



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Fylogenetické vztahy rybomerek (Myxosporea)
parazitujících u ryb z brakických vod**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Jolana Daňhelová

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

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Fylogenetické vztahy rybomerek (Myxosporea) parazitujících u ryb z brakických vod* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 bakalářské 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 3.5.2017

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování vedoucímu práce RNDr. Ivanu Fialovi, Ph.D. za jeho čas, cenné rady, ochotu a trpělivost. Velký dík také patří mým rodičům a sourozencům za obrovskou podporu ve studiu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem přátelům a příteli za trpělivost a důvěru.

Fylogenetické vztahy rybomerek (Myxosporea) parazitujících u ryb z brakických vod

Abstrakt

Práce se zabývá fylogenetickými vztahy myxosporeí parazitujících u ryb z brakických vod, ve kterých se mísí sladkovodní a mořská voda. V tomto prostředí dochází také k setkání mořské a sladkovodní parazitofauny myxosporeí. Myxosporea vytváří dvě hlavní fylogenetické linie právě v závislosti na prostředí svých rybích hostitelů. Cílem práce je zjistit, jaká Myxosporea parazitují u ryb žijících v brakických vodách, jejich příbuzenské vztahy a ve kterých fylogenetických liniích se nachází.

Úvodní část práce je věnována taxonomii myxozoí, popisu jejich morfologie, životních cyklů a fylogeneze. V této práci jsem se především zaměřila na Myxosporea tří rybích hostitelů *Scathophagus argus*, *Tetraodon nigroviridis* a *Tetraodon biocellatus*, které jsou importovány do České republiky jako akvarijní ryby. DNA jsem izolovala pomocí fenolchloroformové metody. Fylogenetický marker SSU rDNA jsem amplifikovala pomocí metody PCR a získané produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Všechny tyto metody byly prováděny v Biologickém centru AV ČR, v. v. i. Parazitologickém ústavu, v laboratoři rybí protistologie v Českých Budějovicích. Získané vzorky byly sekvenovány v servisní laboratoři SEQme.

Fylogenetické stromy byly konstruovány v programu Geneious, metodami maximum likelihood, maximum parsimony a Bayesovskou metodou. Získala jsem celkem SSU rDNA sekvence 10 druhů myxosporeí, které jsem fylogenetickou analýzou zařadila do fylogenetického stromu myxosporeí. Zjistila jsem, že brakické ryby jsou parazitovány jak druhy z mořské linie tak i ze sladkovodní linie myxosporeí a potvrdila jsem tak přítomnost těchto evolučně dávno oddělených větví parazitů u jednoho hostitele.

Klíčová slova: Myxozoa; Myxosporea; morfologie; hostitelé; fylogeneze;

Phylogenetic relations of Myxosporea parasitizing in brackish water fish

Abstract

The bachelor thesis is focused on the phylogenetic relationships of Myxosporea which parasitizes fish from brackish water where freshwater is mixed with saltwater. In this environment, myxozoan parasites from the freshwater fish hosts meet the ones from the marine fish. Myxosporea creates two main phylogenetic lineages depending directly on the environment of fish's hosts. The aim of this thesis is to find out the following: which Myxosporea parasitizes fish living in brackish water, their relationships and to which phylogenetic lineage these myxosporeans belong.

The introductory part of the thesis is dedicated to taxonomy of Myxozoa, description of their morphology, lifecycles and phylogenetics. I focused mainly on the Myxosporea from three brackish fish hosts *Scathophagus argus*, *Tetraodon nigroviridis* and *Tetraodon biocellatus* which are imported as aquarium fish to the Czech Republic. DNA of parasites was isolated by phenolchloroform method. A phylogenetic marker SSU rDNA was amplified by PCR method and gained products were visualized using gel electrophoresis. All these methods were carried out at the Biological Center of Academy of Science of the Czech Republic, Institute of Parasitology, in the Laboratory of fish protistology in České Budějovice. PCR products were sequenced in a service laboratory SEQme.

The phylogenetic trees were constructed in a program Geneious, by the following methods: maximum likelihood, maximum parsimony and the Bayesian inference method. I obtained SSU rDNA sequence of 10 species of Myxosporea which were placed by phylogenetic analysis into the phylogenetic tree of Myxosporea. I found out that brackish fish are parasitized by species of both marine and freshwater lineages of Myxosporea and I confirmed a presence of distantly related myxosporeans in one fish host.

Key words: Myxozoa; Myxosporea; morphology; hosts; phylogeny

Obsah

1	Úvod	7
2	Myxozoa	9
2.1	Studie Myxozoa	9
2.2	Životní cyklus.....	9
2.3	Klasifikace myxozoi.....	10
3	Fylogeneze myxozoi.....	12
4	Hostitelé.....	14
4.1	<i>Scathophagus argus</i>	14
4.2	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	14
4.3	<i>Tetraodon biocellatus</i>	15
5	Tkáňová a orgánová specifičnost	16
6	Cíle	18
7	Metodika.....	19
7.1	Materiál	19
7.2	Izolace DNA.....	19
7.3	PCR – polymerázová řetězová reakce.....	20
7.4	Gelová elektroforéza	21
7.5	Izolace DNA z gelu.....	21
7.6	Sekvenování	22
7.7	Fylogenetická analýza	22
8	Výsledky.....	23
9	Diskuze	33
10	Závěr	36
11	Zdroje.....	37

1 Úvod

Myxozoa jsou metazoární endoparazité mikroskopických rozměrů infikující především mořské a sladkovodní ryby. Jejich hostiteli však nejsou pouze ryby, ale mohou to být i plazi, obojživelníci, ptáci a savci, např. krtek nebo rejsek (Lom a Dykova, 2006; Yokoyama et al., 2012).

Skupina Myxozoa se rozděluje do dvou tříd – Myxosporea a Malacosporea. Malacosporea (Canning et al., 2000) je velmi malá skupina parazitů. Dodnes jsou popsány pouze 4 druhy, které jsou zařazeny do rodu *Buddenbrockia* a *Tetracapsuloides* (Lom a Dyková, 2006). Zatímco u třídy Myxosporea bylo popsáno více než 2300 druhů (Morris, 2010). Myxosporea se rozděluje na 2 podskupiny Bivalvulida a Multivalvulida. Rozdíl u těchto skupin spočívá v různé velikosti, tvaru, počtu chlopní a pólových váčků. Bivalvulida mají dvouchlopně spory a většinou dva pólové váčky a Multivalvulida mají stěnu spory ze tří či více chlopní a zpravidla čtyř pólových váčků (Lom a Dyková, 2006).

Typickým útvarem charakterizující tuto skupinu je spora. Chlopně spory k sobě těsně přiléhají a při kontaktu s hostitelem dochází k jejich otevření a uvolnění améboidního infekčního zárodku (sporoplasmy). Uvnitř spory jsou dále pólové váčky, které může spora obsahovat pouze jeden nebo až sedm. Uvnitř pólového váčku je spirálovitě stočené pólové vlákno, které je vymrštitelné a má ukotvovací schopnost, a proto slouží endoparazitům k zachycení na svém hostiteli (Lom, 1990). Spory většinou dosahují velikosti 10-20 μm . Buňky myxozoí mají mitochondrie tubulárního, diskovitého nebo plochého tvaru. Životní cyklus myxozoí je složitý, dále bude popsán v další kapitole. Vegetativní formou myxozoí jsou plasmodia, která jsou buď histozoická (nachází se ve tkáních) a coelozoická, která se objevují především v močovém nebo žlučovém traktu (Lom a Dyková, 2006).

Myxozoa u většiny ryb nepůsobí patologické změny, nicméně některé druhy mohou způsobovat závažná onemocnění ryb, které mají ekonomické dopady v rybích chovech. Mohou působit úmrtí zejména mladých rybích jedinců nebo způsobit to, že maso ryby je znehodnoceno a po kuchyňské úpravě může být želatinózní konzistence (Volf, Horák, 2007).

Mezi významné rody myxozoi řadíme např. *Myxobolus*, *Henneguya*, *Buddenbrockia*, *Ortholinea*, *Zschokkella*, *Kudoa*, *Parvicapsula*, *Ceratomyxa*, *Chloromyxum* a *Myxobilatus*.

Druhy rodu *Myxobolus* patří mezi nejpočetnější zástupce myxozoi (Eiras et al., 2014), je popsáno více než 800 druhů a jsou velmi běžnými parazity všech sladkovodních i mořských ryb. Morfologicky podobným rodem je rod *Henneguya*, který se odlišuje pouze přívěsky na koncích spory. Oba rody obsahují zástupce parazitující histozoicky v různých rybích tkáních. Spory rodu *Ortholinea* mají nejčastěji tvar kulovitý až nepravidelně elipsoidní. Polární váčky jsou hruškovitého tvaru. *Ortholinea* jsou coelozoičtí parazité infikující především močový systém mořských ryb. *Zschokkella* tvoří spory elipsoidního tvaru mírně ohnuté. Nejčastější coelozoický parazit, ale výjimečně i histozoický u mořských i sladkovodních ryb. Druhy v rámci rodu *Kudoa* (Meglitsch, 1947) jsou nejčastěji histozoičtí parazité napadající mořské druhy kostnatých ryb. Spory u rodu *Kudoa* tvoří 4 chlopně, z nichž každá obsahuje polární váček. Spory mají tvar hvězdicový nebo čtvercový. Někdy mohou být spory nesymetrické a to tak, že jedna chlopeň je větší než ostatní. *Kudoa* jsou parazité infikující nejčastěji svalové buňky. *Parvicapsula* nejčastěji infikuje ledvinné kanálky nebo močový měchýř mořských ryb. Jejich spory jsou polodlouhé, nesouměrné a zakřivené. *Ceratomyxa* vytváří podlouhlé spory zpravidla ve tvaru půlměsíce nebo oblouku. Řadí se mezi coelozoické parazity mořských ryb. Spory *Chloromyxum* jsou hladké nebo mají typické žebrování na svém povrchu. Polární váčky jsou často ve dvojicích o různé velikosti. *Myxobilatus* vytváří polodlouhé špičaté spory a polární váčky jsou hruškovitého tvaru. Coelozoický parazit především v močovém systému (Lom a Dyková, 2006).

2 Myxozoa

2.1 Studie Myxozoa

První zmínky o skupině Myxozoa byly popsány v roce 1825 Jurinem, který našel cysty ve svalovině ryby *Coregonus fera* v Ženevském jezeru. Počátky popisů druhů myxozoí ovšem spadají do konce devatenáctého století. Průlom v chápání aspektů života myxozoí, jejich diverzity a evoluce se udál během posledních 35 let. V roce 1980 Markiw a Wolf popsali životní cyklus Myxozoa. Zjistili, že paraziti známí z máloštětinatců (Actinosporea) jsou součástí životního cyklu myxozoí a nejsou samostatným taxonem. To vedlo k systematickým změnám a zrušení třídy Actinosporea. Až do devadesátých let minulého století byla Myxozoa považována za Protozoa. S příchodem molekulárních přístupů byla Myxozoa potvrzena jako součást živočichů (Smothers et al., 1994) blízce příbuzných k žahavcům, což bylo s definitivní platností potvrzeno až Hollandem et al., (2010).

2.2 Životní cyklus

Markiw a Wolf (1984) poprvé popsali základy životního cyklu u rybomorky *Myxobolus cerebralis*. Bylo zjištěno, že životní cyklus probíhá ve dvou hostitelích během tzv. myxosporové a aktinosporové fáze. Více prostudovaná fáze myxosporová, při které dochází ke vzniku myxospor, se nachází u nižších obratlovců, především u ryb, méně pak u plazů a obojživelníků. Aktinosporová fáze, zahrnující sexuální proces, probíhá u kroužkovců a vznikají aktinospory. Typický znak vývojového stádia a unikátní pro Myxozoa je tzv. buňka v buňce, což znamená, že vytvořené sekundární buňky přetrvávají uvnitř primárních buněk.

Aktinospory uvolněné z kroužkovce do vody se setkají s kůží nebo žaberním epitelem rybiho hostitele. Pomocí polárních vláken dojde k upevnění spor na povrch hostitele. Dále sporoplasma vstupuje přes kůži do hostitele a následuje presporogenní fáze a ke vzniku vnitřní sekundární buňky uvnitř primární buňky. Dochází ke vzniku plasmodií, která jak už bylo zmíněno v úvodu, jsou histozoická nebo coelozoická. Histozoická se nachází ve tkáních a coelozoická se objevuje především v močovém nebo žlučovém traktu. V dalším průběhu vývoje dochází ke vzniku sporoblastů, které dozrávají a vznikají myxospory.

Poté dochází k požití definitivním hostitelem. V průběhu vývoje dochází k rozvoji 2 buněk (α a β) na 16 gametických buněk, které prošly meiózou za vzniku 8 zygot.

Konečným stádiem je vznik 8 aktinospor. Aktinospora má ve většině případů přední sporové tělo, obsahující 3 polární váčky, 3 chlopně a sporoplasmu s mnoha jádry a infekčních buněk.

2.3 Klasifikace myxozoi

Klasifikace myxozoi je především založena na morfologii spor. Tato klasifikace vychází z práce Loma a Noblého (1984). Kromě tvaru spor také záleží na počtu a uspořádání pólových váček a chlopní. Avšak tato taxonomie je v dnešní době nepřesná. Není zde zahrnut životní cyklus se střídáním hostitelů, morfologie aktinospor uvnitř konečného bezobratlého hostitele a hlavně fylogenetické vztahy objeveny analýzou podle SSU rDNA. Vytvoření třídy Malacosporea je v souladu s výsledky fylogenetické analýzy, oddělující Myxosporea od malacosporeí (Canning a kol., 2010). Avšak v ostatních ohledech molekulární přístup nepodporuje stávající taxonomii myxosporeí (Kent et al., 2001; Fiala, 2006).

Dvě základní fylogenetické větve myxosporeí nejsou založeny na podobnosti tvaru spor, ale na mořském či sladkovodním prostředí svých hostitelů. Proto zástupci jako např. (*Myxidium*, *Ortholinea*, *Zschokkella*), kteří parazitují u sladkovodních i mořských ryb se vyskytují v obou hlavních liniích. V současné době je snahou přizpůsobovat taxonomii s poznatky fylogeneze. Dochází k systematickým změnám, např. druhy rodu *Polysporoplasma* byly zařazeny do rodu *Sphaerospora* na základě jejich fylogenetické příbuznosti (Bartošová et al., 2013). Tabulka 1 obsahuje všechny platné rody a jejich typové druhy.

Tabulka 1: 64 rodů Myxozoa s odpovídajícími typovými druhy

Rod	Druh	Rod	Druh
<i>Acauda</i>	<i>A. hoffmani</i> Whipps, 2011	<i>Neobipteria</i>	<i>N. macrouri</i> Kovaleva, Gaevskaya et Krasin, 1986
<i>Agarella</i>	<i>A. gracilis</i> Dunkerly, 1915	<i>Neohenneguya</i>	<i>N. tetradialata</i> Tripathi, 1953
<i>Alatospora</i>	<i>A. samaroidea</i> Shulman, Kovaleva et Dubina, 1979	<i>Neomyxobolus</i>	<i>N. ophiocephalus</i> Chen et Hsieh, 1960
<i>Auerbachia</i>	<i>A. anomala</i> Meglitsch, 1968	<i>Neoparvicapsula</i>	<i>N. ovalis</i> Kovaleva, Gaevskaya et Shulman, 1982
<i>Bipteria</i>	<i>B. admiranda</i> Kovaleva, Zubchenko et Krasin, 1983	<i>Neothelohanellus</i>	<i>N. catlae</i> Das et Haldar, 1986
<i>Buddenbrockia</i>	<i>B. plumatellae</i> Schröder, 1910	<i>Noblea</i>	<i>N. admiranda</i> Kovaleva (1989)
<i>Cardimyxobolus</i>	<i>C. leshanensis</i> Ma, Dong et Wang, 1982	<i>Octospina</i>	<i>O. tongrensis</i> Hsieh et Xiao, 1993

<i>Caudomyxum</i>	<i>C. nanum</i> Bauer, 1948	<i>Ortholinea</i>	<i>O. divergens</i> (Thélohan, 1895)
<i>Ceratomyxa</i>	<i>C. sphaerulosa</i> Thélohan, 1892	<i>Palliatux</i>	<i>P. mirabilis</i> Shulman, Kovaleva et Dubina, 1979
<i>Ceratonova</i>	<i>C. shasta</i> Atkinson, Foott, et Bartholomew, 2014	<i>Paramyxoproteus</i>	<i>P. reinhardti</i> Wierzbicka, 1986
<i>Chloromyxum</i>	<i>C. leydigi</i> Mingazzini, 1890	<i>Parvicapsula</i>	<i>P. asymmetrica</i> Shulman, 1953
<i>Coccomyxa</i>	<i>C. morovi</i> Léger et Hesse, 1907	<i>Phlogospora</i>	<i>P. mysti</i> Qadri, 1962
<i>Cystodiscus</i>	<i>C. immersus</i> Lutz, 1889	<i>Pseudalatospora</i>	<i>P. scombri</i> Kovaleva et Gaevskaya, 1983
<i>Dicauda</i>	<i>D. atherinoidi</i> Hoffman et Walker, 1978	<i>Renispora</i>	<i>R. simae</i> Kalavati, Longshaw et MacKenzie, 1996
<i>Ellipsomyxa</i>	<i>E. gobii</i> Kõie, 2003	<i>Schulmania</i>	<i>S. ovale</i> Kovaleva, Zubchenko et Krasin, 1983
<i>Enteromyxum</i>	<i>E. scopthalmi</i> Palenzuela, Redondo et Alvarez-Pellitero, 2002	<i>Sigmomyxa</i>	<i>S. sphaerica</i> (Thélohan, 1892)
<i>Fabespora</i>	<i>F. nana</i> Naidenova et Zaika, 1969	<i>Sinuolinea</i>	<i>S. dimorpha</i> (Davis, 1916)
<i>Gadimyxa</i>	<i>G. atlantica</i> Kõie, Karlsbakk et Nylund, 2007	<i>Soricimyxum</i>	<i>S. fegati</i> Prunescu, Prunescu, Pucek et Lom, 2007
<i>Globospora</i>	<i>G. sphaerica</i> (Evdokimova 1973)	<i>Sphaeromyxa</i>	<i>S. balbianii</i> Thélohan, 1892
<i>Hennegoides</i>	<i>H. longitudinalis</i> Lom, Tonguthai et Dyková, 1991	<i>Sphaerospora</i>	<i>S. elegans</i> Thélohan, 1892
<i>Henneguya</i>	<i>H. psorospermica</i> Thélohan, 1892	<i>Spirosuturia</i>	<i>S. carassii</i> Chen et Hsieh, 1984
<i>Hoferellus</i>	<i>H. cyprini</i> (Doflein 1898)	<i>Tetracapsuloides</i>	<i>T. bryosalmonae</i> (Canning, Curry, Feist, Longshaw et Okamura, 1999)
<i>Kentmoseria</i>	<i>K. alata</i> (Kent et Moser, 1990)	<i>Tetrauronema</i>	<i>T. macropodus</i> Wu, Wang et Jiang, 1988
<i>Kudoa</i>	<i>K. clupeidae</i> (Hahn, 1917)	<i>Thelohanellus</i>	<i>T. hovorkai</i> Akhmerov, 1960
<i>Laterocaudata</i>	<i>L. mastacembala</i> Chen et Hsieh, 1984	<i>Triangula</i>	<i>T. yangkiangensis</i> Chen et Hsieh, 1984
<i>Latyspora</i>	<i>L. scomberomori</i> Bartošová, Freeman, Yokoyama, Caffara et Fiala, 2011	<i>Trigonosporus</i>	<i>T. acanthogobii</i> Hoshina, 1952
<i>Meglitschia</i>	<i>M. insolita</i> (Meglitsch, 1960)	<i>Trilospora</i>	<i>T. californica</i> Noble, 1939
<i>Myxidium</i>	<i>M. lieberkuehni</i> Bütschli, 1882	<i>Trilosporoides</i>	<i>T. platessae</i> Kõie, 2005
<i>Myxobilatus</i>	<i>M. gasterostei</i> (Parisi, 1912)	<i>Unicapsula</i>	<i>U. muscularis</i> Davis, 1924
<i>Myxobolus</i>	<i>M. muelleri</i> Bütschli, 1882	<i>Unicauda</i>	<i>U. clavicauda</i> (Kudo, 1934)
<i>Myxodavisia</i>	<i>M. spinosa</i> (Davis, 1917)	<i>Wardia</i>	<i>W. ovinocua</i> Kudo, 1919
<i>Myxoproteus</i>	<i>M. ambiguus</i> (Thélohan, 1895)	<i>Zschokkella</i>	<i>Z. hildae</i> Auerbach, 1910

Zdroj: Ivan Fiala et al., 2015

3 Fylogeneze myxozoi

V současné době existuje přes 2 300 druhů myxozoi, rozdělených do 64 rodů a 17 čeledí. Toto rozdělení je především založeno na morfologii spor. Morfologie spor je hlavním kritériem pro taxonomii Myxozoa, avšak molekulární markery odhalují nečekané vztahy. Poukazují na rozpory v klasifikaci podle morfologie spor a fylogenezi založené na sekvenci vybraných molekulárních markerů.

Gen pro RNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) je univerzální molekulárním markerem, který se vyskytuje v genomu všech eukaryot a byl úspěšně použit k fylogenetickým analýzám (shrnutí v Avise 2004). První SSU rDNA sekvence u myxosporeí byla použita pro zjištění pozice v eukaryotickém stromě života (Smothers et al., 1994; Siddall et al., 1995; Schlegel et al., 1996). Od té doby SSU rDNA sekvence byly používány pravidelně k ujasnění vztahů mezi druhy skupiny Myxozoa. Zajímavostí je, že mořské a sladkovodní druhy myxozoi mají odlišnou délku tohoto genu. Zástupci sladkovodní linie mají SSU rDNA sekvenci dlouhou více než 2000 bází. Mořská linie má SSU rDNA sekvenci kratší, okolo 1800 bází (Fiala, Dyková, 2004; Fiala, 2006). Jednu z nejdelších SSU sekvencí nalezneme u druhů rodu *Sphaerospora*, která činí více než 3700 bází (Jirků et al., 2007; Holzer et al., 2007; Bartošová et al., 2013; Eszterbauer et al., 2013). Druhy rodu *Sphaerospora* má jednu z nejdelších SSU rDNA sekvencí mezi eukaryoty, kvůli typicky vloženým inzertům v SSU rRNA genu (Jirků, 2007).

U myxosporeí se nevyužívá k pozorování příbuzenských vztahů pouze SSU rDNA, ale i RNA velké ribozomální podjednotky (Bartošová et al., 2009). Výsledky fylogeneze založené na tomto genu jsou srovnatelné s topologií stromu SSU rDNA.

Mořská linie zahrnuje druhy myxosporeí s životním cyklem v mořském prostředí, které využívají mnohoštětinatce jako definitivní hostitele (Kent et al. 2001; Holzer et al. 2007; Sitjà-Bobadilla, Palenzuela, 2013). Zástupci sladkovodní fylogenetické linie jako své definitivní hostitele využívají máloštětinatce (Kent et al., 2001; Holzer et al., 2007; Sitjà-Bobadilla, Palenzuela, 2013).

Na základě rDNA genů se sladkovodní a mořská linie dělí do tzv. skupin. Sladkovodní Myxosporea se dělí do 5 skupin: *Chloromyxum*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus*, močový a jaterní biliární (Fiala, 2006). Mořská linie Myxosporeí se větví do 7 skupin: *Bipteria*, *Ceratomyxa*, *Kudoa*, mořský močový, *Enteromyxum*, *Ceratonova* a *Chloromyxum* (Fiala, 2006; Whipps et al., 2004). Myxosporea v těchto skupinách

spojuje zejména stejná lokalizace v těle svého rybího hostitele, např. druhy infikující ledviny a močový systém jsou blíže příbuzné.

4 Hostitelé

Většina zástupců myxosporeí žijí uvnitř sladkovodních a mořských ryb. 3 druhy byly zjištěny u bezčelistnatců, 35 druhů u paryb a zbytek u ryb. Nejen u ryb však mohou Myxosporea parazitovat, některé druhy byly zaznamenány u obojživelníků a plazů (Lom a Dyková, 2006). Dokonce byly zjištěny i u teplokrevných živočichů (Yokoyama et al., 2012).

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na rybí hostitele z brakických vod, ze kterých byly získány vzorky DNA.

4.1 *Scathophagus argus*

V českém překladu kaložrout skvrnitý. Jeho velikost je okolo 22 cm, tělo má zploštělé a typické jsou černé skvrny na kůži. Jejich výskyt převažuje v brakických vodách v jižní a jihovýchodní Asii, ale můžeme je najít i ve vodách okolo Japonska a Austrálie. Je to všežravec, ale živí se především řasami a rostlinnými částmi. Zajímavostí je, že ve žlázách hřbetních ploutví je obsažen jed, který je však slabý a není pro lidi nebezpečný.



Obrázek 1: *Scathophagus argus*

4.2 *Tetraodon nigroviridis*

Zvaný Čtverzubec zelený. Malá rybička o velikosti 10 cm. Původ rybičky je z Asie, především Srí lanka, Indonésie a Čína. Je to agresivní ryba, která se při ohrožení nafoukne a zvětší svůj objem.



Obrázek 2: *Tetraodon nigroviridis*

4.3 *Tetraodon biocellatus*

Také pod názvem čtverzubec skvrnoocasý. *Tetraodon nigroviridis* a *biocellatus* jsou velmi podobné rybičky. Jejich rozdílem je pouze ve velikosti kdy *T. biocellatus* je menší, měří okolo 5 cm. Původ této rybičky je také z Asie, především Indonésie, Indočína a Malajsie.



Obrázek 3: *Tetraodon biocellatus*

5 Tkáňová a orgánová specifická

Tkáňovou a orgánovou specifickou lze charakterizovat jako místo, kde se parazit vyvíjí do zralé spory. K tzv. presporogonickému vývoji, při kterém dochází k namnožení parazita, může docházet i v jiných tkáních během migrace tělem (např. druhy rodu *Sphaerospora* mají ve svém vývoji zahrnuto pomnožení v krevním řečišti). Rozvoj dalších stádií je spojen se specifickými tkáněmi hostitele. Jsou druhy Myxosporidia, která se vyvíjí pouze v některých specifických tkáních, např. tkáň epiteliální, svalová, chrupavčitá, pojivová, ale také uvnitř nervových buněk a cév. Obvykle se Myxosporidia rozvíjí v určité tkáni jednoho orgánu. Avšak není to tak vždy, jsou různé výjimky, které se vyvíjejí ve stejných tkáních, ale v různých orgánech (*Myxobolus gayerae*, *Myxobolus pfeifferi*) (Molnár et al., 2014).

Infikované mohou být různé orgány a části ryb. Většina známých druhů myxosporidií infikuje žábry (Molnár, 2002), protože z této lokalizace se snadno uvolňují spory do vodního prostředí (Eszterbauer, 2013). Některá Myxosporidia (*Myxobolus bramae*) rozvíjí svá plasmodia uvnitř vláknů žaber. Velmi vzácné je infikování kůže a v tomto případě se na hostiteli tato infekce velmi dobře pozoruje. *Sphaerospora molnari* způsobuje často velmi závažné infekce žaber a kůže u plůdku kapra obecného (Lom et al., 1983). Nejznámějším zástupcem, který působí infekce oka, je *Thelohanellus oculileucisci*, který infikuje sklivce (Lom et al., 1987). Dalším velmi častým napadeným orgánem jsou ledviny, kde se nejčastěji nacházejí spory a vývojová stadia různých druhů myxozoí (Molnár, 2007). Členové rodu *Sphaerospora* nejvíce obývají renální tubuly u sladkovodních ryb (Dyková, Lom, 1982). V ledvinách způsobují infekce i jiní parazité např. *Myxidium*, *Chloromyxum* a *Parvicapsula* u mořských ryb (Molnár, Eszterbauer, 2013). Několik myxosporidií vytváří plasmodia ve střevě. Plasmodia *Thelohanellus kitauei* způsobují otoky, které blokují lumen střeva u kapra obecného (Egusa, Nakajima, 1981). Mezi Myxosporidia rozvíjející se ve střevě mořských ryb se řadí *Enteromyxum leei* a *Enteromyxum fugu*. Infekce jater pomocí plasmodií je velmi vzácná a většinou bývá spojená s infekcí jiných orgánů. Na rozdíl od infekcí jater jsou infekce žlučových cest a žlučníku mnohem častější. *Myxidium*, *Zschokkella*, *Chloromyxum* a *Ceratomyxa* jsou nejčastěji pozorovány ve žlučníku, ve stěnách žlučovodů a parenchymu jater (Dyková a Lom 1988, 2007). Infekce nervového systému nejčastěji způsobují několik druhů *Myxobolus*, které byly popsány u lososovitých ryb (Urawa et al., 2009). Plasmodia druhů rodu *Kudoa*, především *Kudoa neurophila* a

Kudoa yasunagai, se vyvíjejí v nervových buňkách hostitele (Grossel et al., 2003; Zhang et al., 2010). Velmi zajímavým druhem Myxosporea je *Myxobolus cerebralis*, jeho malá plasmodia se rozvíjí v chrupavce lebky a obratlů, vytváří tlak na mozek a prodlouženou míchu a to ovlivňuje plavání hostitele. Další infekce mohou propuknout ve svalstvu nebo v oblastech těla, která nelze přesně lokalizovat (Molnár, Eszterbauer, 2010)

6 Cíle

Cíle práce:

- 1) Určit fylogenetické vztahy myxosporeí u ryb z brakických vod.
- 2) Osvojit si laboratorní metody: izolace DNA, PCR a gelovou elektroforézu.
- 3) Vytvořit fylogenetické stromy pomocí získaných dat.
- 4) Interpretovat výsledky.

7 Metodika

7.1 Materiál

V Laboratoři rybí protistologie, kde jsem prováděla celou metodiku, mi bylo poskytnuto 22 vzorků DNA. U 6 vzorků jsem prováděla izolaci DNA fenolchloroformovou metodou a 16 vzorků bylo předem vyizolováno pracovníky ústavu. Vzorky jsou z různých akvarijských rybiček objednané z internetové stránky www.aquarium.cz.

Tabulka 2: Seznam vyšetřovaných vzorků

Číslo vzorku	Akvarijská rybička, infikovaný orgán
1558	<i>Tetraodon biocellatus</i> , ledvina
1559	<i>Scathophagus argus</i> , moč. ústrojí
1560	<i>Scathophagus argus</i> , moč. ústrojí
1561	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , žluč
1269	<i>Scatophagus argus</i> , žluč
1270	<i>Scatophagus argus</i> , moč. ústrojí
1271	<i>Scatophagus argus</i> , žluč
1272	<i>Scatophagus argus</i> , žluč
1273	<i>Scatophagus argus</i> , moč. ústrojí
1274	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , žlučník
1275	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , ledvina
1276	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , žlučník
1277	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , ledvina
1278	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , žlučník
1279	<i>Tetraodon biocellatus</i> , ledvina
1280	<i>Tetraodon biocellatus</i> , ledvina
1619	<i>Tetraodon nigroviridis</i> moč. ústrojí
1620	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , stěna žlučníku
1621	<i>Tetraodon nigroviridis</i> , žlučník
1622	<i>Scatophagus argus</i> , ledvina
1623	<i>Scatophagus argus</i> , žábra
1624	<i>Scatophagus argus</i> , žluč

7.2 Izolace DNA

Fenolchloroformová metoda

- Proteiny v odebraných vzorcích byly lyzovány pomocí proteinázy K (4μl)
- Ke vzorkům byl přidán pufr TNES (400μl)
- Inkubace probíhala přes noc při 55°C
- Po inkubaci byl přidán fenol (400μl)

- 5 min bylo se zkumavkami lehce otáčeno
- Vzorky byly centrifugovány 5 min při 15 000ot/min
- Po stočení byly odebrány horní fáze do jiných zkumavek
- Do zkumavek dále byl přidán fenolchloroformizoamylalkohol (400μl)
- 5 min se opět promíchalo a 5 min centrifugovalo jako v předchozím kroku
- Opět byla odebrána horní fáze ze zkumavek
- Byl přidán chloroform (400μl)
- 5 min promíchat a 5 min centrifugovat
- Horní fáze se opět odebrala
- Poté bylo přidáno 1 ml čistého etanolu
- Důkladně se promíchaly všechny zkumavky a byly centrifugovány 10 min při maximálních otáčkách
- Dále byl ethanol slit a byl přidán 1 ml 70% ethanolu na promytí
- Zkumavky byly centrifugovány 5 min
- Ze zkumavek byla opatrně pomocí pipety odsáta tekutina a zbytek tekutiny, aby nedošlo k poškození DNA, se nechalo odpařit při pokojové teplotě
- Po vysušení pak bylo přidáno k peletu 50 μl vody

7.3 PCR – polymerázová řetězová reakce

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro PCR. Jako základní primery byly použity ERIB 1 a ERIB 10 v první PCR. Následovala tzv. nested PCR s myxospecifickými primery forward (MyxospecF) a reverse (MyxospecR). Při špatném navázání a málo výsledných produktů PCR jsme se pokusili amplifikovat DNA pomocí primerů Act1R a MyxgenF a 18e a 18q. Dále jsme kombinovali tyto primery 18e a Act1R a primery 18q a MyxgenF. Při každé PCR byly prováděny i negativní kontroly.

K vytvoření PCR směsi (master mixu) o objemu 25 μl do zkumavek se smíchalo:

10x PCR pufr	2,5 μl
dNTP	2 μl (10mM)
primer (ERIB 1)	1 μl (10μM)
primer (ERIB 10)	1 μl (10μM)
polymeráza	1 μl (1 jednotka)

PCR voda 16,5 μ l

DNA 1 μ l

PCR probíhala v termocycleru

1. 94°C 5 min
2. 94°C 1 min
3. 52°C 1 min
4. 72°C 2 min
5. 2. - 4. krok se 29x opakoval
6. 72°C 8 min

7.4 Gelová elektroforéza

Pro vizualizaci PCR produktů se používá gelová elektroforéza. Základem je připravit si 1% gel agarózy.

- 1% gel agarózy byl připraven z 50 ml pufru a 0,5g agaru
- Pufř s agarem byl rozpuštěn v mikrovlnné troubě a poté ochlazen pod tekoucí vodou za stálého promíchávání
- Dále byl připipetován ethidium bromid (EtBr) a opatrně se roztok promíchal
- Roztok se nalil do formy s jamkami a nechal se 20 min tuhnout
- Zatuhlý gel byl vyndán a vložen do elektroforetické vany
- Poté se do jamek pipetovaly vzorky, negativní kontrola a Ladder
- Elektroforéza probíhala při 80-100 V po dobu 20-30 min
- Výsledek elektroforézy se prohlížel pod přístrojem UV transluminátor

Fragmenty DNA, které měly správnou velikost, se pomocí skalpelu vyřízly z gelu a byly použity k další metodě.

7.5 Izolace DNA z gelu

Izolace byla prováděna pomocí kitu a návodu, gel/PCR DNA Fragments Kit (DF100, DF300)

- Vyříznutý gel s DNA byl vložen do mikrozkuvek o objemu 1,5 ml ke kterému bylo přidáno 500 μ l DF pufru
- Mikrozkuvky byly inkubovány při teplotě 55-60°C po dobu 10-15 min, kdy každé 2-3 min byly promíchány

- V kitu byly speciální zkumavky s kolonou, do kterých byl přenesen rozpuštěný gel s pufrem
- Zkumavky se daly centrifugovat při 14 000ot/ 30s
- Tekutina ve zkumavce se vylila a bylo přidáno 600 µl Wash pufru a nechalo se stát po dobu 1 min
- Pak byly zkumavky opět centrifugovány a předešlý krok se ještě jednou zopakoval
- Tekutina se opět vylila a zkumavky byly centrifugovány po dobu 3 min, aby bylo vše odstraněno
- Poté byla kolona vložena do mikrozukavky o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 40 µl PCR vody
- Centrifugace po dobu 2 min

7.6 Sekvenování

Po izolaci z gelu byl produkt PCR o objemu 9µl napipetován do mikrozukavky a byl přidán 1 µl příslušného primeru, který byl použit při PCR. Tyto vzorky byly zaslány do servisní laboratoře Seqme.

7.7 Fylogenetická analýza

Získané sekvence byly prohlíženy v programu Chromas. Program SeqMan umožnil zkompletovat všechny částečné sekvence do jednoho tzv contigu. Dále se vytvořil alignment ze získaných sekvencí a sekvencí z genové banky na stránkách www.blast.ncbi.nlm.nih.gov. Sekvence byly uspořádány (alignovány) v programu MAFT.

Fylogenetická analýza byla provedena 3 různými metodami. První metoda se nazývá metoda maximální pravděpodobnosti (ML – maximum likelihood), metoda maximální úspornosti (MP – maximum parsimony) a Bayesova analýza, což je metoda stanovení relativní pravděpodobnosti. Vytvořené stromy byly zobrazeny v programu Treeview a upravovány v programu Adobe Illustrator.

8 Výsledky

Celkem se podařilo získat SSU rDNA sekvence 10 druhů myxosporeí nalezených u tří druhů rybích hostitelů. Nejdelší částečné sekvence se podařilo získat pomocí primerů MyxospecF a MyxospecR a to u dvou druhů Myxosporeí: (*Caudomyxum* sp. a *Ceratomyxa scatophagi* a to 1007bp, respektive 966bp). Většina sekvencí měla délku v rozmezí 575 až 788, výjimku tvořila sekvence získaná u druhu *Ceratomyxa* sp., která měla délku pouze 299bp.

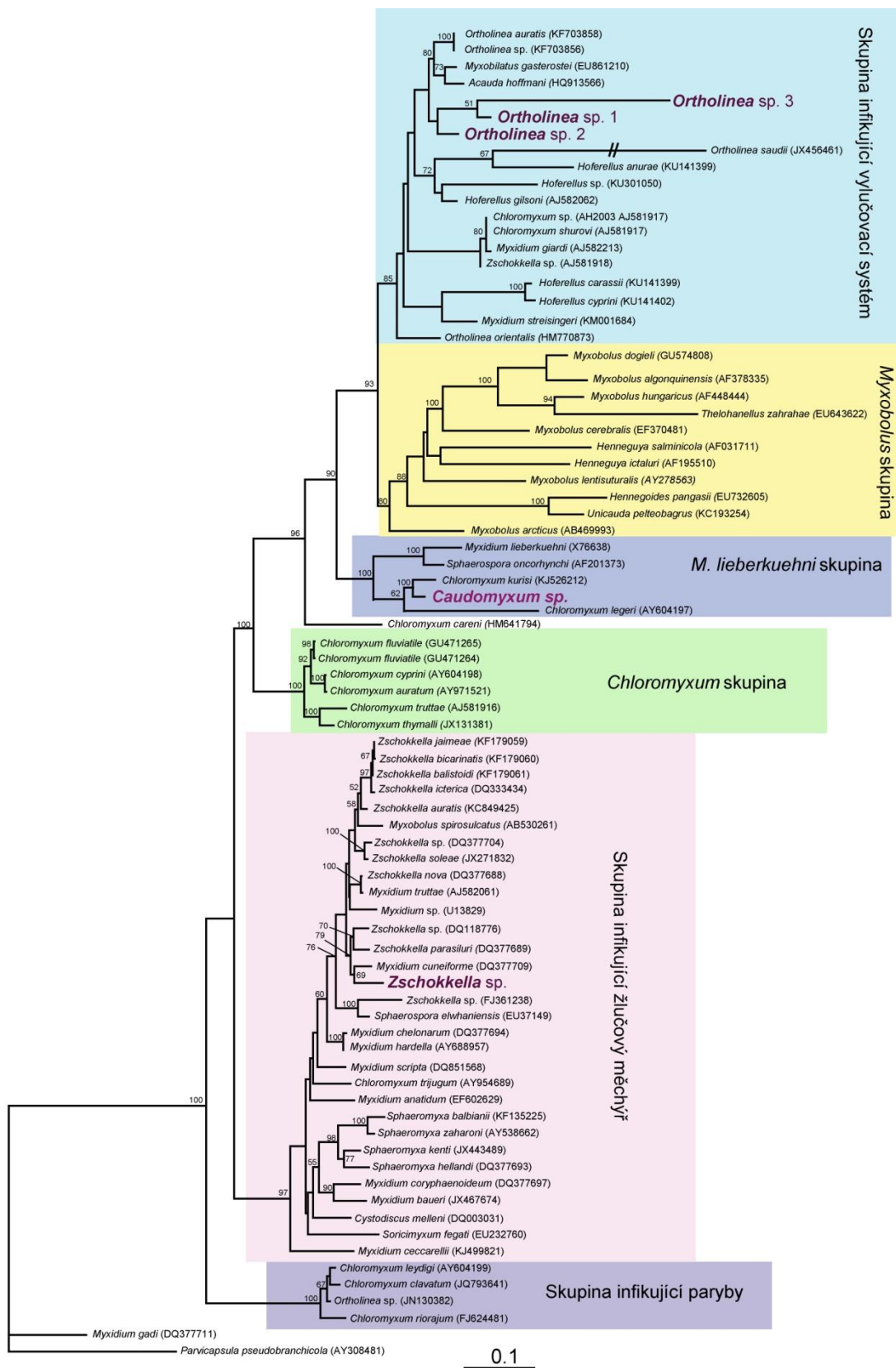
Tabulka 2: Získané sekvence

Hostitel	Myxosporea/kód	Získaná délka SSU rDNA (bp)
<i>Scathophagus argus</i>	<i>Ortholinea</i> sp. 1/ 1560	788
<i>Scathophagus argus</i>	<i>Ortholinea</i> sp. 2/ 1270	662
<i>Scathophagus argus</i>	<i>Zschokkella</i> sp./ 1272	592
<i>Scathophagus argus</i>	<i>Caudomyxum</i> sp./ 1273	1007
<i>Scathophagus argus</i>	<i>Ceratomyxa scatophagi</i> / 1624	966
<i>Tetraodon biocellatus</i>	Myxosporea sp. 3/ 1277	713
<i>Tetraodon biocellatus</i>	Myxosporea sp. 2/ 1279	607
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Myxosporea sp. 1/ 1274	575
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Ceratomyxa</i> sp. 2/ 1276	299
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Ortholinea</i> sp. 3/ 1619	715

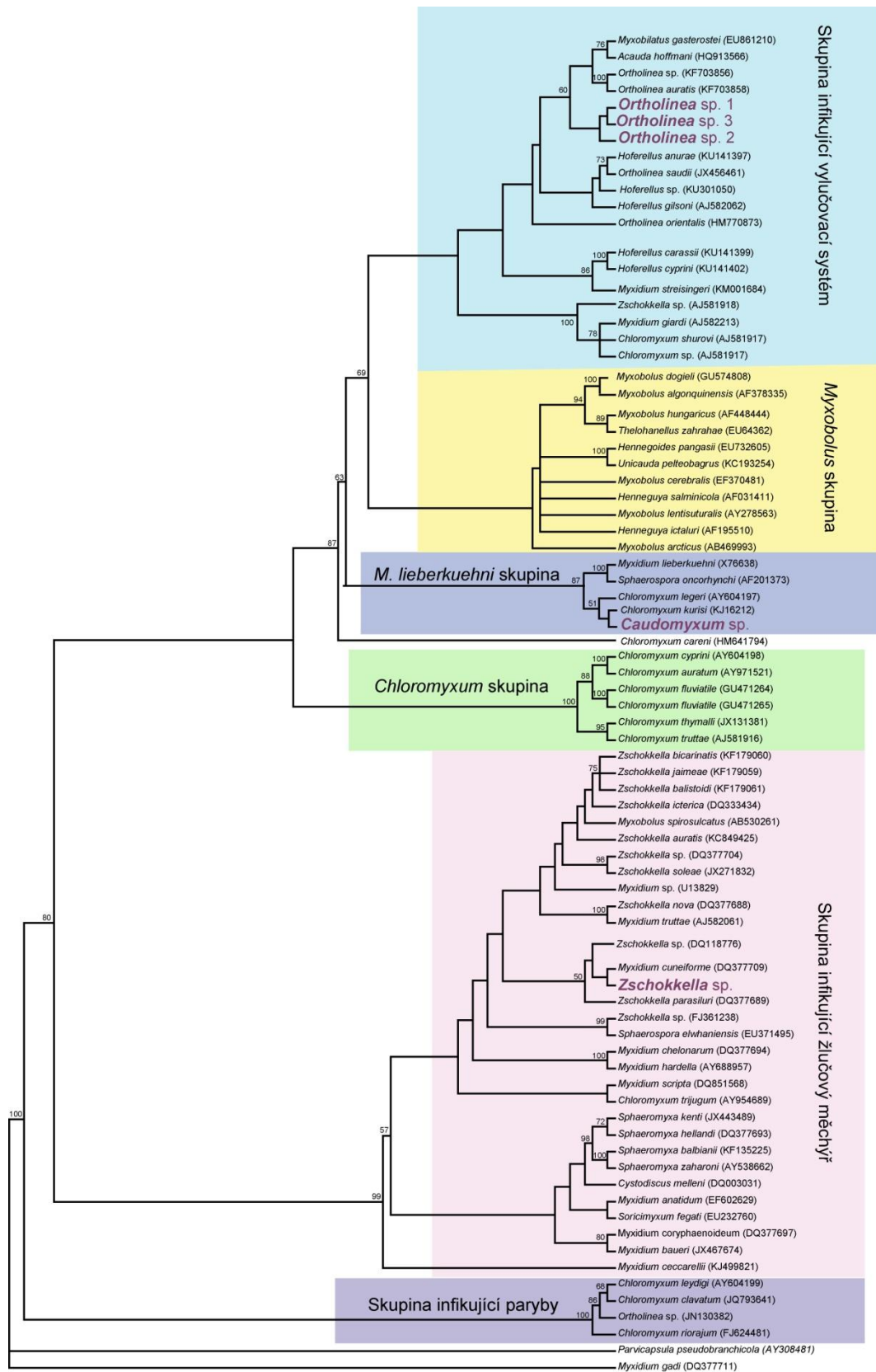
Všechny sekvence byly před vlastní fylogenetickou analýzou porovnány s databází sekvencí (GenBank). Tato předběžná analýza (BLASTn) odhalila příbuznost jednotlivých sekvencí se sladkovodní či mořskou linií myxosporeí. Na základě toho byly vytvořeny dva datasety sekvencí, které obsahovaly sekvence myxosporeí (nově získané sekvence z GenBank) ze sladkovodní respektive z mořské fylogenetické linie. Do sladkovodní linie spadají nově získané sekvence druhů *Caudomyxum* sp, *Ortholinea* sp. 1, *Ortholinea* sp. 2, *Ortholinea* sp. 3 a *Zschokkella* sp.. Do mořské linie spadají nově získané sekvence druhů *Ceratomyxa scatophagi*, *Ceratomyxa* sp., Myxosporea sp. 1, Myxosporea sp. 2 a Myxosporea sp. 3.

Pomocí fylogenetické analýzy byla odhalena pozice všech studovaných druhů myxosporeí v rámci fylogenetického stromu. Všechny tři zvolené metody fylogenetické

rekonstrukce se shodovaly ve výsledných topologiích, jak pro sladkovodní větev (Obr. 4 až 6), tak pro mořskou větev (Obr. 7 až 9).



Obr. 1: Fylogenetický strom sladkovodní linie, vytvořen metodou maximální pravděpodobnosti. Získané sekvence jsou zvýrazněny a zvětšeny. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů, nižší hodnoty podpory než 50 % se neuvádí. Dvojitě přeškrtnutá větev, značí zkrácení větve o polovinu.



Obr. 2: Fylogenetický strom sladkovodní linie. Vytvořen metodou maximální úspornosti. Získané sekvence jsou zvýrazněny a zvětšeny. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnoty bootstrapů, nižší hodnoty podpory než 50 % se neuvádí.



0.1

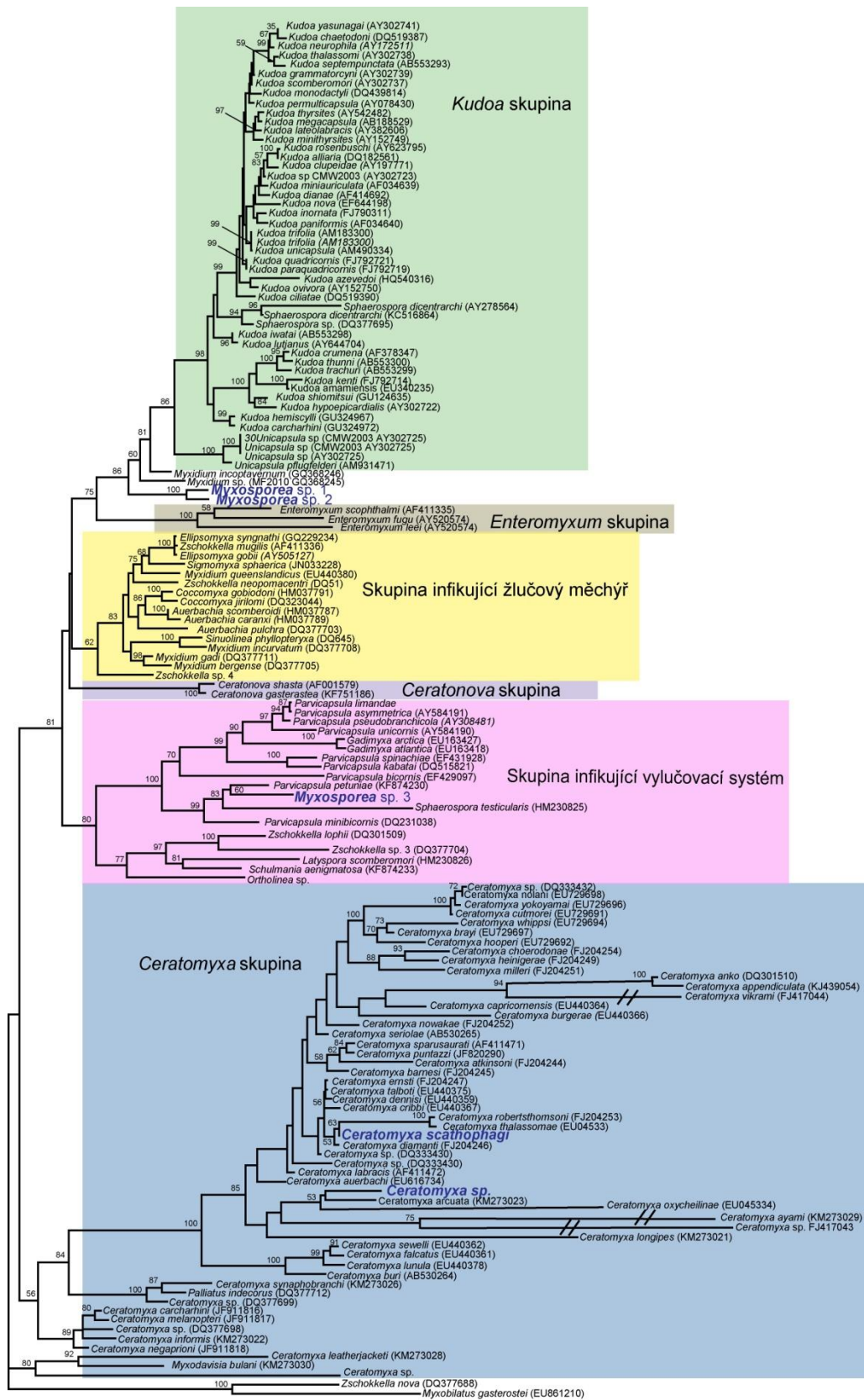
Obr. 3: Fylogenetický strom sladkovodní linie, vytvořen metodou relativní pravděpodobnosti. Získané sekvence jsou zvýrazněny a zvětšeny. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnoty bootstrapů, nižší hodnoty podpory než 0,5 se neuvádí. Dvojitě přeškrtnutá větev značí zkrácení větve o polovinu.

Sladkovodní linie myxosporeí se fylogeneticky dělí na skupiny druhů infikující vylučovací systém, skupinu zahrnující druhy rodu *Myxobolus*, skupinu označenou jako *M. lieberkuehni* skupina, *Chloromyxum* skupina, skupina infikující žlučový měchýř a skupina infikující paryby.

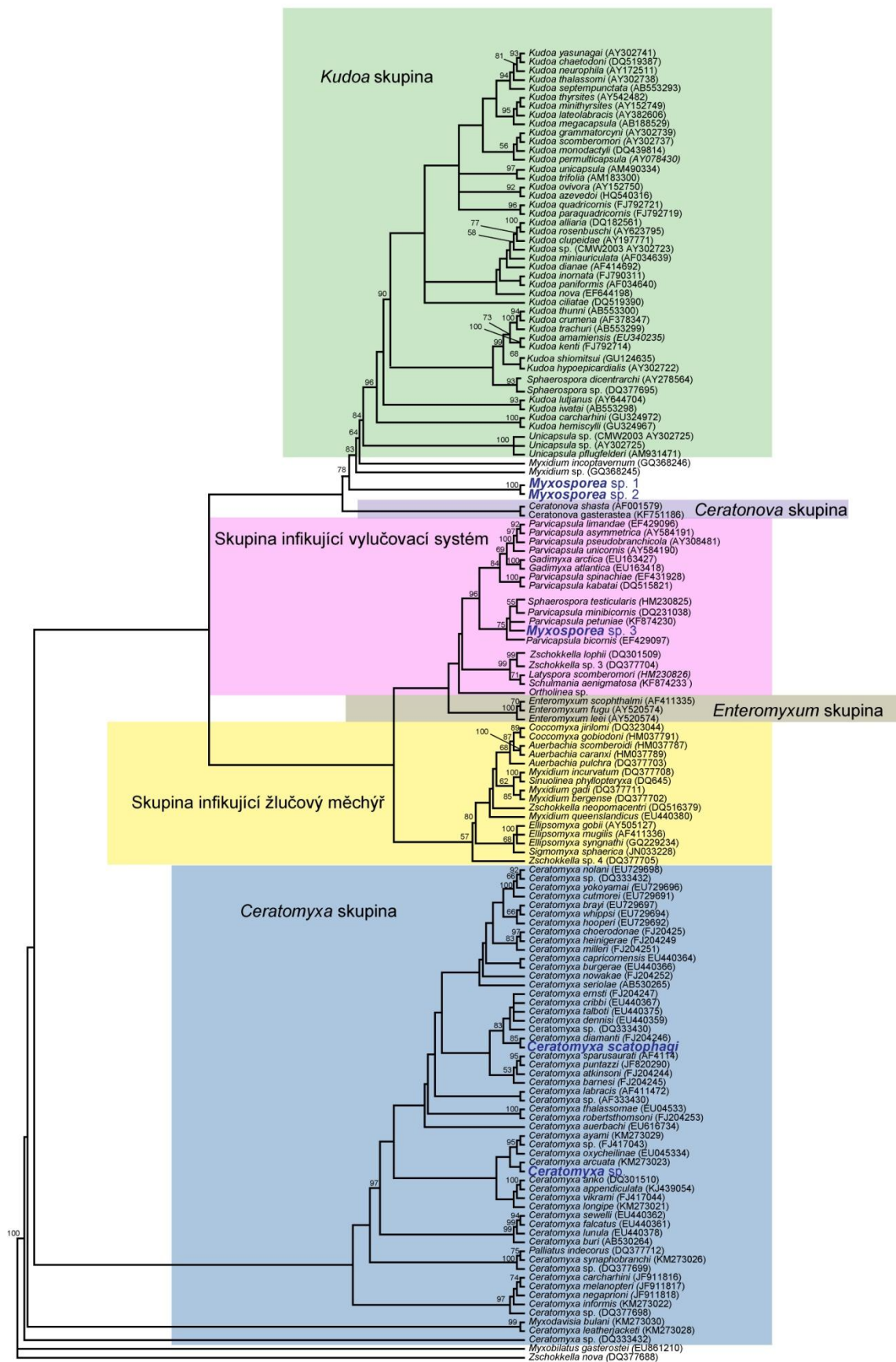
Ortholinea sp. 3, *Ortholinea* sp. 2 a *Ortholinea* sp. 1 se řadí do skupiny infikující vylučovací systém. Všechny tři druhy rodu *Ortholinea* k sobě blízce klastrují, avšak s velmi malou podporou uzlů ve všech třech analýzách. Nově získané sekvence druhů rodu *Ortholinea* klastrují společně k *Ortholinea auratis*, *Ortholinea* sp., *Myxobilatus gasterostei* a *Acauda hoffmani*.

Caudomyxum sp. se řadí do skupiny *Myxidium lieberkuehni*. Větví se ve všech analýzách s maximální podporou sestersky k *Chloromyxum kurisi* a s nízkou podporou se tato dvojice větví k *Chloromyxum legeri*. Tato celá větev se dále větví k druhu *Myxidium lieberkuehni* a k *Sphaerospora oncorhynchi*.

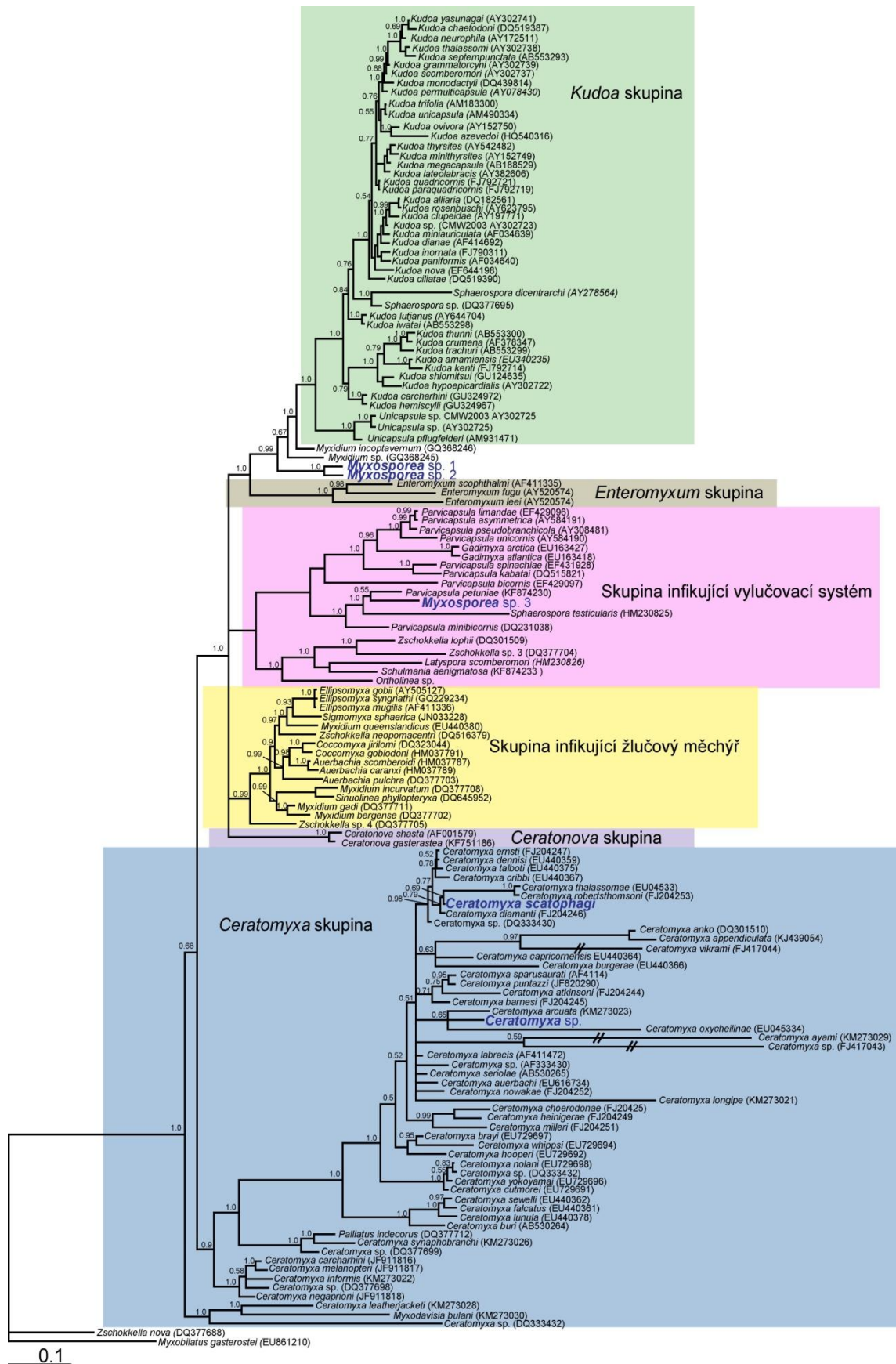
Zschokkella sp. získaná ze žlučového měchýře *Scathophagus argus* fylogeneticky spadá do skupiny infikující žlučový měchýř. Klastruje za střední podpory k *Mixidium cuneiforme* a dále vykazuje blízkou příbuznost k *Zschokkella* sp. (DQ118776) a *Zschokkella parasiluri*.



Obr. 4: Fylogenetický strom mořské linie, vytvořen metodou maximální pravděpodobnosti. Získané sekvence jsou zvýrazněny a zvětšeny. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů, nižší hodnoty podpory než 50 % se neuvádí. Dvojitě přeškrtnutá větev, značí zkrácení větve o polovinu.



Obr. 5: Fylogenetický strom sladkovodní linie. Vytvořen metodou maximální úspornosti. Získané sekvence jsou zvýrazněny a zvětšeny. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnoty bootstrapů, nižší hodnoty podpory než 50 % se neuvádí.



Obr. 6: Fylogenetický strom mořské linie, vytvořen metodou relativní pravděpodobnosti. Získané sekvence jsou zvýrazněny a zvětšeny. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnoty bootstrapů, nižší hodnoty podpory než 0,5 se neuvádí. Dvojitě přeškrtnutá větev značí zkrácení větve o polovinu.

Mořská linie myxosporeí se rozděluje na skupinu *Kudoa*, *Enteromyxum*, skupina infikující žlučový měchýř, *Ceratonova* skupina, skupina infikující vylučovací systém a skupina *Ceratomyxa*.

Ve všech 3 analýzách lze vidět, že *Myxosporea* sp. 1 a *Myxosporea* sp. 2 se sestersky větví za maximální podpory. Tyto 2 druhy dále klastrují k *Myxidium* sp. (GQ368245), *Myxidium incoptavernum* a k celé skupině *Kudoa*.

Myxosporea sp. 3 se řadí do skupiny infikující vylučovací systém. *Myxosporea* sp. 3 klastruje ve všech analýzách především k *Parvicapsula petuniae*, ale u Bayesovské analýzy se ještě větví k *Sphaerospora testicularis*. V analýze maximální úspornosti se *Myxosporea* sp. 3 větví nejen k *Parvicapsula petuniae*, ale i k *Parvicapsula bicornis*, *Parvicapsula minibicornis* a *Sphaerospora testicularis*.

Ceratomyxa scatophagi je nejvíce příbuzná k druhu *Ceratomyxa diamanti*. Ve dvou analýzách vyjadřuje blízkou příbuznost k druhům *Ceratomyxa robertsthomsoni* a *Ceratomyxa thalassomae*.

Ceratomyxa sp. i *Ceratomyxa scatophagi* spadají do skupiny zvané *Ceratomyxa*. *Ceratomyxa* sp. klastruje především k *Ceratomyxa arcuata*. Avšak ve 2 analýzách s nízkou podporou se větví k *Ceratomyxa oxycheilinae*.

9 Diskuze

Z celkového počtu 22 vzorků, které mi byly určeny ke zpracování, se podařilo u 10 druhů myxosporeí u ryb z brakických vod získat SSU rDNA sekvence. Vysvětlení pro opakované nezdary během PCR reakce může být několikeré. Myxosporea parazitují ve tkáních hostitele a často bývá infekce velmi nízká. I přes použití specifických primerů na amplifikaci myxosporeí se může stát, že PCR reakce neproběhne, protože koncentrace DNA parazita je pod kritickou hranicí záchytnosti PCR. Celková koncentrace DNA ve vzorku je ovšem dostatečná, ale jde o DNA hostitelskou. Pokusně jsem se snažila i DNA ředit, protože bylo popsáno, že vysoká koncentrace DNA může inhibovat průběh PCR reakce (Morata et al., 1998). Neúspěch v amplifikaci mohl být způsoben i faktem, kdy přestože byla nákaza myxosporeí pozorována ve světelném mikroskopu, část tkáně vybraná pro DNA analýzu nemusela tohoto parazita obsahovat. Myxosporea mají mikroskopickou velikost a není možné vždy spolehlivě zaručit přítomnost buněk parazita ve všech vzorcích. A v neposlední řadě se nemůže vyloučit možnost toho, že se mohlo jednat o Myxosporea, které jsou fylogeneticky vzdálené všem dosud popsaným myxosporeím s určenou DNA sekvencí SSU rDNA markeru a proto se mohou lišit v sekvenčním úseku zvoleném pro nasedání specifických myxosporeových primerů, které jsou velmi důležité pro úspěšnou amplifikaci.

Přes obtíže při PCR amplifikaci se podařilo získat celkem vysoký počet nových sekvencí, které jsou nezbytné při dokumentaci a popisu nových druhů myxosporeí (Fiala et al., 2015). Potvrdil se předpoklad, že ryby žijící ve smíšených (brakických) vodách můžou být parazitovány myxosporei z obou (mořské a sladkovodní) vývojových linií. Nejvíce parazitovaný druh *Scatophagus argus* obsahoval čtyři druhy, které se fylogeneticky větví u sladkovodní větve a jeden druh (*Ceratomyxa scatophagi*), který patří do typického mořského rodu. Naopak čtverzubec *Tetraodon biocellatus* byl parazitován v obou případech zástupcem myxosporeí z mořské skupiny. Příbuzný hostitel *T. nigroviridis* také hostil dvě mořské Myxosporea ale i jeden druh ze sladkovodní větve (*Ortholinea* sp. 3). Přestože druhy rodu *Ortholinea* se větví v rámci sladkovodní linie, právě tyto druhy tvoří výjimku a můžou být i u typicky mořských ryb (Rangel et al., 2014).

Ani jedna ze získaných sekvencí se neshodovala se sekvencemi, které jsou dostupné v genové bance (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Předložená práce obohatila proto spektrum myxosporeových SSU rDNA sekvencí. Dokonce v případě druhu

Caudomyxum sp. je tato sekvence první získanou sekvencí rodu *Caudomyxum*. Fylogenetickou analýzou jsme vyjasnili evoluční původ tohoto druhu (rodu). *Caudomyxum* je morfologicky velmi podobné druhům rodu *Chloromyxum* a liší se v přítomnosti ocasních přívěšků (Lom a Dyková 2006) a tato morfologická podobnost byla potvrzena fylogenetickou analýzou v této bakalářské práci. *Caudomyxum* sp. je blízce příbuzné druhům *Chloromyxum kurisi* a *C. legeri*, které stejně jako *Caudomyxum* sp. parazituje v ledvinách ryb.

Zajímavé je fylogenetické postavení druhů označených *Myxosporea* sp. 1 a *Myxosporea* sp. 2. Fylogenetické analýzy odhalily blízkou příbuznost těchto druhů a především to, že tyto druhy nenáleží do žádné existující skupiny myxosporeí a vytváří samostatnou linii větvící se mezi linií *Ceratonova shasta* a skupinou označenou *Kudoa*. V nedávné době byla na podobném místě ve fylogenetickém stromu myxozoí objeven druh *Myxidium incomptavernum* a další nepopsaný druh r. *Myxidium* (Freeman a Shinn, 2011). *Myxosporea* sp. 1 je parazit, který infikoval žlučník u ryby *Tetraodon nigroviridis*. *Myxosporea* sp. 2 parazitoval u ryby *Tetraodon biocellatus* v ledvinách. Takovýto příbuzenský vztah je neobvyklý, kdy dva druhy s odlišnou lokalizací v hostiteli vykazují velmi blízkou příbuznost. Takovýto výsledek je v rozporu s většinou fylogenetických vztahů myxosporeí (Fiala, 2006), ve kterých se Myxozoa větví do skupin se stejnou hostitelskou lokalizací.

Myxosporea sp. 3 z ledvin *Tetraodon nigroviridis* klastruje k *Parvicapsula petuniae*, která byla popsána z močového měchýře u ryby *Gymnocanthus tricuspis* též zvané vranka severní z Arktické oblasti (Kodádková et al., 2014). *Myxosporea* sp. 3 je také dále blízce příbuzná k *Sphaerospora testicularis* a *Parvicapsula minibicornis*. Prvně jmenovaný druh byl objeven u ryby *Dicentrarchus labrax* (Sitjà-Bobadilla a Alvarez-Pellitero, 1990) neboli morčák evropský. Jeho název *testicularis* je odvozeno od *testes*, protože infikuje varlata ryb (Sitja–Bobadila a Alvarez-Pellitero, 1993a) a působí i ekonomické ztráty těchto chovných ryb. *P. minibicornis* je také známý patogen lososovitých ryb napadající jejich ledviny (Kent et al., 1997).

Ceratomyxa je druhý největší popsáný rod myxozoí s více než 260 druhy. Nejvíce druhů rodu *Ceratomyxa* bylo zjištěno u ryb, které infikovaly žlučník. (Moser et al., 1989; Gunter, Adlard 2008, 2009; Heiniger et al., 2008; Gunter et al., 2009). V bakalářské práci jsem získala SSU rDNA 2 druhů tohoto rodu. Prvním stanoveným

druhem je *Ceratomyxa scatophagi*, která parazituje u ryby *Scatophagus argus* ve žlučníku. Druhým stanoveným druhem je *Ceratomyxa* sp., která je blíže příbuzná k *Ceratomyxa arcuata*, která nejčastěji také infikuje žlučník. Potvrdilo se tedy, že druhy rodu *Ceratomyxa* nejčastěji infikující žlučník jsou příbuzné k ostatním druhům svého rodu a fylogeneticky vytváří jednu společnou skupinu.

Jako první předchůdce myxozoi (obou skupin Malacosporea i Myxosporea) byl stanoven sladkovodní druh, který během evoluce se rozšířil do mořského prostředí a dal vzniknout dnešní skupině Myxosporea. Z tohoto důvodu se předpokládá, že byl prvním prapředkem myxosporeí mořský druh. Přičemž sladkovodní prostředí jako hostitelské prostředí se vyskytlo třikrát nezávisle (Fiala a Bartošová, 2010). Některé původní sladkovodní druhy se tak zpětně ocitly v mořském prostředí později v průběhu evoluce. Typický navrátilcec byl předek rodu *Sphaeromyxa*, diverzifikované skupiny mořských myxosporeí. Je možné, že určitou úlohu v evoluci myxosporeí, ve které se vyskytly tyto změny životního prostředí, hrály druhy brakických ryb, které mohly svým migračním pohybem přenášet původní sladkovodní Myxosporea do mořského prostředí, která se pak zde adaptovala, napadla nové druhy ryb, ve kterých se izolovala a vytvořila nové navzájem příbuzné druhy.

10 Závěr

Bylo prokázáno, že *Myxosporea* parazitující u ryb z brakických vod, se fylogeneticky řadí jak do mořské, tak sladkovodní linie. Z 22 poskytnutých vzorků se podařilo celkem osekvenovat 10 zástupců *Myxosporea*. Pomocí fylogenetické analýzy byla zjištěna jejich přesná pozice ve fylogenetickém stromu na základě SSU rDNA. Byla zjištěna velmi blízká příbuznost druhů *Ortholinea* sp. 1, *Ortholinea* sp. 2 a *Ortholinea* sp. 3 ze dvou různých hostitelů. Druh *Caudomyxum* sp. se větvil s druhy rodu *Chloromyxum*, se kterými má společný počet pólových váčků. Je to vůbec první sekvence zástupce tohoto rodu a tedy první informace o jeho fylogenetické pozici. *Zschokkella* sp. ze žlučového měchýře *Scatophagus argus* se nachází uvnitř skupiny s druhy se stejnou lokalizací v rybě. *Myxosporea* sp. 1 a *Myxosporea* sp. 2 překvapivě vytváří samostatnou fylogenetickou linii v blízkosti početné skupiny druhů rodu *Kudoa*. Další neidentifikovaný druh označený jako *Myxosporea* sp. 3 se větvil v rámci druhů infikující močový systém ryb. Dva druhy identifikované do rodu *Ceratomyxa* (*Ceratomyxa scatophagi* a *Ceratomyxa* sp.) se větvil spolu s ostatními zástupci tohoto rodu v rámci mořské linie.

Vypracováním této bakalářské práce, jsem si osvojila metody izolace DNA, PCR a gelovou elektroforézu a obohatila svoje znalosti v parazitologii. Naučila jsem se zacházet s programy, které byly potřeba pro rekonstrukci a úpravu fylogenetických stromů.

11 Zdroje

ATKINSON, D. S., BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ, P., WHIPPS, M. CH., BARTHOLOMEW J. L., 2015. Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Chapter 6: Approaches for Characterising Myxozoan Species, Springer

BARTOŠOVÁ, P., FIALA, I., JIRKŮ, M., CINKOVÁ, M., CAFFARA, M., FIORAVANTI, M. L., ATKINSON, S. D., BARTHOLOMEW, J. L., HOLZER, A. S., 2013. *Sphaerospora* sensu stricto: Taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (68): 93–10

CANNING, E. U., CURRY, A., FEIST, S. W., LONGSHAW, M., OKAMURA, B., 2010. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, (47): 456–468

EGUSA, NAKAJIMA, 1981. A new myxozoa *Thelohanellus kitauei*: the cause of intestinal giant cystic disease of carp, *Fish Pathology*, 15: 213–218.

EIRAS, J. C., ZHANG, J. Y., MOLNAR, K., 2014. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology* (88): 11–36

ESZTERBAUER, E., ATKINSON, D. S., DIAMANT, A., MORRIS, D., EL – MATBOULI, M., HARTIKAINEN, H., 2015. Evolution, Ecology and Development, Chapter 10: Myxozoan Life Cycles: Practical Approaches and Insights, Springer

ESZTERBAUER, E., SIPOS, D., FORRÓ, B., BARTOŠOVÁ, P., HOLZER A., 2013. Molecular characterization of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa), the agent of gill sphaerosporosis in common carp *Cyprinus carpio carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104: 59–67.

FEIST, S. W., LONGSHAW, M., 2006. *Fish diseases and disorders: Phylum Myxozoa*. 2nd ed. Cambridge, MA: CABI Pub., s. 230–243.

FIALA, I. 2006. The phylogeny of Myxosporidia (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal of 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(1), 228-238, DOI: 10.1186/1471-2148-10-228.
- FIALA, I., BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ, P., OKAMURA, B., HARTIKAINEN, H., 2015. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, Chapter 4: Adaptive radiation and Evolution Within the Myxozoa, Springer.
- FIALA, I., BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ, P., WHIPPS, C., 2015. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, Chapter 5: Taxonomy, systematics and phylogeny within the Myxozoa, Springer.
- FREEMAN, M. A., SHINN, A. P., 2011. Myxosporean hyperparasites of gill monogeneans are basal to the Multivalvulida. *Parasites & Vectors*, Vol. 4, 220.
- GRUHL A., OKAMURA B., 2015. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, Chapter 9: Tissue Characteristics and Development in Myxozoa, Springer.
- GUNTER, N. L., BURGER, M. M. A., ADLARD, R. D., 2010. Morphometric and molecular characterisation of four new *Ceratomyxa* species (Myxosporidia: Bivalvulida: Ceratomyxidae) from fishes off Lizard Island, Australia, *Folia Parasitologica*, (57): 1–10
- HOFFMAN, G. L., 1999. *Parasites of North American freshwater fishes*. 2nd ed. Ithaca, N.Y.: Comstock Publishing Associates, pp. 576.
- HOLLAND, J. W., OKAMURA, B., HARTIKAINEN, H., A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. 2010. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, (278): 546–553.
- KALAVATI, C., NANDI, N. C., 2007. *Handbook on Myxosporean Parasites of Indian Fishes*. Director, Zoot. Surv. India, Kolkata, pp 294.
- KALLERT, D. M., ESZTERBAUER, E., EL-MATBOULI, M., ERSEUS, C., HAAS, W., 2005. The life cycle of *Henneguya nuesslini* Schuberg & Schroder, 1905 (Myxozoa) involves a triactinomyxon-type actinospore. *Journal of Fish Diseases*, (28): 71–79, ISSN 01407775.

- KENT, M. L., WHITAKER, D. J., DAWE, S. C., 1997. *Parvicapsula minibicornis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporaea) from the kidney of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from British Columbia, Canada. *Journal of Parasitology*, (83): 1153–1156.
- KODÁDKOVÁ, A., DYKOVÁ I., TYML T., DITRICH O., FIALA I., 2014. Myxozoa in high Arctic: Survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, (3): 41–56
- LOM, J., 1990. Phylum Myxozoa. In *Handbook of Protoctista* (ed. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M. and Chapman, D. J.), Jones and Bartlett Publishers, Boston, pp. 36–52.
- LOM, J., DYKOVÁ, I., 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53: 1–36.
- MOLNÁR, K., ESZTERBAUER, E., 2015. Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Chapter 16: Specificity of Infection Sites in Vertebrate Hosts, Springer
- MORAN, J. D. W., WHITAKER, D. J., KENT, M. L., 1999. A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture* (172): 163–196, DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00437-2
- MORATA, P., QUEIPO-ORTUNO, M. I., DE DIOS COLMENERO, J., 1998. Strategy for Optimizing DNA Amplification in a Peripheral Blood PCR Assay Used for Diagnosis of Human Brucellosis, *Journal of Clinical Microbiology*, (36): 2443–2446.
- MORRIS, D. J., 2012. A new model for myxosporean (Myxozoa) development explains the endogenous budding phenomenon, the nature of cell within cell life stages and evolution of parasitism from a cnidarian ancestor. *International Journal for Parasitology* , (42): 829–840 ISSN 00207519
- OKAMURA, B., GRUHL, A., 2015. Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Chapter 2: Myxozoan Affinities and Route to Endoparasitism, Springer
- OKAMURA, B., GRUHL, A., REFT, J. A., 2015. Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Chapter 3: Cnidarian Origins of the Myxozoa, Springer

OKAMURA, B., GRUHL, A., BARTHOLOMEW, J. L., 2015. Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Chapter 1: An Introduction to Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Springer

PELLITERO, P. A., SITJA-BOBADILLA, A., 1993. Pathology of Myxosporea in marine fish culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, (17): 229–238.

RANGEL, L. F., ROCHA, S., BORKHANUDDIN, M. H., CECH, G., CASTRO, R., CASAL, G., AZEVEDO, C., SEVERINO, R., SZÉKELY, C., SANTOS, M. J., 2014. *Ortholinea auratae* n. sp. (Myxozoa, Ortholineidae) infecting the urinary bladder of the gilthead seabream *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae), in a Portuguese fish farm. *Parasitology Research*, (113): 3427–3437 DOI: 10.1007/s00436-014-4008-4. ISSN 09320113

SITJA-BOBADILLA, A., ALVAREZ-PELLITERO P., 1990. *Sphaerospora testicularis* sp. nov. (Myxosporea: Sphaerosporidae) in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish Mediterranean area. *Journal of Fish Diseases*, (13): 193–203, ISSN 01407775.

SITJA-BOBADILLA A., ALVAREZ-PELLITERO P. 1993. Pathologic effects of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà- Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitjà-Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: a light and electron microscopy study. *Parasitology Research*, (79): 119-129.

TOPS, S., OKAMURA, B., 2005. Malacosporean parasites (Myxozoa, Malacosporea) of freshwater bryozoans (Bryozoa, Phylactolaemata): a review, *Landesmuseum neue Serie* (28): 287-298

TUCKER, C. S, HARGREAVES A. J, 2004. *Biology and culture of channel catfish*. Boston: Elsevier, pp. 686. ISBN 04-445-0576-8.

VOLF, P. a HORÁK P., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, pp. 318. ISBN 9788073870089

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.

YOKOYAMA, H., GRABNER, D., SHIRAKASHI, S., 2012. Transmission Biology of the Myxozoa, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), In Tech, pp 42 ISBN: 978-953-51-0497-1

Accessing life through Science. Geneaid: gel/PCR DNA Fragments Kit (DF100, DF300 [online]. [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://www.geneaid.com/products/gel-extraction/gel-extraction-kit>

Atlas akvarijských ryb. Váš akvaristický portál [online]. [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <https://rybicky.net/atlasryb/cesky>

Seznam zkratk:

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
SSU rDNA	rDNA malé ribozomální podjednotky
SSU rRNA	rRNA malé ribozomální podjednotky
PCR	Polymerázová řetězová reakce