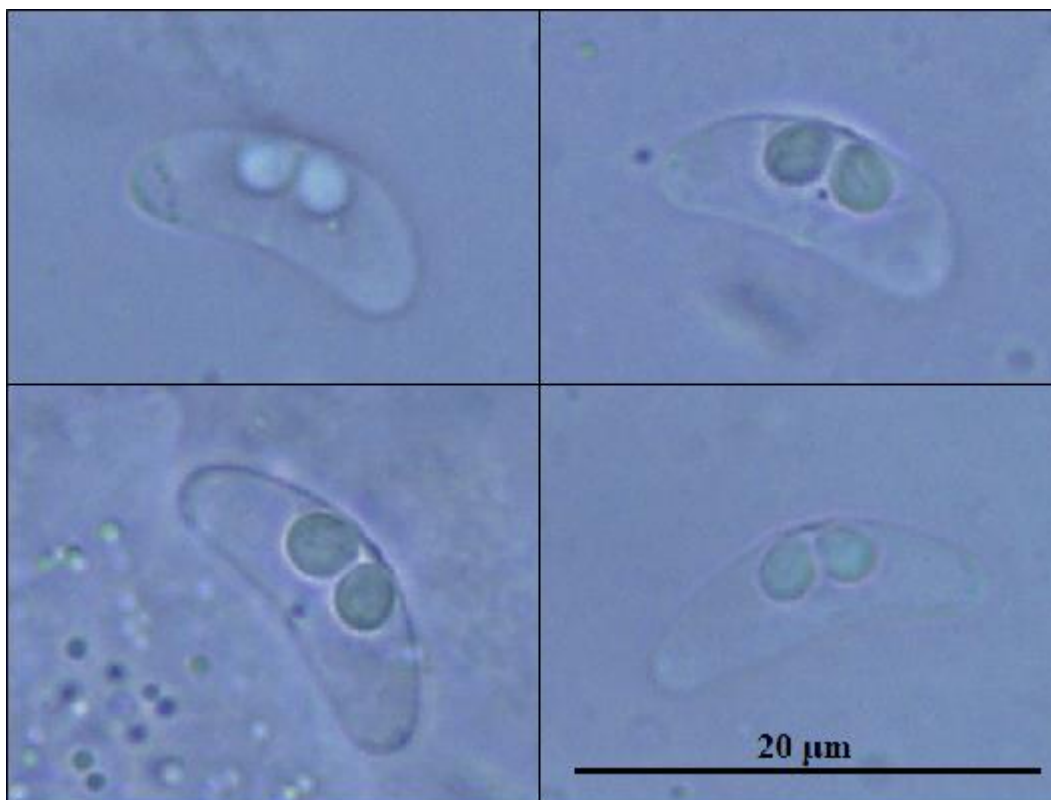
Ceratomyxa sp. 1

Hostitel: *Clinus superciliosus*

Orgán: žlučník

Lokalita: Kommetje; Jihoafrická republika; pobřeží Atlantického oceánu

Morfologický popis (viz Obr. 7): spory rohlíkovitého tvaru; konce spory zaoblené; pólové váčky kulovité dosahující cca do poloviny spory; délka spory 4,29 – 5,20 ($4,77 \pm 0,40$) μm , šířka spory 13,14 – 14,68 ($13,75 \pm 0,73$) μm , $n=5$; rozměry pólových váčků 2,8 x 2,2 μm ; plasmodia nebyla pozorována.



Obr. 7: Spory *Ceratomyxa* sp. 1.

***Ceratomyxa* sp. 2**

Hostitel: *Clinus superciliosus*

Orgán: žlučník

Lokalita: Kommetje; Jihoafrická republika; pobřeží Atlantického oceánu

Morfologický popis (viz Obr. 8): spory srpkovitého tvaru; konce spory zaoblené; pólové váčky kulovité dosahující cca do poloviny spory; délka spory 6,2 – 6,3 μm ; šířka spory 18,2 – 18,5 μm ; $n=2$, rozměry pólových váček 2,5 x 2,7 μm ; plasmodia kulovitá až oválná s dlouhými tenkými výběžky; obsahovala dvě nezralé spory; rozměry plasmodií 22,5 x 14,2 μm .



Obr. 8: Spory *Ceratomyxa* sp. 2.

***Ceratomyxa* sp. 3**

Hostitel: *Clinus superciliosus*, *Clinus brevicristatus*

Orgán: žlučník

Lokalita: Cape Columbie, False Bay; Jihoafrická republika; pobřeží Atlantického oceánu

Morfologická data tohoto druhu nejsou k dispozici, druh byl zjištěn na základě molekulárně-fylogenetické analýzy.

***Ceratomyxa* sp. 4**

Hostitel: *Clinus superciliosus*

Orgán: žlučník

Lokalita: Cape Columbie; Jihoafrická republika; pobřeží Atlantického oceánu

Morfologická data tohoto druhu nejsou k dispozici, druh byl zjištěn na základě molekulárně-fylogenetické analýzy.

***Ceratomyxa* sp. 5**

Hostitel: *Clinus cottoides*

Orgán: žlučník

Lokalita: Jogensfontain (Still Bay); Jihoafrická republika; pobřeží Indického oceánu

Morfologická data tohoto druhu nejsou k dispozici, druh byl zjištěn na základě molekulárně-fylogenetické analýzy.

***Ceratomyxa* sp. 6**

Hostitel: *Clinus superciliosus*, *Clinus cottoides*

Orgán: žlučník

Lokalita: Jogensfontain (Still Bay), Cape Columbie, Mouille point; Jihoafrická republika; pobřeží Atlantického a Indického oceánu

Morfologický popis (viz Obr. 9; Obr. 10): spory oválného až rohlíkovitého tvaru; konce spory zaoblené; pólové váčky kulovité až kapkovité dosahující cca do třetiny spory; délka spory 5,97 – 9,26 ($7,46 \pm 1,24$) μm ; šířka spory 13,68 – 20,99 ($15,96 \pm 2,67$) μm , n= 10; rozměry pólových váček 2,4 x 2,0 μm ; plasmodia protáhlá (kapkovitá) s dlouhými tenkými výběžky; obsahovala dvě nezralé spory; rozměry plasmodií 19 x 20,2 μm ; pozorována aberantní spora.



Obr. 9: Spory *Ceratomyxa* sp. 6 (vzorek číslo 1501).



Obr. 10: Spory *Ceratomyxa* sp. 6 (vzorek číslo 1503).

***Ceratomyxa* sp. 7**

Hostitel: *Clinus superciliosus*, *Clinus cottoides*, *Clinus acuminatus*, *Muraenoclinus dorsalis*

Orgán: žlučník, játra

Lokalita: Mouille point, Jeffreys Bay, Jongensfontain (Still Bay), Sea View (Camp Beach View); Jihoafrická republika; pobřeží Atlantického a Indického oceánu

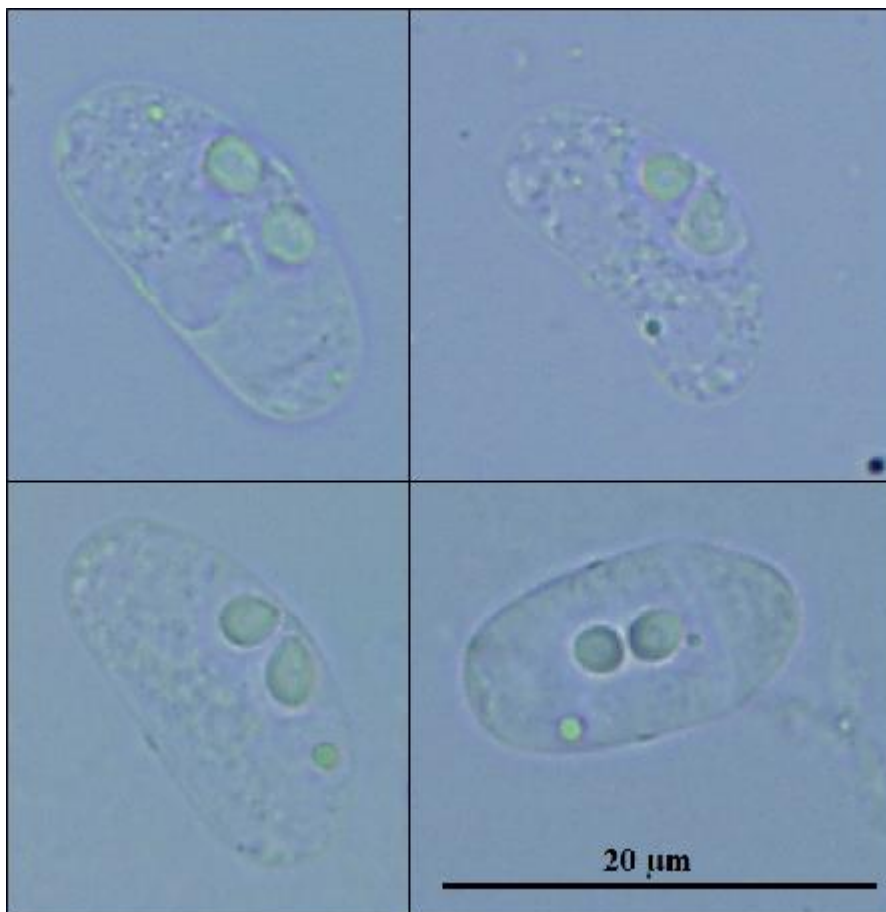
Morfologický popis (viz Obr. 11; Obr. 12; Obr. 13): spory oválného až srpkovitého tvaru; konce spory zaoblené; pólové váčky kulovité dosahující cca do poloviny spory; délka spory 5,24 – 8,42 ($6,35 \pm 0,95$) μm ; šířka spory 11,69 – 17,70 ($14,34 \pm 1,64$) μm ; n= 13; rozměry pólových váček 3,3 x 2,6 μm ; plasmodia kulovitá; obsahovala dvě nezralé spory; rozměry plasmodií 13,9 x 13,2 μm .



Obr. 11: Spory *Ceratomyxa* sp. 7 (vzorek číslo 1456).



Obr. 12: Spory *Ceratomyxa* sp. 7 (vzorek číslo 1464).



Obr. 13: Spory *Ceratomyxa* sp. 7 (vzorek číslo 1470).

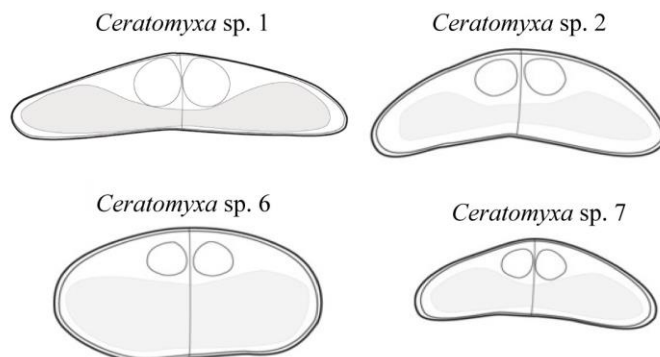
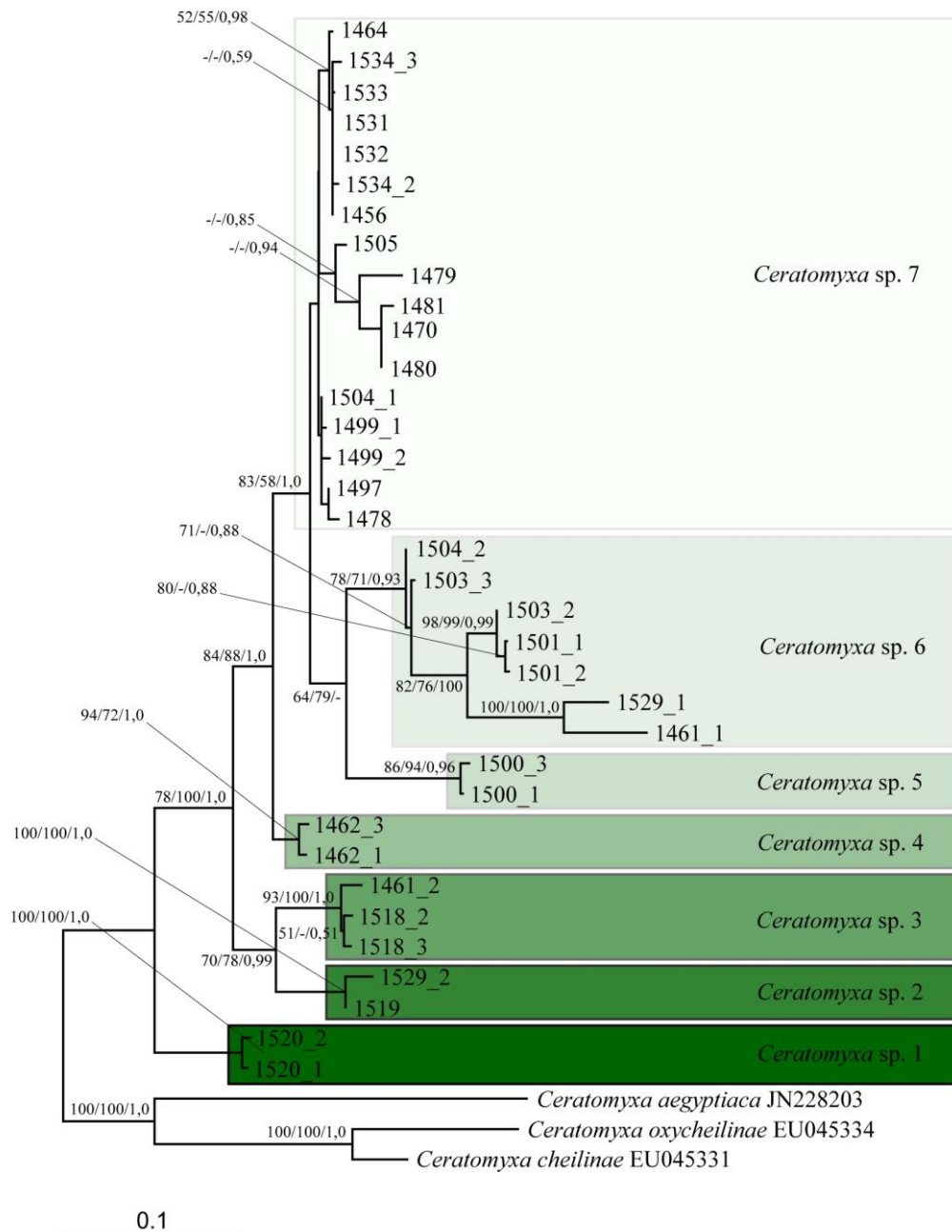
5.2 Fylogenetické vztahy

V rámci této diplomové práce bylo získáno celkem 35 částečných SSU rDNA sekvencí myxosporeí. Všechny sekvence vykazovaly kontrolním „blastováním“ největší homologii se zástupci rodu *Ceratomyxa*. Toto zjištění korelovalo s mikroskopickým vyšetřením vzorků, ve kterých se vyskytovaly spory morfologicky odpovídající zástupcům rodu *Ceratomyxa*.

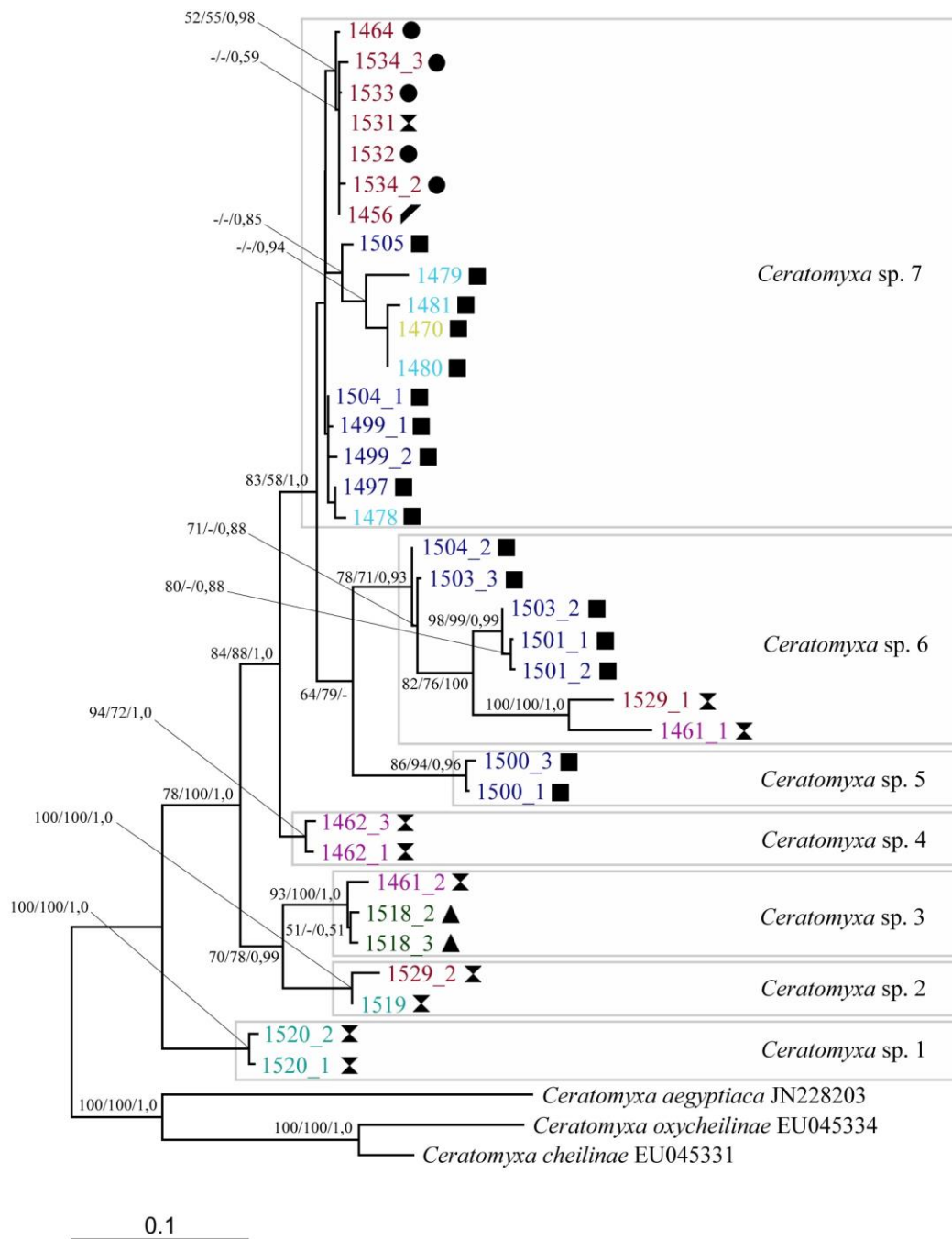
Fylogenetická analýza odhalila několik samostatných skupin sekvencí a jejich vzájemné příbuzenské vztahy. Výsledný fylogenetický strom je znázorněn na Obr. 14. Topologie SSU rDNA stromu umožnila definovat celkem sedm pravděpodobných druhů rodu *Ceratomyxa*, a to na základě délek větví oddělující jednotlivé skupiny sekvencí. Podpory uzlů, které naznačují stabilitu vzájemných vztahů jednotlivých druhů, jsou poměrně nízké (pohybují se okolo 80 % bootstrapové podpory v ML a MP). Vymezení druhu *Ceratomyxa* sp. 6 je problematické. Tato skupina sekvencí by mohla reprezentovat na základě délek větví více samostatných druhů.

Na Obr. 15 je do fylogenetického stromu zanesena informace o hostitelích a lokalitách jejich výskytu. Vztahy výsledků fylogenetické analýzy, hostitele a lokality výskytu jsou více diskutovány v kapitole 6. Diskuze.

Všech sedm definovaných druhů vytváří blízce příbuznou skupinu, která se větví v blízkosti druhů *Ceratomyxa aegyptiaca*, *Ceratomyxa cheilinae* a *Ceratomyxa oxycheilinae*. Výsledky fylogenetické analýzy vybraných sekvencí reprezentující jednotlivé studované druhy v návaznosti na další druhy rodu *Ceratomyxa* jsou znázorněny na Obr. 16. V genové bance neexistuje žádný sekvenčně totožný druh s druhy zjištěnými v předkládané diplomové práci.

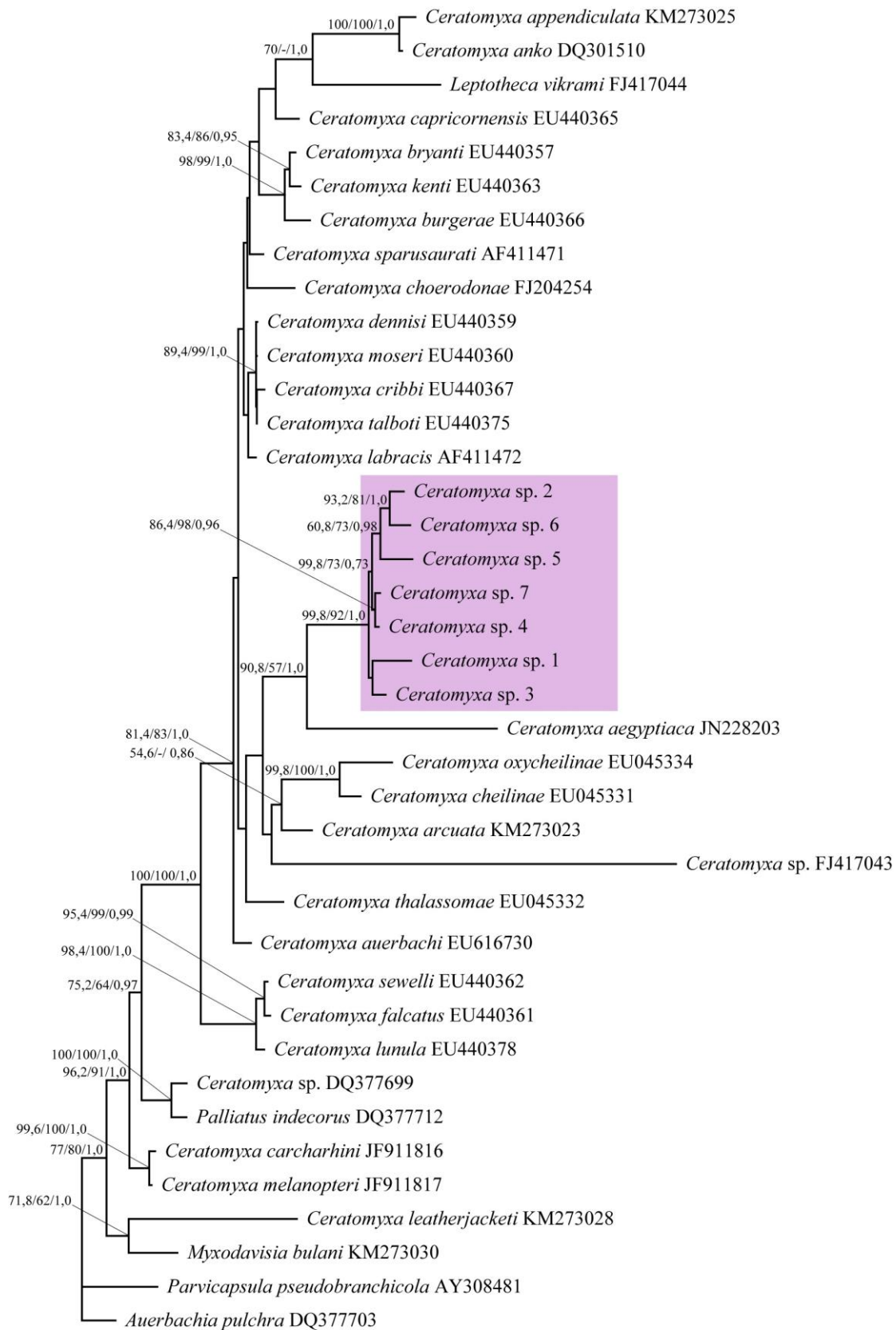


Obr. 14: Fylogenetické vztahy získaných SSU rDNA sekvencí druhů rodu *Ceratomyxa* odvozené metodou maximum likelihood. Procentuální hodnoty bootstrapů a hodnoty "posterior probabilities" (ML/MP/BI) vyšší než 50 % (0,5) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Jako outgroupy byly zvoleny druhy *Ceratomyxa aegyptiaca*, *Ceratomyxa oxycheilinae* a *Ceratomyxa cheilinae*. Přístupová čísla do genové banky jsou uvedena za jmény druhů. Měřítka délky větví je uvedeno pod stromem.



(Konkrétní geografická poloha jednotlivých lokalit viz Obr. 17 – kapitola 8. Přílohy)

Obr. 15: Fylogenetický strom znázorněný na Obr. 14 doplněný o informace o hostitelských druzích a lokalitách odchyty hostitelů.



Obr. 16: Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* odvozené metodou maximum likelihood (nově získané druhy jsou vyznačeny barevně). Pocentúální hodnoty bootstrapů a hodnoty "posterior probabilities" (ML/MP/BI) vyšší než 50 % (0,5) jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Jako outgroupy byly zvoleny druhy *Parvicapsula pseudobranchicola* a *Auerbachia pulchra*. Přístupová čísla do genové banky jsou uvedena za jmény druhů. Měřítka délky větví je uvedeno pod stromem.

6. Diskuze

Jediným ze dvou dosud popsaných druhů myxozoi, který parazituje na rybách druhu *Clinus cottoides* (čeleď Clinidae), je druh *Ceratomyxa cottoidii*, jenž byl popsán u tohoto hostitele na lokalitě De Hoop Nature Reserve na pobřeží Jihoafrické republiky (Reed a kol. 2007). Vzorky žlučníků z tohoto rybího hostitele zpracované v rámci předkládané diplomové práce obsahovaly morfologicky dva odlišné druhy rodu *Ceratomyxa*. Druh označený v této práci jako *Ceratomyxa* sp. 7 morfologií spory a jejími rozměry neodpovídal popsanému druhu *Ceratomyxa cottoidii* (Reed a kol. 2007 uvádí následující rozměry spor: délka spory 6,5 – 8 μm ; šířka spory 17 – 22 μm ; rozměry pólových váčků 2,3 – 3,0 x 2,0 – 3,0 μm). *Ceratomyxa* sp. 7 má kratší šířku spory, která je spíše srpkovitého tvaru. Druh označený jako *Ceratomyxa* sp. 6 má oválnější tvar myxospor, který připomíná tvar spory druhu *Ceratomyxa cottoidii*, a také svými rozměry, i když jen okrajově, spadá do popsaného rozmezí velikosti spor tohoto druhu. Vzorky z hostitele z lokality De Hoop, která je typovou lokalitou *Ceratomyxa cottoidii*, nebyly k dispozici. Dostupné ovšem byly vzorky z lokality Jongensfontain, která sousedí s lokalitou De Hoop, a je od ní vzdálená pouhých 50 km východním směrem. *Ceratomyxa* sp. 6 byla na lokalitě zachycena (tři z pěti DNA vzorků) a je tedy velmi pravděpodobné, že *Ceratomyxa* sp. 6 je totožná s popsaným druhem *Ceratomyxa cottoidii*.

Druh *Ceratomyxa dehoopi* byl popán u hostitele *Clinus superciliosus* (Reed a kol. 2007). *Ceratomyxa* sp. 7, která byla v jednom DNA vzorku zaznamenána u tohoto hostitele, rozměrově odpovídá právě druhu *Ceratomyxa dehoopi*, ovšem tvar její spory je v porovnání s *Ceratomyxa dehoopi* více zavalitější. Spory tvarem podobné druhu *Ceratomyxa dehoopi* byly zaznamenány u druhů *Ceratomyxa* sp. 1 a 2. *Ceratomyxa* sp. 2 má šířku spory nepatrně větší, než je horní mez rozmezí šířky spory u druhu *Ceratomyxa dehoopi*. Naopak spory *Ceratomyxa* sp. 1 přesně odpovídají svými rozměry, tvarem i polohou a velikostí pólových váčků. Přestože *Ceratomyxa* sp. 1 byla zaznamenána na lokalitě poměrně vzdálené od typové lokality *Ceratomyxa dehoopi*, můžeme se domnívat, že *Ceratomyxa* sp. 1 je s velkou pravděpodobností totožná s tímto druhem. Reed a kol. (2007) zaznamenali druh *Ceratomyxa dehoopi* také na velmi vzdálené lokalitě Jeffreys Bay a lze tedy předpokládat širší geografické rozšíření tohoto druhu. K vyřešení přesného zařazení tohoto druhu by bylo zapotřebí získat materiál z *Clinus superciliosus* z typové lokality De Hoop.

Fylogenetická analýza všech sekvenovaných vzorků z paslizounovitých ryb odhalila jejich blízkou příbuznost a zjistila jejich fylogenetickou pozici v rámci celé linie označované podle Fialy (2006) „the *Ceratomyxa* clade“. Fylogenetické vztahy jsou znázorněny na Obr. 16. Z provedené analýzy vyplývá, že se druhy řadí do blízké příbuznosti k druhům *Ceratomyxa cheilinea*, *Ceratomyxa oxycheilinea* a *Ceratomyxa aegyptica*, které jsou ve stromu nápadné svými dlouhými větvemi. Stejně tak i druh *Ceratomyxa cottoidii* patří k tzv. „dlouhovětevným druhům“, které díky své vysoké evoluční rychlosti SSU rDNA mohou působit problémy při konstrukcích fylogenetických stromů – tzv. Long-branch attraction (LBA) (Anderson a Swofford 2004). Pozicí skupiny druhů v rámci „the *Ceratomyxa* clade“, které mají tendenci tvořit ve fylogenetických stromech dlouhé větve, se v souvislosti s LBA jevem zabývali Fiala a kol. (2015). Výsledná fylogenetická pozice prezentovaná v této magisterské práci odpovídá zjištěnému postavení ve výše zmíněné publikované práci (Fiala a kol. 2015).

Kromě druhu *Clinus cottoides* se ze jmenovaných lokalit vyšetřovaly ještě další druhy paslizounovitých ryb, a to konkrétně druhy *Clinus acuminatus*, *Clinus superciliosus*, *Muraenoclinus dorsalis* a *Clinus brevicristatus*. Nejvíce parazitovaným druhem ryby, vzhledem k celkovému počtu vyšetřených jedinců a infikovaných jedinců, byl druh *Clinus superciliosus*, u kterého byla zjištěna přítomnost parazita u šesti z celkového počtu dvanácti ryb a na základě SSU rDNA molekulárních dat byla prokázána přítomnost šesti různých druhů parazitů z rodu *Ceratomyxa* (*Ceratomyxa* sp. 1, 2, 3, 4, 6 a 7). U každé ze zkoumaných druhů paslizounovitých ryb byla prokázána přítomnost minimálně jednoho druhu parazita. Nelze ovšem na základě provedených analýz specifikovat, zda by mohl některý z těchto druhů ryb být potencionálně náchylnější k infekci některým druhem rodu *Ceratomyxa*, protože u jednotlivých druhů byl vyšetřen odlišný počet jedinců.

Z hlediska počtu druhů parazita jsou nejbohatšími lokalitami Jongensfontain (Still Bay), Mouille point a Cape Columbie. Na těchto třech lokalitách byly nalezené tři různé druhy parazita (Jongensfontain – *Ceratomyxa* sp. 5, 6 a 7; Cape Columbie – *Ceratomyxa* sp. 3, 4 a 6; Mouille point – *Ceratomyxa* sp. 2, 6 a 7). Z hlediska počtu druhů hostitele je nejbohatší lokalitou Mouille point, na níž byly zjištěny celkem tři druhy hostitelské ryby – *Clinus acuminatus*, *Clinus superciliosus* a *Muraenoclinus dorsalis*. I v tomto případě je ale nezbytné zmínit, že počet vyšetřovaných ryb z této lokality byl nejvyšší ze všech zkoumaných lokalit.

Z provedené fylogenetické analýzy lze usuzovat, že evolučně nejodvozenějším druhem je *Ceratomyxa* sp. 7. Tento druh parazituje nejvíce druhů ryb (celkem čtyři druhy), byl nalezen na čtyřech různých lokalitách a také byl prokázán u nejvyššího počtu jedinců (15).

Ve srovnání s tímto byly čtyři druhy rodu *Ceratomyxa* objeveny pouze u jediného rybího hostitele (*Ceratomyxa* sp. 1, 2, 4 – *Clinus superciliosus* a *Ceratomyxa* sp. 5 – *Clinus cottoides*).

V populační struktuře u druhu *Ceratomyxa* sp. 7 můžeme pozorovat určitý geografický vliv. Jsou zde tři linie – první linie zahrnuje sekvence vzorků pocházejících z jediné lokality, ale třech různých hostitelů. Dvě další linie zahrnují sekvence vzorků výhradně z hostitele *Clinus cottoides*, přičemž jedna z těchto dvou linií obsahuje většinu vzorků z ryb odchycených na lokalitě Jongenfontain (Still Bay) a druhá většinu vzorků z lokality Sea View (Camp Bech View).

Ze získaného fylogenetického stromu odrážejícího pozici jednotlivých vybraných vzorků vzhledem k ostatním druhům rodu *Ceratomyxa* (viz Obr. 16) je zřejmé, že *Ceratomyxa* spp. získané z paslizounovitých ryb pocházejících z pobřeží Jihoafrické republiky mají SSU rDNA, která má mnohem rychlejší míru evoluce, než u většiny druhů rodu *Ceratomyxa*. Usuzujeme tak na základě velmi dlouhých větví vedoucích ke studované skupině *ceratomyx* a také na základě sesterských druhů *Ceratomyxa cheilinae*, *Ceratomyxa oxycheilinae* a *Ceratomyxa aegyptica*. Vzhledem k této velmi rychlé evoluci SSU rDNA je nesnadné rozhodnout, zda sekvence představující druh *Ceratomyxa* sp. 6 jsou reprezentanty jednoho druhu, nebo se jedná o zástupce více velmi příbuzných druhů. Sekvence dvou klonů vzorku č. 1503 by naznačovala první možnost, kdy v rámci jednoho genomu existuje vysoká intragenomová variabilita. Naopak přítomnost více druhů naznačuje klonovaný vzorek č. 1501 s téměř identickými sekvencemi dvou klonů. Situaci komplikuje fakt, že hostitelé bývají velmi často parazitováni více druhy rodu *Ceratomyxa* zároveň, což dokazují například sekvence dvou klonů vzorku žlučníku ryby s označením 1504. Nemůžeme tedy vyloučit variantu, že vzorek 1503 také obsahoval smíšenou infekci dvou druhů rodu *Ceratomyxa*.

Druh *Ceratomyxa cottoidii* byl dosud znám jen u druhu *Clinus cottoides* (Reed a kol. 2007). Výsledky předkládané práce mohou rozšířit hostitelské spektrum druhu *Ceratomyxa cottoidii*, a to o druh *Clinus superciliosus*, pokud se bude druh *Ceratomyxa* sp. 6 považovat za *Ceratomyxa cottoidii*. Podle práce z roku 2008 (Von der Heyden) existují na pobřeží Jihoafrické republiky dvě geneticky odlišné populace druhu *Clinus cottoides*, mezi kterými nedochází de facto k žádnému toku genů. Lze předpokládat, že by se ona silná přírodní bariéra, rozhraní Atlantického a Indického oceánu, která s největší pravděpodobností zapříčiňuje efektivní izolaci těchto dvou populací hostitele, mohla stejným způsobem odrazit také v populační struktuře parazita *Ceratomyxa cottoidii*. V rámci této diplomové práce nebyly k dispozici vzorky z *Clinus cottoides* z Atlantického oceánu a proto nelze

posoudit možnou koevoluci druhu *Ceratomyxa* sp. 6 s hostitelským druhem. Nicméně *Ceratomyxa* sp. 6 tvoří sekvenčně poměrně různorodou skupinu a dvě nejodlišnější sekvence pochází z lokality Mouille point (sekvence 1529_1) a Cape Columbie (sekvence 1461_1) z pobřeží Atlantického oceánu. Tyto sekvence pochází ovšem z hostitele *Clinus superciliosus*. Můžeme se jen domnívat, že *Clinus cottoides* z pobřeží Atlantického oceánu je parazitován druhem *Ceratomyxa* sp. 6 (pravděpodobně *Ceratomyxa cottoidii*), který má sekvenční podobnost se sekvencemi 1529_1 a 1461_1 a takto vytváří oddělené populace v rámci *Ceratomyxa cottoidii* v souladu s populační strukturou hostitele. Stejně tak lze předpokládat, že populační struktura zmíněného parazita by pravděpodobně mohla korelovat s populační strukturou definitivního hostitele – v případě mořských myxosporeí se jedná o zástupce třídy mnohoštětinatci (Polychaeta). Ani tato hypotéza však nemůže být prozatím ověřena, protože definitivní hostitel druhu *Ceratomyxa cottoidii* není známý.

7. Závěr

- Ze všech zkoumaných vzorků ryb z čeledi Clinidae bylo celkem získáno 35 SSU rDNA sekvencí myxosporeí.
- Na základě těchto sekvencí byly zpracované fylogenetické analýzy, ze kterých byla zjištěna přítomnost pravděpodobně sedmi různých druhů rodu *Ceratomyxa* – označené jako *Ceratomyxa* sp. 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7. V genové bance neexistuje žádný sekvenčně totožný druh s těmito druhy.
- Všechny druhy tvoří společnou fylogenetickou skupinu, která se větví v rámci „the *Ceratomyxa* clade“, a to spolu s druhy, které jsou ve stromu charakteristické svými dlouhými větvemi. Na základě provedených analýz můžeme usuzovat, že *Ceratomyxa* spp. získané z paslizonovitých ryb pocházejících z pobřeží Jihoafrické republiky mají SSU rDNA, která má mnohem rychlejší míru evoluce, než u většiny druhů rodu *Ceratomyxa*.
- Evolučně nejodvozenějším druhem je druh označený jako *Ceratomyxa* sp. 7. Tento druh rozměry a tvarem své spory neodpovídá popsaným druhům z této oblasti – *Ceratomyxa cottoidii* a *Ceratomyxa dehoopi*.
- V populační struktuře u druhu *Ceratomyxa* sp. 7 můžeme pozorovat určitý geografický vliv. Jsou zde tři linie – první linie zahrnuje sekvence vzorků pocházejících z jediné lokality, ale třech různých hostitelů. Dvě další linie zahrnují sekvence vzorků výhradně z hostitele *Clinus cottoides*, přičemž jedna z těchto dvou linií obsahuje většinu vzorků z ryb odchycených na lokalitě Jongensfontain (Still Bay) a druhá většinu vzorků z lokality Sea View (Camp Beach View).
- Druh označený jako *Ceratomyxa* sp. 6 nalezený na lokalitě Jongensfontain (Still Bay) svými rozměry i tvarem spory odpovídá popsanému druhu *Ceratomyxa cottoidii* z typové lokality De Hoop Nature Reserve a lze tedy usuzovat, že se jedná právě o tento druh.
- Druh označený jako *Ceratomyxa* sp. 1 nalezený na lokalitě Kommetje svými rozměry i tvarem spory odpovídá popsanému druhu *Ceratomyxa dehoopi* z typové lokality De Hoop Nature Reserve a lze tedy usuzovat, že se jedná právě o tento druh.
- Z hlediska počtu druhů parazita jsou nejbohatšími lokalitami Jongensfontain (Still Bay), Mouille point a Cape Columbie, na nichž byly zaznamenány tři různé druhy parazita.

- Z hlediska počtu druhů hostitele je nejbohatší lokalitou Mouille point, na níž byly zjištěny celkem tři druhy hostitelské ryby – *Clinus acuminatus*, *Clinus superciliosus* a *Muraenoclinus dorsalis*.

8. Přílohy



Obr. 17: Mapa pobřeží Jihoafrické republiky – konkrétní geografická poloha jednotlivých lokalit sběru vzorků.

9. Zdroje

9.1 Literární zdroje

Ali, M. A. (2000). *Ortholinea basma* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) from the Agile Klipfish *Clinus agilis* (Teleostei: Clinidae). Light and scanning elektron microscopy. *European Journal od Protistology* 36, 100 – 102.

Alvarez-Pellitero, P., Sitjá-Bobadilla, A. (1993). Patology of Myxosporea in marine fish culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 17, 229 – 238.

Anderson, F. E., Swofford, D. L. (2004). Should we be worried about long-branch attraction in real data sets? Investigations using metazoan 18S rDNA. *Molecular Phylogenetic Evolution* 33, 440 – 451.

Atkinson, S. D, Foott, J. S, Bartholomew, J. L. (2014). Erection of *Ceratonova* n. gen. (Myxosporea: Ceratomyxidae) to encopass freshwater species *C. gasterostea* n. sp. from threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and *C. shasta* n. comb. from from salmonid fishes. *Journal of Parasitology* 100, 640 – 645.

Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett S. L., Lowenstine, L. J., Garner, M. M., Gardiner, C. M., Rideout B. A., Keel, M. K., Brown, J. D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology* 38, 1199 – 1207.

Bartholomew, J. L., Rohovec, J. S., Fryer, J. L. (1989). *Ceratomyxa shasta*, a Myxosporean Parasite of Salmonids. *U.S. Fish & Wildlife Service*, National Fisheries Research Center, USA.

Bartholomew, J. L., Wilson, J. C. (2002). Whirling Disease Reviews and Current Topics. *Proceedings of the 7th Annual Whirling Disease, Symposium 29*, Salt Lake City, USA, 262 pp.

Bartošová-Sojková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., Tým, T., Holzer, A. S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *International Journal for Parasitology* 44, 565 – 577.

Bartošová-Sojková, P., Kodádková, A., Pecková, H., Kuchta, R., Reed, C. C. (2015). Morphology and phylogeny of two new species of *Sphaeromyxa* Thélohan, 1892 (Cnidaria: Myxozoa) from marine fish (Clinidae and Trachichthyidae). *Parasitology* 142, 660 – 674.

Bütschli, O. (1882). Myxosporidia. In: Winter, C. F. (Eds.), Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. 1. Protozoa, 2nd edn., Germany, 590 – 603.

Canning, E. U., Okamura, B. (2004). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology* 56, 43 – 131.

Cloutier, R., Arratia, G. (2004). Early diversifications of actinopterygians. In: Arratia, Wilson a Cloutier (Eds.), Recent Advances in the Origin and Early Radiation of Vertebrates. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Germany, 217 – 270.

Collins, A. G. (2009). Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences* 38, 139 – 149.

Desportes, I., Theodorides, J. (1982). Données ultrastructurales sur la sporogénèse de deux myxosporidies rapportées aux genres *Leptotheca* et *Ceratomyxa* parasites de *Merluccius merluccius* (L.) (Téléostéen Merlucciidae). *Protistologica* 18, 533 – 557.

Diamant, A., Lom, J., Dyková, I. (1994). *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organism* 20, 137 – 141.

Eiras, J. C. (2006). Synopsis of the species of the genus *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporia: Ceratomyxidae). *Systematic Parasitology* 65, 49 – 71.

Feist, S. W. (2008). Myxozoa infection. In: Eiras, J. C., Segner, H., Wahli, T., Kapoor, G. B. (2008). Fish diseases Volume 1 and 2. Science Publishers, USA.

- Emery, C. (1909). I missosporidii sono Protozoi? *Monitore Zoologico Italiano* 22, 247.
- 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*. *Diseases of Aquatic Organisms* 45, 61 – 68.
- Fiala, I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Journal of International Parasitology* 36, 1521 – 1534.
- Fiala, I., Bartošová, P. (2010). History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evolutionary Biology* 10, 13.
- Fiala I., Bartošová-Sojtková P., Whipps C. M. (2015). Classification and Phylogenetics of Myxozoa. In: Okamura a kol. (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Switzerland, 85 – 110.
- Fiala, I., Hlavničková, A., Kodádková, A., Freeman, M. A., Bartošová-Sojtková, P., Atkinson, S. D. (2015). Evolutionary origin of *Ceratomyxa shasta* and phylogeny of the marine myxosporean lineage. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 86, 75 – 89.
- Fontes, I., Hallett, S. L., Mo, T. A. (2015). Comparative Epidemiology of Myxozoan Diseases. In: Okamura a kol. (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Switzerland, 317 – 341.
- Grabner, D. S., El-Matbouli, M. (2010). Experimental transmission of malacosporean parasites from bryozoans to common carp (*Cyprinus carpio*) and minnow (*Phoxinus phoxinus*). *Parasitology* 137, 629 – 639.
- Grassé, P. P. (1970). Embranchement des Myxozoaires In: Grassé, P. P., Poisson, R. R., Tuzet, O. (Eds.), *Précis de Zoologie vol 1, Invertébrés*, Mason et Cie, France.
- Griparic, L., van der Blik, A. M. (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* 2, 235 – 244.

Gunter, N. L., Burger, M. A. A., Adlard, R. D. (2009). Morphometric and molecular characterisation of four new *Ceratomyxa* species (Myxosporea: Bivalvulida: Ceratomyxidae) from fishes off Lizard Island, Australia. *Folia Parasitologica* 57, 1 – 10.

Hartikainen, H., Hrubl, A., Okamura, B. (2014). Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76, 261 – 269.

Hedrick, R. P., Baxa, D. V., De Kinkelin, P., Okamura, B. (2004). Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitology Research* 92, 81 – 88.

Holland, J. W., Okamura, B., Hartikainen, H., Secombes, C. J. (2010). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 278, 546 – 553.

Hyman, L. H. (1940). *The invertebrates: Protozoa through Ctenophora*. McGraw-Hill, USA.

Ikeda, I. (1912). Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. I. The life history of a new actinomyxidian *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. *Archiv für Protistenkunde* 25, 240 – 272.

Jiménez-Guri, E., Philippe, H., Okamura, B., Holland, P. W. H. (2007). *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. *Science* 317, 116 – 118.

Jurajda, Š., Kozubek, S., Münich, D., Škoda, S. (2015). Mezinárodní srovnání kvality publikačního výkonu vědních oborů v České republice. IDEA think tank studie, 48 pp.

Jurine, L. L. (1825). Historie des poissons du lac Lemman. *Memoires de la Société de Physique et d'Historie Naturelle* 3, 133 – 235.

Karlsbakk, E., Jørgensen, A., Nikolaisen, V., Aleksandersen, S., Ottem, K. F., Nylund, A. (2010). Parvicapsulosis in Farmed Atlantic Salmon. In: *Fisken og Havet* (Havforskningsrapporten særnummer I), Norwegian, 105 – 6.

Karlsbakk, E., Sæter, P. A., Høstlund, C., Fjellsøy, K. R., Nylund, A. (2002). *Parvicapsula pseudobranchicola* n.sp. (Myxozoa), a myxosporidian infecting the pseudobranch of cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, 381 – 7.

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. G., Longshaw, M., Palenzuela, O., Siddall, M. E., Xiao, C. X. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 395 – 413.

Kent, M. L., Poppe, T. T. (1988). Diseases of net pen-reared salmonid fishes. Pacific Biological Station, Nanaimo, BC., 293 pp.

Kodádková, A. (2014). Myxosporean phylogeny and evolution of myxospore morphotypes. Ph.D. Thesis Series, No. 15. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, ČR, 185 pp.

Kudo, R. R. (1966). Protozoology, 5th edn. Charles C. Thomas Publisher, USA.

Køie, M., Karlsbakk, E., Einen, A-CB., Nylund, A. (2013). A parvicapsulid (Myxozoa) infecting *Sprattus sprattus* and *Clupea harengus* (Clupeidae) in the Northeast Atlantic uses *Hydroides norvegicus* (Serpulidae) as invertebrate host. *Folia Parasitologica* 60, 149 – 154.

Køie, M., Karlsbakk, E., Nylund, A. (2007). A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *Gadimyxa atlantica* n. sp. *Journal of Parasitology* 93, 1459 – 1467.

Køie, M., Karlsbakk, E., Nylund, A. (2008). The marine herring myxozoan *Ceratomyxa auerbachii* (Myxozoa : Ceratomyxidae) uses *Chone infundibuliformis* (Annelida : Polychaeta : Sabellidae) as invertebrate host. *Folia Parasitologica* 55, 100 – 104.

Køie, M., Whipps, C. M., Kent, M. L. (2004). *Ellipsomyxa gobii* (Myxozoa : Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei : Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Annelida : Polychaeta) as invertebrate hosts. *Folia Parasitologica* 51, 14 – 18.

Lom, J. (1990). Myxozoa. In: Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (Eds.), Handbook of the Protoctista; the structure, cultivation, habits and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi. Jones and Bartlett Publishers, USA, 36 – 52.

Lom, J. (1996) Prvoci kmene Myxozoa novou skupinou vícebuněčných parazitů. *Vesmír* 75, 146 – 149.

Lom, J., Artur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases* 12, 151 – 156.

Lom, J., Dyková, I. (1992). Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science, Netherlands.

Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53, 1 – 36.

Margulis, L., Schwartz, K. (1998). Five kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on earth, 3rd edn. W.H. Freeman and Company, USA.

Markiw, M. E., Wolf, K. (1984). *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubicid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *Journal of Protozoology* 30, 561 – 564.

Müller, J. (1841). Über die Gattungen and Arten der Comatulen. *Archiv für Naturgeschichte* 7/1, 39 – 148.

Morris, D. J., Adams, A. (2006). Proliferative, presaccular stages of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the invertebrate host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Journal of Parasitology* 92, 984 – 989.

Nelson, J. S. (2006). Fishes of the world – 4th edition. Publisher by John and sons, USA.

Nesnidal, M. P., Helmkampf, M., Bruchhaus, I., El-Matbouli, M., Hausforf, B. (2013). Agent of whirling disease meets orphan worm: phylogenomic analyses firmly place Myxozoa in Cnidaria. PLoS ONE 8(1):e54576. doi:10.1371/journal.pone.0054576.

Nielsen, C. (2001). Animal evolution. Interrelationships of the living phyla. Oxford University Press, USA.

Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L. (2015). An introduction to Myxozoan Evolution, Ecology and Development. In: Okamura a kol. (Eds.), Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Springer International Publishing, Switzerland, 1 – 20.

Pote, L. A., Hanson, L. A., Khoo, L. (2003). Proliferative Gill disease. Department of Basic Sciences College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State, USA, 9 pp.

Prunescu, C. C., Prunescu, P., Pucek, Z., Lom, J. (2007). The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp.n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). *Folia Parasitologica* 54, 159 – 164.

Rambaut, A., Drummond, A. J., (2007). Tracer v1.4, dostupné z <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

Reed, C. C., Basson, L., Van As, L. L., Dyková, I. (2007). Four new Myxozoans (Myxosporea: Bivalvulida) from intertidal fishes along the south cost of Africa. *Folia Parasitologica* 54, 286 – 292.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572 – 1574.

Schlegel, M., Lom, J., Stechmann, A., Bernhard, D., Leipe, D., Dyková, I., Sogin, M. L. (1996). Phylogenetic analysis of complete small unit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde* 147, 1 – 9.

Shulman, J. J. (1966). Myxosporidia of the USSR. *Nauka*, Moscow – Leningrad. Translated for the US Department of the Interior. 1988. Amerind Publishing Company, India.

Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Dessler, S. S., Cone, D. K. (1995). The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *Journal of Parasitology* 81, 961 – 967.

Siddall, M. E., Whiting, M. F. (1999). Long-branch abstractions. *Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society* 15, 9 – 24.

Smothers, J. F., van Dohlen, C. D., Smith, L. H. Jr., Spall, R. D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science* 265, 1719 – 1721.

Sniddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Dessler, S. S., Cone, D. K. (1995). The demise of a phylum of protist; Phylogeny of Myxozoa and other parasiti Cnidaria. *Journal of parasitology* 8, 961 – 967.

Sterud, E., Forseth, T., Ugedal, O., Poppe, T. T., Jørgensen, A., Bruheim, T., Fjeldstad, P. H., Mo, A. T. (2007). Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Diseases of aquatic organisms* 77, 191 – 198.

Sterud, E., Simolin, P., Kvellestad, A. (2003). Infection by *Parvicapsula* sp. (Myxozoa) is associated with mortality in sea-caged Atlantic salmon *Salmo salar* in northern Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 54, 259 – 63.

Šmarda, J., Doškar, J., Pantíček, R., Růžičková, V., Kostíková, J. (2005). *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství Masarykovy univerzity, ČR.

Štolc, A. (1899). Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaires parent des Myxosporidies. *Bulletin international de l'Académie des sciences de Bohème* 12, 1 – 12.

Théodoridès, J., Pujol, P., Neyrand-de-Leffemebr, F., Delso, M. (1981). New cases of testicular parasitism of amphibians by myxosporideans of the genus *Myxobolus*. *Bulletin de la Société zoologique de France* 106, 386 pp.

Vincent, E. R. (2002). Relative susceptibility of various salmonids to whirling disease with emphasis on rainbow and cutthroat trout. In: Bartholomew, J. L., Wilson, J. C. (Eds.), *American Fisheries Society, Symposium 29*, Bethesda, USA, 109 – 115.

Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J., Votýpka, J. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. TRITON, ČR.

Von der Heyden, S., Procházka, K., Bowie, R. C. K. (2008). Significant population structure and asymmetric gene flow patterns amidst expanding populations of *Clinus cottoides* (Perciformes, Clinidae): application of molecular data to marine conservation planning in South Africa. *Molecular Ecology* 17, 4812 – 4826.

Wahli, T., Bernet, D., Steiner, A. P., Schmidt-Posthaus, H. (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Weiss rivers. *Aquatic Science* 69, 3 – 10.

Weill, R. (1938). L'interprétation 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.

Wilson, S. K. (2009). Diversity in the Diet and Feeding Habits of Blennie. In: Patzner, Gonclaves, Hastings a Kapoor (Eds.), Science Publisher, USA, 139 – 162.

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.

Yamato, T., Sanders J. E. (1979). Light and electron microscopic observations of sporogenesis in the *Ceratomyxa shasta* (Noble, 1950). *Journal of Fish Diseases* 2, 411 – 428.

Zhang, Z. Q. (2011). Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa* 3148, 7 – 12.

Zhu, M., Yu, X. B. (2004). Lower jaw character transitions among major sarcopterygian groups – a survey based on new materials from Yunnan, China. In: Arratia, G., Wilson, M. V. H., Cloutier, R. (Eds.), *Recent advances in the origin and early radiation of vertebrates*, Germany, 271 – 286.

Zrzavý, J., Hypša, V. (2003). Myxozoa, Polypodium, and the origin of the Bilateria: the phylogenetic position of “Endocnidozoa” in the light of the rediscovery of Buddenbrockia. *Cladistics* 19, 164 – 169.

Zrzavý, J., Mihulka, S., Kepka, P., Bezděk, A., Tietz, D. (1998). Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* 14, 249 – 285.

9.2 Internetové zdroje

<http://www.iucnredlist.org/details/178997/0>

www.who.int