

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity

Bakalářská práce:

**Fylogenetické vztahy druhů čeledi Ceratomyxidae  
(Myxozoa)**



Vypracovala: Marie Hlavničková

Školitel: RNDr. Ivan Fiala, PhD.

České Budějovice 2010

Marie Hlavničková (2010): Fylogenetické vztahy druhů čeledi Ceratomyxidae (Myxozoa) [Phylogenetic relationships of species of the family Ceratomyxidae (Myxozoa) Bc. Thesis, in Czech] Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

SSU rDNA sequences of 11 *Ceratomyxa* samples were obtained and consequent sequence comparison inferred 6 different species including the type species of the genus *Ceratomyxa*. Phylogenetic position of these species was computed by three methods of phylogenetic reconstruction – sequence similarity, phylogenetic position, host preference and geographic distribution was discussed.

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

Marie Hlavničková

.....

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ivanu Fialovi, PhD. Za odborné vedení a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za morální podporu.

## OBSAH:

1 Úvod .....	1
1.2 Životní cyklus.....	2
1.3 Vývoj myxospor v obratlovci (na modelu <i>Myxobolus cerebralis</i> ).....	3
1.3.1 Presporogenní fáze .....	3
1.3.2 Sporogenní fáze.....	3
1.4 Vývoj aktinospor uvnitř kroužkovce (na modelu <i>Myxobolus cerebralis</i> ).....	3
1.4.1 Schizogonie .....	3
1.4.2 Gametogonie .....	4
1.4.3 Sporogonie .....	4
1.5 Hostitelé .....	4
1.6 Klasifikace a fylogeneze .....	5
1.7.1 Rod <i>Ceratomyxa</i> Thélohan, 1892.....	7
1.7.2 Rod <i>Leptotheca</i> Thélohan, 1895 .....	7
1.7.3 Rod <i>Palliatius</i> Shulman, Kovaleva a Dubina, 1979 .....	8
2 Cíle práce .....	9
3 Metodika .....	10
3.1 PCR .....	10
3.2 Nested PCR .....	11
3.3 Gelová elektroforéza .....	11
3.4 Izolace PCR produktu .....	11
3.5 Ligace.....	12
3.6 Transformace.....	12
3.7 PCR screening.....	12
3.8 Vizualizace pomocí agarózové elektroforézy .....	13
3.9 Namnožení plazmidu.....	13
3.10 Izolace plazmidu .....	14

3.11 Sekvenace.....	14
3.12 Fylogenetická analýza.....	14
4 Materiál.....	16
5 Výsledky.....	22
6 Diskuze.....	27
9 Závěr.....	30
8 Literatura.....	31

# 1 Úvod

Myxozoa jsou mikroskopičtí metazoární parazité s širokým hostitelským spektrem. V současnosti je popsáno více jak 2200 druhů řazených do 60 rodů (Lom a Dyková 2006). Převážná většina patří do skupiny Myxosporea (Bütschli 1881), pouze tři popsané druhy jsou řazeny do dvou rodů skupiny Malacosporea (Canning, Curry, Feist, Longshaw a Okamura 2000). Myxosporea mají komplexní životní cyklus složený ze dvou fází: myxosporeové (u obratlovců zejména u ryb) a actinosporeové (u oligochétů). Většina myxosporeí nemá na svého hostitele patogenní vliv. V akvakulturách je známo několik druhů, které působí znatelné úhyny ryb, např. *Myxobolus cerebralis* (Hedrick a kol. 1998).

Až do počátku 90. let 20. století byla Myxozoa považována za prvoky. Fylogenetická analýza první SSU rDNA sekvence myxozoi (Smothers a kol. 1994) potvrdila hypotézu, že Myxozoa jsou mnohobuněčné organizmy (Štolc 1899, Weill 1938) a umístila Myxozoa do metazoi. SSU rDNA údaje neumožnily najít správnou pozici myxozoi uvnitř taxonu Metazoa. Zjištění, že *Buddenbrockia plumatellae* (živočich podobný červu) je druh myxozoi, vedlo k nalezení původu myxozoi (Monteiro a kol. 2002). Analýza SSU rDNA tohoto enigmatického červa ukázala blízkou příbuznost s *Tetracapsuloides bryosalmonae*, proto byla *B. plumatellae* přiřazena k malacosporeím, což je sesterská skupina myxosporeí. V důsledku toho bylo předpokládáno, že Myxozoa patří mezi Bilateria nebo jejich blízké příbuzné (Monteiro a kol. 2002). Nicméně nedávná morfologická studie *B. plumatellae* (Morris a Adams 2007) a fylogenetická analýza, založená na sekvenci několika genů kodujících proteiny (Jiménez-Guri a kol. 2007), vyloučily bilaterní původ *B. plumatellae* a naznačily, že *B. plumatellae* se větví uvnitř kladu žahavců.

Myxozoa jsou parazité charakterizovaní sporami, které jsou složené z několika buněk přeměněných v 2 až 7 chlopní spory, 1 až 2 ameboidních infekčních zárodků (sporoplasmy), a 2 a více pólových váčků. Pólové váčky obsahují vymrštitelná vlákna, která mají zakotvovací funkci. Mitochondrie mají tubulární, plochý nebo diskovitý tvar. Typický rys pro Myxozoa je stádium „buňka v buňce“, kdy endogenně produkované buňky přetrvávají v primárních (mateřských) buňkách. Myxosporea nemají centrioly a mají uzavřenou mitózu. Vegetativní stádium je u malacosporeí ve formě primitivních bilaterních organismů, které jsou podobné

červům, nebo ve formě uzavřených vaků. U myxosporeí je vegetativní stádium redukováno na mnohobuněčné, často améboidní plasmodium, které produkuje spory (Lom a Dyková 1992).

U zástupců třídy Myxosporea jsou vegetativní stádia coelozoická nebo histozoická. Coelozoická se vyskytují v tělních dutinách jako je žlučový měchýř, žlučovody, močové ústrojí až po ledvinná tělíška. Jsou buď přichycená na stěnách, nebo volně v tekutině uvnitř dutiny. Výjimečně obsazují např. i osrdečník. Histozoická vegetativní stádia se vyskytují v různých tkáních, většinou intercelulárně (jsou vklíněny mezi tkáňové buňky), ale někdy i intracelulárně. Coelozoická Myxozoa jsou považovány za evolučně primitivnější než histozoická (Kent a kol. 2001).

Myxosporové spory mohou mít různý tvar a strukturu, mají různé výběžky spory a počet pólových váčků (Lom a Dyková 1992). Rozměr spor je většinou 10 až 20  $\mu\text{m}$ , výjimkou je např. *Myxidium giganterium*, kde jsou spory až 98  $\mu\text{m}$  dlouhé. Vegetativní stadia mají různou velikost a tvar. Makroskopická plazmodia jsou až několik milimetrů velká, obsahují mnoho jader a specializované buňky a produkují masu spor. Tyto plasmodia se mohou obalovat buňkami pojivové tkáně a objevují se jako bělavé „cysty“ často zřejmé, když jsou uloženy pod povrchem žaber nebo ve tkáních. Některé typy malých plasmodií, kolem 10  $\mu\text{m}$  velké, produkují pouze jednu nebo dvě spory. Malá plasmodia mohou prostupovat tkáň způsobem, který se označuje infiltrace difuzí. Histozoická plasmodia jsou nepohyblivá, zakulacená a zapouzdřená v tkáni hostitele. Coelozoická plasmodia mohou mít pohyblivá pseudopodia. U některých druhů, např. u druhů rodu *Kudoa*, může celý vývojový cyklus probíhat uvnitř buněk příčně pruhovaného svalstva. U ostatních jsou ranná intracelulární stádia následována intercelulárními nebo coelozoickými stádii.

## 1.2 Životní cyklus

Životní cyklus myxosporeí sestává z myxosporová fáze a aktinosporová fáze. Myxosporová fáze končí produkcí myxospor, probíhá u nižších obratlovců, běžně u ryb, méně často u obojživelníků a plazů, výjimečně u ptáků a savců. Aktinosporová fáze zahrnující pohlavní proces, končí produkcí aktinospor, probíhá převážně u kroužkovců (výjimečně u sumýšovců). Vývojový cyklus popsán níže byl poprvé detailně popsán u *Myxobolus cerebralis* (Wolf a Markiw 1984). El-Matbouli a Hoffmann (1998) popsali také později actinosporeovou fázi vývoje *M. cerebralis* v nítěnce (*Tubifex tubifex*). Kompletní životní cyklus je znám u 32 druhů

ze sladkovodního prostředí, zatímco z mořského prostředí byl popsán jen jeden životní cyklus u druhu *Ellipsomyxa gobii* (Køie a kol. 2004).

### **1.3 Vývoj myxospor v obratlovci (na modelu *Myxobolus cerebralis*)**

#### 1.3.1 Presporogenní fáze

Aktinospory vypuštěné z kroužkovce do vody náhodně potkávají hostitele (rybu). Po kontaktu s kožním nebo žaberním epitelem pólové vřetelky vystřelí pólová vlákna, která se přichycují na povrch hostitele. Chlopně spory se otevřou a sporoplasma vstupuje do kůže, obvykle přes kožní pór. Sporoplasma intercelulárně migruje v pokožce nebo v žaberním epitelu. Sporoplasma se po určité době vnitřně dělí a vznikají vnitřní sekundární buňky uvnitř primární buňky. Poté dochází k rychlé meióze sekundárních buněk a ty dále prodělají endogenní dělení, kdy vznikají dvojité buňky (cell- doublets) s obalovými (primárními) buňkami a vnitřními (sekundárními) buňkami. Poté tyto dvojité buňky protrhávají membránu původních primárních buněk a vstupují do cytoplasmu hostitelské buňky. Tam jsou některé zničeny. Ostatní, které jsou volné, pronikají plasmalemou hostitelské buňky vstupují do extracelulárního prostoru, kde pronikají do okolních epiteliálních buněk nebo migrují hlouběji do kožních a podkožních vrstev a pronikají do dalších hostitelských buněk, kde znovu opakují cyklus. Po několika dnech buňky migrují intercelulárně do nervových tkání, kde pokračuje množení dvojitých buněk. Pozdější parazitární stádia mohou být nalezena v míše a mozku.

#### 1.3.2 Sporogenní fáze

Primární buňky rostou a jejich jádra se dělí za vzniku mnoha vegetativních jadérek. Sekundární buňky se dělí za vzniku generativních buněk. Takto vzniklá plasmodia se můžou rozpadat a z generativních buněk vznikají nová plasmodia. Buňka opakuje cyklus vzniku plasmodií nebo se spojuje s jinou buňkou, tak se vytváří pericytární obal a vnitřní utváření sporogenních buněk. V tomto útvaru vzniká pansporoblast se spory. Myxospory po uvolnění z rybího hostitele infikují kroužkovce.

### **1.4 Vývoj aktinospor uvnitř kroužkovce (na modelu *Myxobolus cerebralis*)**

#### 1.4.1 Schizogonie

Aktinosporová fáze nastává, když se spory uvolněné z ryby dostávají do kroužkovce. Uvnitř střeva vystřelují pólová vlákna, pomocí kterých se přichycují ke střevnímu epitelu. Otvírají se chlopně spory podél linie švu a dvoujaderná sporoplasma proniká mezi buňky střevního



epitelu. Obě jádra sporoplasmy prodělají mnohonásobné dělení za vzniku mnohojaderných buněk, které se dělí plazmotomií za vzniku mnoha jednojaderných buněk. Tyto buňky pak putují intracelulárně skrz střevní epitel. Některé procházejí dalšími jadernými a buněčnými děleními za vzniku dalších vícejaderných a jednojaderných buněk. Ostatní se spojí do formy dvoujaderných stádií.

#### 1.4.2 Gametogonie

Jádra dvoujaderných stádií se dělí na stádia se čtyřmi jádry, které se poté dělí na brzké pansporocysty se čtyřmi buňkami, dvě obalové somatické buňky a dvě generativní buňky, které se označují jako  $\alpha$  a  $\beta$ . Tři mitotické dělení dvou generativních buněk dávají vznik 16 diploidních gametocytům, které procházejí jedním meiotickým dělením, při kterém vzniká 16 haploidních gametocyt a 16 polárních tělísek. Každý gametocyt z linie  $\alpha$  se spojí s jedním z linie  $\beta$  za vzniku osmi zygot. Somatické buňky se rozdělují dvakrát za vzniku osmi obklopujících buněk. V každé pansporocystě je osm zygot, které jsou obklopeny osmi somatickými buňkami.

#### 1.4.3 Sporogonie

Každá zygota prochází dvěma mitotickými děleními za vzniku čtyřbuněčných forem. Tři buňky jsou umístěny periferně a rozdělují se do formy tří kapsulogeních a tří valvogeních buněk. Čtyři buňky jsou umístěny centrálně a prodělávají řadu mitotických dělení za vzniku sporoplasmy aktinospory s řadou vnitřních buněk. Následně jsou kapsulogení buňky a sporoplasma uzavřeny ve schránce složené ze tří chlopní. Prodloužená membrána valvogenních buněk se nakonec změní na chloně spory a tři výběžky triaktinomyxonové spory. Finální stádium s pansporocystami obsahuje osm zřasených aktinosporových spor, které jsou vypuštěny z červa.

### 1.5 Hostitelé

Definitivními hostiteli myxosporeí jsou sladkovodní máloštětinatci (zejména nítěnky) a také mořští mnohoštětinatci. Aktinospory *Tetractinomyxon intermedium* (Ikeda 1912) byly nalezeny také u mořských sumýšovců (Lom a Dyková 2006). U bezobratlých bylo také nalezeno několik druhů myxosporeí v myxosporeové fázi životního cyklu, kdy bezobratlý hostitel je mezihostitelem myxosporeí. *Kudoa* sp. byla objevena ve svalovině chapadla

chobotnice *Paroctopus dofleini* (Yokoyama a Masuda 2001). *Myxobolus labracis* byl popsán z tesaříka *Moron labrosus* v Egyptě (Abdel-Aal a kol. 2001). Za nejistý je považován nález *Chloromyxum diploxys* (Thélohan 1895) z břišní dutiny motýla *Tortrix viridana* (Lom a Dyková 2006).

Převážná většina zástupců myxosporeí má jako mezihostitele sladkovodní a mořské ryby, tři druhy jsou zaznamenány u bezčelistnatců (Agnatha) a 35 druhů u paryb (Chondrichthyes). 13 druhů bylo popsáno u obojživelníků, šest u plazů (Lom a Dyková 2006). Nedávno byly myxospory nebo vývojová stádia, která se vyskytují u rybích hostitelů, objeveny i u teplotokrevných obratlovců. Vývojová stádia připomínající xenomy myxosporeí, byla nalezena u krtka (Friedrich a kol. 2000). Překvapivým nálezem byl výskyt vývojových stádií a spor myxosporeí v jaterních kanálcích vodních kachen (Lowenstine a kol. 2002, Bartholomew a kol. 2008). První nález myxosporeí u savců byl zaznamenán Prunescuem a kol. (2007) v játrech rejšků. Časté nálezy spor druhů r. *Myxobolus* v lidské stolici při střevních onemocněních člověka nebo při infekci virem HIV (např., Boreham a kol. 1998, Moncada a kol. 2001, Hessen a Zamzame 2004) jsou pokládány za pasáž spor trávicím traktem. Přesto Canningová a Okamurová (2004) předpokládají, že Myxosporea mohou být za určitých podmínek oportunními parazity teplotokrevných obratlovců.

## 1.6 Klasifikace a fylogeneze

Současná taxonomie vychází z práce Loma a Nobleho (1984)

V této klasifikaci je důležitý tvar spor a jejich částí. Dále také přítomnost nebo absence interkapsulárního výběžku, charakteristiky švů, povrchové vzory chlopní, membránový plášť nebo oblak kolem spor, průběh linie švu, přítomnost mukózního obalu na povrchu spory, přítomnost a uspořádání zásob polysacharidů ve sporoplazmě (tzv. „iodinofilní vakuola“, pozice a počet sporoplazem, počet a uspořádání záhybů stočeného pólového vlákna a pozice pólových váčků. Pravidla popisu spor byla prezentována Lomem a Arthurem (1989) a metody měření spor specifikovány Shulmanem (1984). Vegetativní stádia musí být také důkladně zkoumána, jejich velikost, tvar, možnost pohybu nebo pseudopodia, metody přichycení na hostitelskou tkáň, zda jsou mono-, di- nebo polysporická atd.

Taxonomie založená na morfologii spor je celkově nepřesná. Neodráží životní cyklus se střídáním hostitelů, morfologii aktinospor uvnitř konečného bezobratlého hostitele a především fylogenetické vztahy odhalené analýzou SSU rDNA. Stanovení třídy Malacosporea je ve shodě s výsledky fylogenetické analýzy, která odděluje všechna myxosporea od malacosporeí. Nicméně v ostatních ohledech molekulární přístup nepodporuje stávající taxonomii myxosporeí (Kent a kol. 2001, Fiala 2006). Dvě hlavní větve myxosporeí nejsou založeny na podobnosti morfologie spor, ale překvapivě na stanovištích jejich hostitelů – mořském a sladkovodním prostředí. Zástupci několika rodů (*Myxidium*, *Sphaerospora*, *Zschokkella*) se vyskytují v obou hlavních skupinách. Tyto skupiny jsou rozděleny na podskupiny, kde fylogenetická příbuznost druhů a rodů ne vždy odpovídá struktuře spor. Několik druhů mající podobné spory, tj. patřící k tomu samému rodu, se vyskytují odděleně ve fylogenetických stromech, zatímco druhy z odlišných rodů klastrují společně. Fylogenetická analýza odhalila příbuznost druhů s odlišnou morfologií, které parazitují ve stejném orgánu nebo tkáni. Například druhy *Myxidium giardi*, *Chloromyxum schurovi*, *Zschokkella sp.*, *Hoferellus gilsoni* a *Myxobilatus gasterostei* jsou blíže příbuzní zástupci pěti rodů s velmi odlišnou charakteristikou morfologie spory. Společným znakem těchto pěti druhů je parazitace v močovém měchýři.

Výsledky fylogenetických analýz, založených na SSU by mohly naznačovat budoucí obrysy klasifikace. Bylo by třeba najít morfologické znaky, které by podpořily fylogenetickou analýzu. Budoucí klasifikace myxosporeí by měla reprezentovat syntézu molekulární fylogeneze a morfologie. Nicméně molekulární údaje jsou stále nekompletní a nedostatečné k podání nové podložené klasifikaci. V předkládané bakalářské práci se snažím rozšířit soubor sekvenovaných čeledi Ceratomyxidae včetně typového druhu rodu *Ceratomyxa* - *C. arcuata*. Tato čeleď se v současnosti stala nejvíce studovanou skupinou z pohledu fylogeneze v rámci myxozoi. V roce 2006 byly k dispozici pouze čtyři sekvence druhů r. *Ceratomyxa* (Fiala 2006) a nyní (duben 2010) je v genové bance 44 sekvencí druhů tohoto rodu. Fylogenetická pozice všech druhů rodu *Ceratomyxa* je publikována v práci Gunter a kol. (2009).

#### 1.7 Čeleď Ceratomyxidae, Doflein, 1899

Druhy této čeledi se vyznačují sporami s protáhlými chlopněmi do enormní délky v kolmém směru přímo do hlavního příčného švu. Spory jsou někdy symetrické. Pólové váčky jsou umístěny blízko u linie švu, v kolmé rovině, jsou kulovité nebo subsférické a mají otvory

blízko linie švu na předním pólu spory. Plasmodia jsou většinou disporická někdy mono- až poly- sporická. Tyto druhy jsou coelozoiční parazité mořských ryb, zřídka histozoiční parazité sladkovodních ryb.

#### 1.7.1 Rod *Ceratomyxa* Thélohan, 1892

Zástupci rodu *Ceratomyxa* mají protáhlé spory, z pravidla srpkovitěho tvaru nebo obloukovité, tenké chlopně spory přesahují axiální průměr spory. Chlopně spory jsou spíše měkké (ohebné) než tvrdé (neohebné) jako u ostatních rodů. Subsférické pólové váčky jsou otevřené, což je typické pro tento rod, výjimečně se otvírají laterálně od hlavní linie švu. Dvoujaderné sporoplasma nezaplňuje dutinu spóry kompletně. U některých druhů byly popsány dvě jednojaderné sporoplasmy. Trofozoity jsou obvykle disporičtí, někdy mono- nebo poly- sporičtí. Coelozoiční parazité mořských ryb, výjimečně sladkovodních ryb a zřídka jsou histozoiční. Rod zahrnuje 135 druhů.

Nejnámější zástupce je *C. shasta*. Způsobuje významné ztráty volně žijících, ale i chovných lososovitých ryb v Severní Americe (Zinn a kol. 1977, Bartholomew a kol. 1989). *C. shasta* je histozoiční parazit, napadá zažívací trakt, ale může být také nalezena v dalších orgánech, ve žlučovém měchýři, slezině, ledvinách, srdci, žábřácích a svalech (Bartholomew a kol. 1989; Eiras 2006; Lom a Dyková 2006). Ačkoli se *C. shasta* přizpůsobila parazitaci na sladkovodních rybách, fylogenetická analýza, založená na SSU rDNA, ji řadí do skupiny mořských myxosporeí (Kent a kol. 2001).

#### 1.7.2 Rod *Leptotheca* Thélohan, 1895

Zástupci rodu *Leptotheca* mají spory oválné, elipsovité někdy obloukovité. Délka individuálně laterálně prodloužených chlopních spor (měřeno od středu švu k nejvíce vzdálenému bodu chlopně) nepřesahují axiální průměr spory, ale výrazně přesahuje polovinu tohoto průměru. Otvory váček jsou blízko ševního hrbolku. Sporoplasma často zcela vyplňuje dutinu spóry, obvykle se vyskytuje jedna jednojaderná, někdy dvě jednojaderné sporoplasmy. Trofozoity jsou zpravidla disporičtí, coelozoiční parazité vyskytující se ve žlučovém měchýři a močovém ústrojí, zřídka se v tomto rodu nacházejí histozoiční parazité mořských ryb. Rod zahrnuje 44 druhů. V některých případech je problematické rozlišit od sebe *Ceratomyxu* a *Leptothecu* nebo *Leptothecu* a *Sphaerosporu*. V průběhu sepisování bakalářské práce vyšla publikace, která ruší rod *Leptotheca* a druhy tohoto rodu byly zařazeny do rodů *Ceratomyxa* a *Sphaerospora* (Gunter a Adlard, 2010).

### 1.7.3 Rod *Palliatius* Shulman, Kovaleva a Dubina, 1979

Zástupci rodu *Palliatius* mají subsférické spory, s přechodně viditelnou suturální vyvýšeninou, která je obalena membránovým pláštěm. Ten je u nezralých spor zkroucený do dvou šňůr, které obepínají sporu. Pólové váčky jsou hruškovité, sporoplasma je dvoujaderná. Coelozoiční trophozoity se vyskytují v žlučovém měchýři mořských ryb a produkují 1 až 6 disporických pansporoblastů. V rozporu s morfologií spor, fylogenetické analýzy ukazují blízkou příbuznost k rodu *Ceratomyxa*, přestože jsou zástupci rodu *Palliatius* řazeni do čeledi *Sphaerosporidae* (Davis 1917). Rod zahrnuje 6 druhů.

## 2 Cíle práce

1. Pokusit se druhově determinovat vybrané druhy čeledi Ceratomyxidae
2. Amplifikovat a sekvenovat SSU rDNA
3. Zkonstruovat fylogenetické stromy na základě získaných dat
4. Vyhodnotit příbuzenské vztahy v rámci čeledi Ceratomyxidae

## 3 Metodika

### 3.1 PCR

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Jako primery byly použity univerzální eukaryotické primery ERIB 1 (5' – ACCTGGTTGATCCTGCCAG – 3') a ERIB 10 (5' – CTTCCGCTGGTTCACCTACGG – 3') (Bárta a kol. 1997), které amplifikují SSU rDNA. Vždy byly připravovány negativní kontroly. V případě negativních výsledků byly upravovány nasedací teploty v rozmezí 45 – 55 °C. PCR probíhala v přístrojích termocyklerech Tprsonal (Biometra).

Složení reakční směsi o výsledném objemu 25 µl do 0,5 ml mikrokumavek:

10x Taq kompletní pufr	2,5 µl
dNTP (125 µM)	2 µl
ERIB 1 (10 pmol/µl)	1 µl
ERIB 10 (pmol/µl)	1 µl
Polymeráza (1 jednotka/ µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	16,5 µl
DNA	1 µl

PCR probíhala za těchto podmínek:

1. 95°C            3 min.
2. 94°C            1 min
3. 46°C            1 min
4. 72°C            1,5 min
5. 2-4 opakovat 29x
6. 72°C            9min

### 3.2 Nested PCR

Při opakujících se negativních výsledcích PCR byla zavedena metoda nested PCR. Primární PCR se shodovala s bodem 3.1 Pro sekundární PCR byly nově navrženy primery specifické pro druhy rodu *Ceratomyxa* SSU-Cer-For (5' – CTWGTTGGTADGGTAGTG – 3') a SSU-Cer-Rew (5' – GTACAAGAGGCAGAGACGTAT – 3'). Složení reakční směsi pro sekundární bylo stejné jako v bodu 3.1, pouze místo celkové DNA byl použit 1 µl směsi z primární PCR.

Sekundární PCR probíhala za těchto podmínek:

1. 95°C            3 min
2. 94°C            1 min
3. 48°C            1 min
4. 72°C            1,5 min
5. 2-4 opakovat 29x
6. 72°C            9 min

### 3.3 Gelová elektroforéza

Pro přípravu 1% agarózového roztoku bylo roztaveno 0,50 g agarózy v 50 ml TAE pufru. Rztavení probíhalo v mikrovlnné troubě po dobu 1-2 minuty, aby roztok prošel varem. Poté byl roztok schlazen na 45°C, bylo přidáno 1 µl ethidium bromidu, roztok byl nalit do formy s jamkami a minimálně 15 min tuhl. Po ztuhnutí gelu bylo do první jamky nanášeno 4µl 1kb DNA markru a do ostatních 25µl vzorku. DNA byla dělena při 70-75 V asi 20 min a posuzována na UV světle. Velikost fragmentů byla porovnávána s DNA markrem a při vhodné velikosti byl fragment vyříznut a vyizolován z gelu.

### 3.4 Izolace PCR produktu

Pro izolaci byl použit JET Quick Gel Extraction Kit (Genomed).

Postup izolace:

Do 1,5 µl mikrozkušavek byl přesunut vyříznutý fragment, bylo přidáno 300 µl roztoku L1 a zkumavka se dala inkubovat na 15 minut při 50°C, každé 3 minuty se zkumavka protřepávala. Obsah zkumavky byl přelit do kolonky. Po dobu 1 minuty se zkumavka centrifugovala při maximálních otáčkách, pak byl obsah slit a bylo přidáno 500 µl roztoku L2. Zkumavka



s kolonkou se nechala inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut a pak se centrifugovala 1 minutu při maximálních otáčkách, obsah byl slit a opět probíhala centrifugace po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách. Kolonka byla poté přemístěna do nové 1,5 µl mikrozkušavky, bylo přidáno 50 µl sterilní vody a mikrozkušavka byla poté centrifugována po dobu 2 minut při maximálních otáčkách.

### **3.5 Ligace**

Pro ligaci byl použit Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen).

Složení reakční směsi o výsledném objemu 5µl:

Cloning vector	0,5µl
Master Mix ligation	2,5µl
PCR produkt	2µl

Po promíchání probíhala inkubace při 14°C po dobu dvou hodin.

### **3.6 Transformace**

Při transformaci byly použity tyto kompetenty: legační směs, E. coli kmen XL-1, SOC medium, X-gal a Petriho misky s bakteriální půdou. X-gal se rozetřel na Petriho misku, která byla před i po rozetření gelu v inkubátoru při teplotě 37°C. SOC medium bylo rozehřáto na pokojovou teplotu a kompetentní buňky byly roztaveny na ledu. Na jeden vzorek bylo použito 65-100µl kompetentních buněk. Po smíchání legační směsi s kompetentními buňkami byla tato směs inkubována 5-20 min na ledu, poté vložena na 30s do lázně předehřáté na 42°C a inkubována 2 min na ledu. Po přidání 200µl SOC media byl vzorek třepán 1 hodinu a rozetřen na misky s bakteriální půdou. Inkubace probíhala při 37°C přes noc při které narostly bílé a modré kolonie buněk.

### **3.7 PCR screening**

Z každého vzorku na misce byly vybrány 2 bílé kolonie buněk, které byly přeneseny do 1,5ml mikrozkušavky s 30µl sterilizované vody a rozmíchány. Poté byla připravena PCR reakční

směs, která byla amplifikována. Byly použity M13R a M13F primery, které nasedají na plasmid a umožňují amplifikaci vloženého PCR produktu. Byly připravovány negativní kontroly.

Složení reakční směsi o výsledném objemu 13 $\mu$ l:

10x Taq Buffer komplete	1,3 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l
M13R	0,5 $\mu$ l
M13F	0,5 $\mu$ l
Polymeráza	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,2 $\mu$ l
Buněčná suspenze	2 $\mu$ l

PCR probíhala za těchto podmínek:

1. 95°C            10 min
2. 95°C            30s
3. 54°C            1min
4. 72°C            1 min
5. 2-4 opakovat 20 x

### **3.8 Vizualizace pomocí agarózové elektroforézy**

Pro vizualizaci byl připraven gel s jamkami (viz. 3.3 Gelová elektroforéza). Do první jamky byly nepipetovány 4  $\mu$ l 1 kB DNA markru a do ostatních 15  $\mu$ l vzorku. DNA byla dělena při 70-75 V asi 20 min a posuzována při UV světle. Pokud byly přítomny fragmenty o správné délce, přistoupilo se k namnožení plazmidu.

### **3.9 Namnožení plazmidu**

Do zkumavky se 3 ml LB media byla přidána bakteriální suspenze a 12 $\mu$ l ampicilinu. Transformované bakterie byly pomnoženy za důkladného třepání přes noc ve 37°C.

### 3.10 Izolace plazmidu

Pro izolaci byl použit JET Quick Plasmid Miniprep Kit (Genomed).

Postup izolace:

Suspenze bakterií byla přelita do 1,5 µl mikrozkušavek a byla centrifugována po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách, poté byly pečlivě odstraněny zbytky média a bakteriální buňky byly resuspendovány ve 250 µl roztoku G1. Bylo přidáno 250 µl roztoku G2 a obsah byl promíchán převrácením zkumavky, pak se zkumavka nechala inkubovat po dobu 5 minut při pokojové teplotě, bylo přidáno 350 µl roztoku G3, obsah byl důkladně promíchán opakovaným převrácením zkumavky a centrifugován po dobu 10 minut při maximálních otáčkách. Poté byl supernatant přelit do kolonky a centrifugován po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách. Proteklá tekutina byla vylita, kolonka sestavena zpět a bylo přidáno 500 µl roztoku G4. Zkumavka byla centrifugována po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách, proteklá tekutina byla opět vylita a zkumavka opět centrifugována po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách. Poté byla kolonka přemístěna do nové 1,5 µl mikrozkušavky, bylo přidáno 50 µl sterilní vody, zkumavka byla inkubována po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a poté centrifugována po dobu 2 minut při maximálních otáčkách.

Po vyizolování byla měřena absorbance plazmidové DNA na spektrofotometru a z ní vypočítána koncentrace DNA. Poté byl plazmid naředěn na požadovanou koncentraci a odeslán do servisní laboratoře k sekvenaci.

### 3.11 Sekvenace

Sekvenace probíhala v servisní laboratoři genomiky. DNA byla sekvenována po obou řetězcích pomocí univerzálních primerů M13F a M13R a pomocí vnitřního SSU rDNA specifického sekvenčního primeru 620F (5' – GCCAGCACCCGCGGTAATTCC – 3'). Standardně byly sekvenovány dva klony jednoho PCR produktu. Sekvenace byla provedena pomocí automatického sekvestoru ABI PRISM 3130xl.

### 3.12 Fylogenetická analýza

Sekvenční data ze sekvenátoru byla kompletována v programu SeqMan (DNASTAR). Z genové banky (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) byly získány dostupné SSU rDNA sekvence druhů rodu *Ceratomyxa*. Všechny sekvence byly uspořádány dohromady spolu se

sekvencí *Kudoa thyrsites* a *Myxidium gadi*, které slouží jako dva outgroupové taxony. Seřazení sekvencí bylo provedeno pomocí algoritmu Clustal W v programu Clustal X 1.83 (Thompson a kol. 1997) s vybranými parametry (8.0 pro otevření mezery a 6.0 pro prodloužení mezery). Seřazené sekvence byly manuálně upraveny v programu BioEdit 7.0.5.2 (Hall 1999).

Analýza maximální parsimonie (MP), maximální pravděpodobnosti (ML) a minimální evoluce (ME) byla provedena v programu PAUP\* 4.0b10 (Swofford 2001). MP byla vypočítána heuristickým vyhledáváním, volbou ACCTRAN a TBR algoritmem. Mezery byly považovány za chybějící data a podíl Ts/Tv byl 1:2. Vhodný model pro ML byl vyhodnocen testem pravděpodobného podílu (likelihood ratio test) v programu Modeltest verze 3.06 (Posada a Crandall 1998). ML byla provedena pomocí modelu GRT+ $\Gamma$ +I. Distanční metoda ME byla počítána s algoritmem LogDet. Podpora větví pro všechny metody byla získána 1000 bootstrapovými replikacemi s náhodným přidáním sekvencí.

## 4 Materiál

### *Ceratomyxa* sp.

Vzorek č. 731

Lokalizace: žlučový měchýř

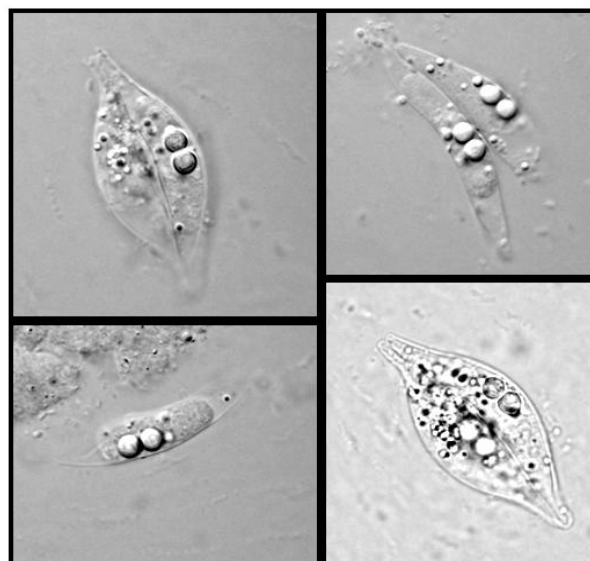
Hostitel: *Lophius piscatorius*

Geografická lokalizace:

Norsko, "U Vraku"

Rozměry spory: 36,5-50 x 6-7,5  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 3-4 x 3-4  $\mu\text{m}$



### *C. appendiculata*, Thélohan 1892

Vzorek č. 729

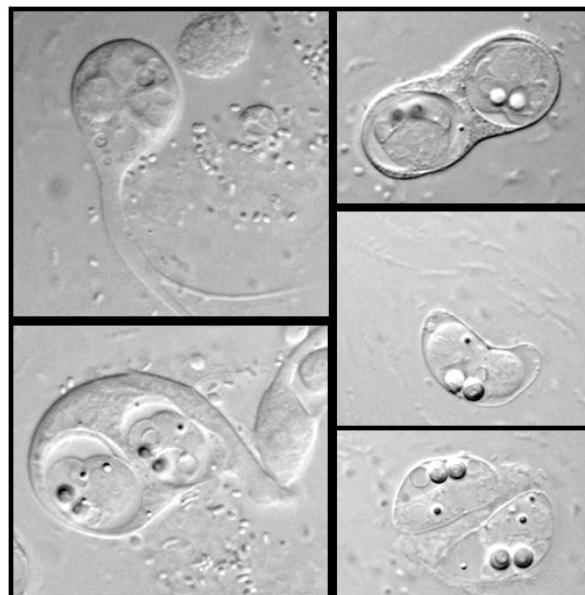
Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel: *Lophius piscatorius*

Geografická lokalizace: Norsko,  
Storuhelen

Rozměry spory: 8-11 x 17-21  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 3,5-4 x  
3,5-4  $\mu\text{m}$



*Ceratomyxa* sp.

Vzorek č. 425

Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel:

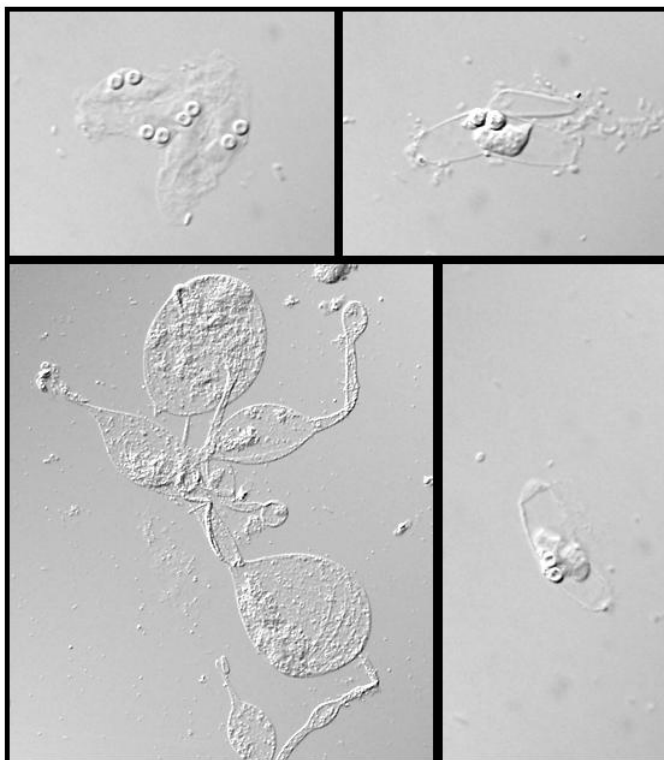
*Synaphobranchus kaupi*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 22-32 x 6,5-7  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 2-3 x

2-3  $\mu\text{m}$



*C. arcuata*, Thélohan 1892

Vzorek č. 302

Lokalizace: žlučový měchýř

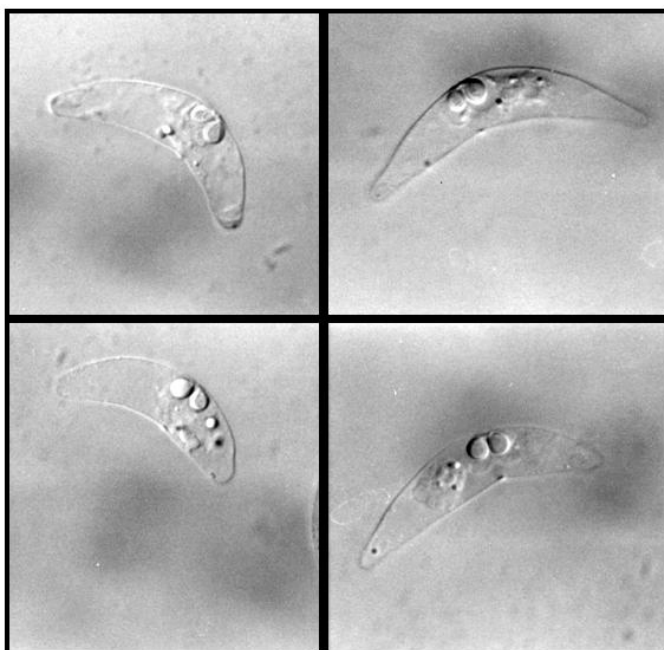
Hostitel: *Lophius piscatorius*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 34-45 x 7-8  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 3-4 x

3-4  $\mu\text{m}$



*C. arcuata*, Thélohan 1892

Vzorek č. 299

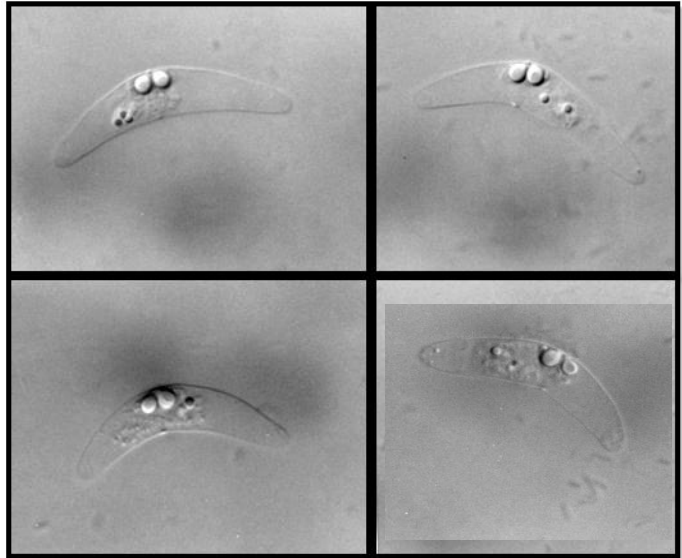
Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel: *Callionymus lyra*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 36-43 x 6-7,5  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 3x3  $\mu\text{m}$



*C. informis*, (Auerbach, 1910)

Vzorek č. 297

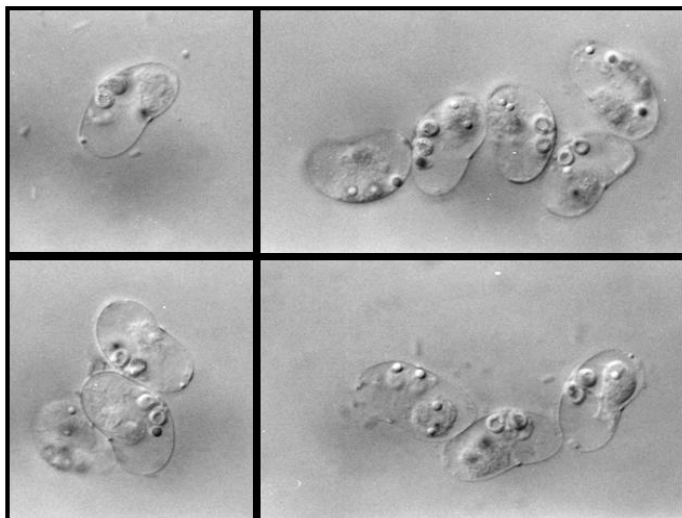
Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel: *Merlangius merlangus*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 21-23 x 9-10  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 2,5-3  
x 2,5-3  $\mu\text{m}$



C. arcuata, Thélohan 1892

Vzorek č. 296

Lokalizace: žlučový měchýř

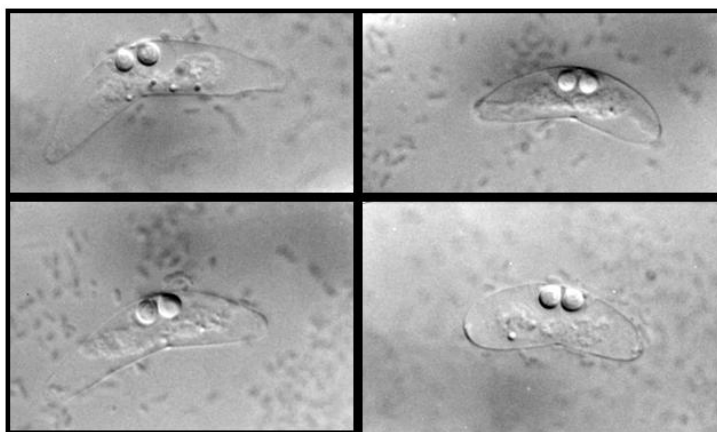
Hostitel: *Merlangius merlangus*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 32-44 x 7,5 μm

Rozměry pólových váčků: 3-4 x

3-4 μm



C. longipes, (Auerbach 1910)

Vzorek č. 295

Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel:

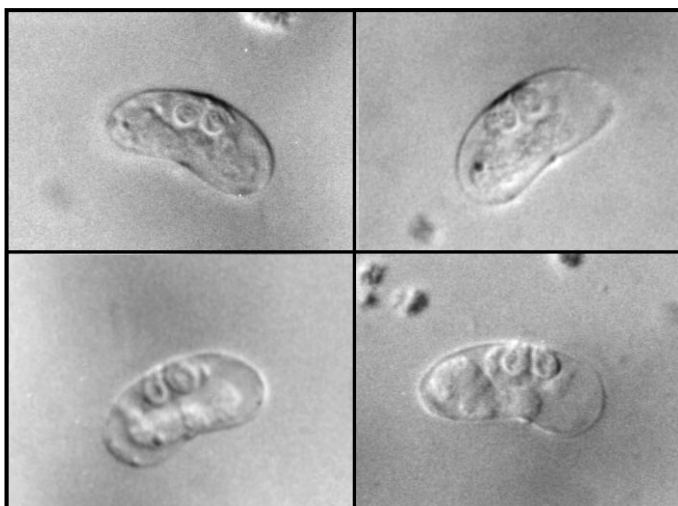
*Melanogrammus aeglefinus*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 17-18 x 5,5-6,5 μm

Rozměry pólových váčků: 2,5 x 2,5

μm





C. appendiculata. Thélohan 1892

Vzorek č. 293

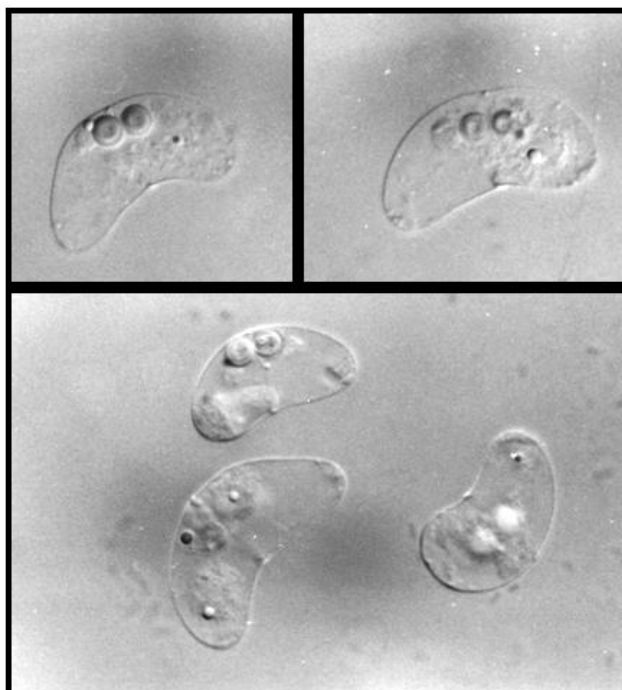
Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel: *Lophius piscatorius*

Geografická lokalizace: Skotsko

Rozměry spory: 23-31 x 10-11  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 3-4 x 3-4  $\mu\text{m}$



Ceratomyxa sp.

Vzorek č. 184

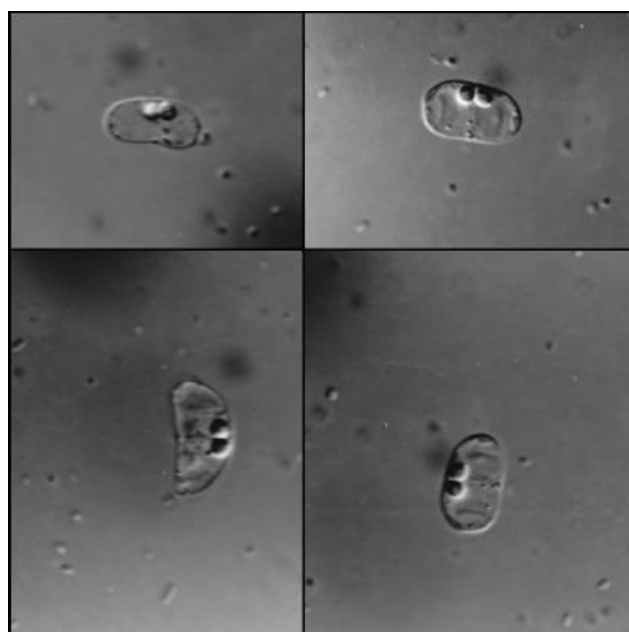
Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel: *Scorpaena porca*

Geografická lokalizace: Chorvatsko

Rozměry spory: 6-7 x 13-16  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 2,5-3 x 2,5-3  $\mu\text{m}$



*Ceratomyxa* sp.

Vzorek č. 182

Lokalizace: žlučový měchýř

Hostitel: *Scorpaena porca*

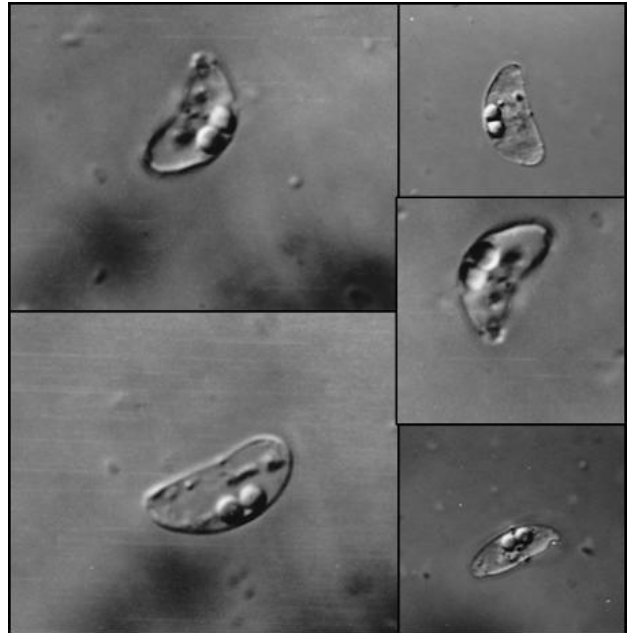
Geografická lokalizace:

Chorvatsko

Rozměry spory: 6-7 x 13-16  $\mu\text{m}$

Rozměry pólových váčků: 2,5-3 x  
2,5-3

$\mu\text{m}$



## 5 Výsledky

Celkem se podařilo získat SSU rDNA z 11 vzorků DNA druhů rodu *Ceratomyxa*. Dvě téměř kompletní sekvence měly délku 1897 a 2058 bp s C+G obsahem bází 50,03 a 52,09%. Délka částečných sekvencí se pohybovala v rozmezí 1384 bp až 1594 bp s C+G obsahem bází od 45,70 po 52,51%. Sekvenční podobnost mezi získanými SSU rDNA sekvencemi se pohybovala od 73,05 po 99,50% (viz. Tab. 1). Sekvenováním tří klonů SSU rDNA PCR produktů vzorku *Ceratomyxa* sp. 296 z *Merlangius merlangus* vyšla najevo přítomnost dvou odlišných sekvencí SSU rDNA (296A a 296B,C). Z distanční matice uvedené v tabulce vyplývá vysoká sekvenční podobnost mezi některými DNA izoláty. Izoláty se podle sekvenční podobnosti rozdělily do čtyř skupin a dvou samostatných sekvencí. Tři skupiny obsahují po třech sekvencích s vysokou sekvenční podobností a jedna skupina obsahuje dvě sekvence s vysokou sekvenční podobností.

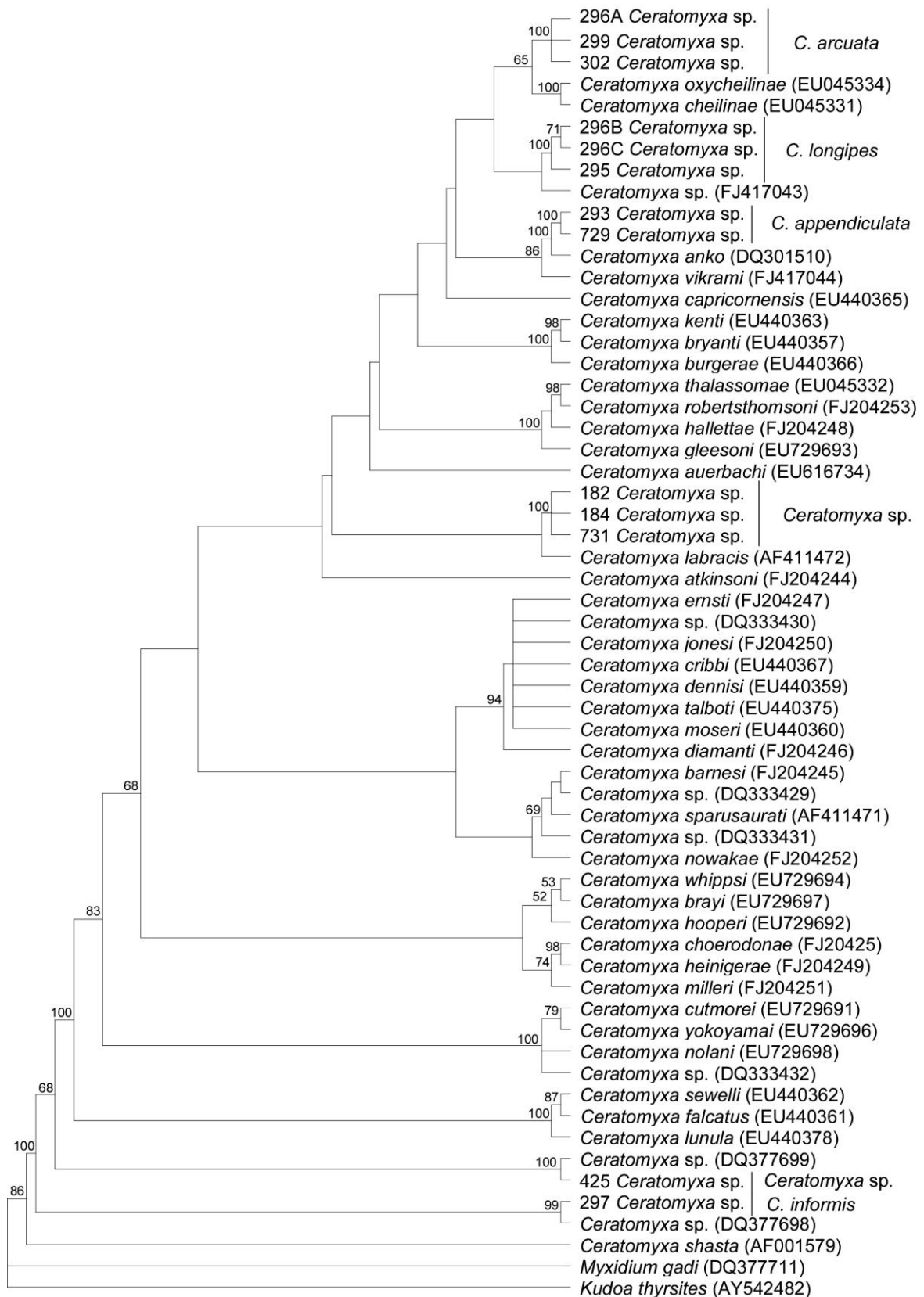
Fylogenetické analýzy metodami maximální parsimonie (viz. Obr. 1), maximum likelihood (viz. Obr. 2) a minimum evolution (viz. Obr. 3) rozdělily 11 studovaných vzorků myxosporeí do šesti skupin. Vzorky 293 a 729 tvoří sesterské taxony a jsou nejbližšími příbuznými druhu *C. anko* s 99% bootstrapem v ML a 100% bootstrapem v MP. Skupina vzorků 182, 184 a 731 tvoří sesterskou skupinu s *C. labracis* v MP. ML a ME odhalila odlišnou fylogenetickou pozici této skupiny, kdy tato skupina tvoří samostatnou linii bez blízké příbuznosti ke konkrétním druhům. Vzorky 296A, 299 a 302 jsou nejbližšími příbuznými druhů *C. oxycheilinae* a *C. cheilinae*. Tyto taxony společně s *Ceratomyxa* sp. (FJ417043) vytvářejí společnou skupinu s blízce příbuznými izoláty 296B, 296C a 295. Izoláty 425 a 297 se větví jako bazální taxony všech druhů rodu *Ceratomyxa*. Izolát 297 je nejbližší příbuzný k *Ceratomyxa* sp. (DQ377698) a izolát 425 je nejbližší příbuzný k *Ceratomyxa* sp. (DQ377699).

Tab. 1. Sekvenční podobnost mezi získanými SSU rDNA sekvencemi (%)

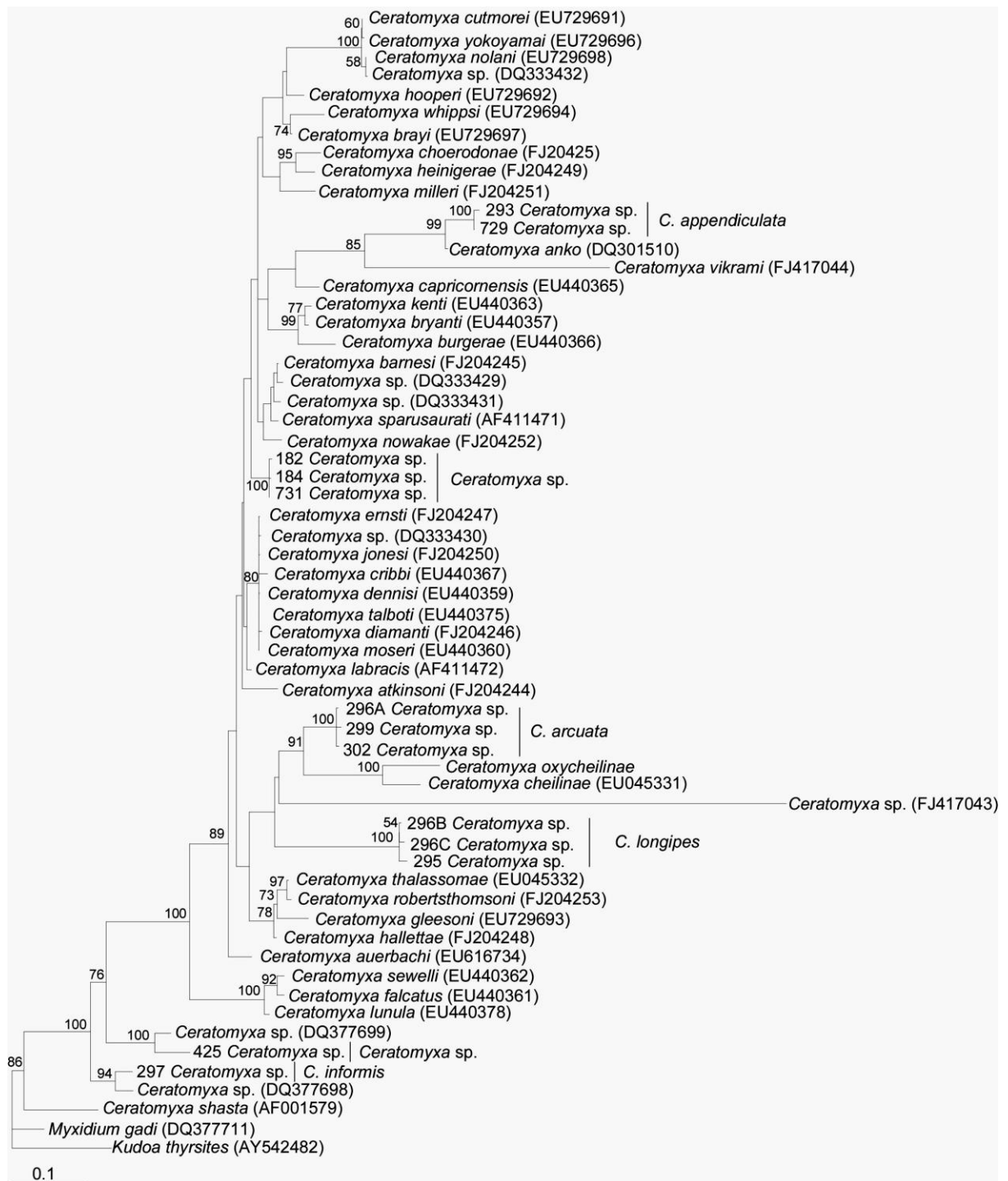
	296B	297	182	425	295	296C	296A	302	299	731	184	293
296B	-											
297	77,71	-										
182	80,75	82,09	-									
425	77,29	87,37	81,08	-								
295	98,90	78,20	82,24	77,68	-							
296C	97,46	78,01	80,81	77,65	98,41	-						
296A	82,05	80,83	84,10	79,16	84,17	81,70	-					
302	84,19	82,02	86,51	80,44	84,41	83,98	99,27	-				
299	81,85	80,84	84,80	79,26	84,00	81,57	98,41	98,91	-			
731	80,63	82,27	99,50	81,20	76,86	80,68	84,65	86,36	84,08	-		
184	80,68	82,14	99,44	80,98	82,32	80,88	85,11	86,80	84,78	99,44	-	
293	77,09	76,14	81,15	75,56	76,04	76,89	80,54	81,22	80,15	78,93	81,08	-
729	77,26	76,52	81,11	75,78	72,95	77,06	80,77	81,19	80,34	77,39	81,33	96,61

Na základě morfologie, rozměrů spor, které byly zaznamenány školitelem při získávání materiálu, a výsledků analýzy sekvencí bylo specifikováno šest samostatných druhů rodu *Ceratomyxa*. Srovnáním s literaturou se podařilo identifikovat čtyři druhy rodu *Ceratomyxa*: *C. arcuata*, *C. longipes*, *C. appendiculata* a *C. informis*.

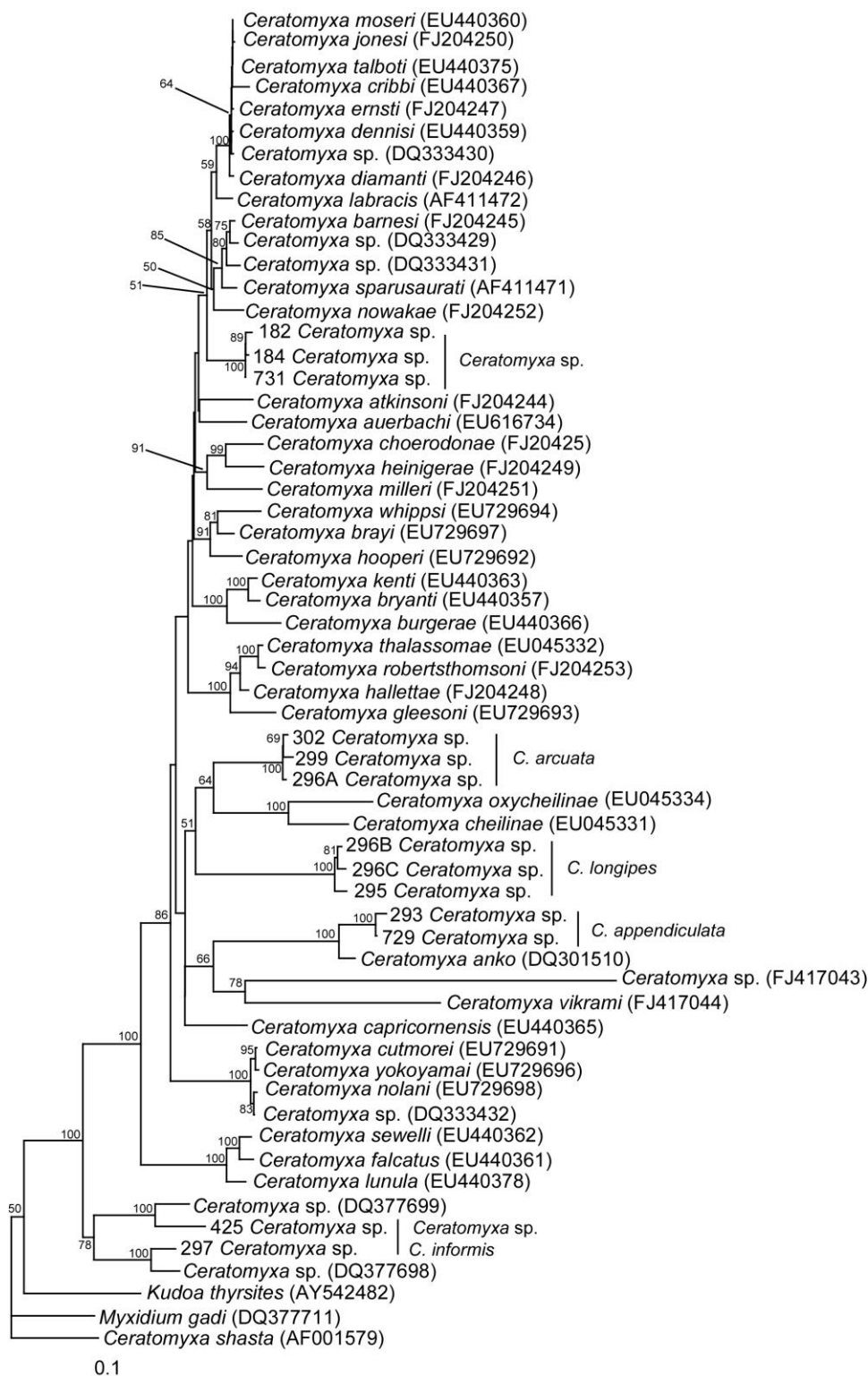
S druhem *C. arcuata* byly ztotožněny myxospory nalezené u hostitelů *Merlangius merlangus* (DNA izolát číslo 296), *Callionymus lyra* (DNA izolát číslo 299), *Lophius piscatorius* (DNA izolát číslo 302). Jako *C. longipes* byla určena myxospora nalezená u hostitele *Melanogrammus aeglefinus* (DNA izolát číslo 295). U hostitele *Lophius piscatorius* byla určena také další *Ceratomyxa* ze dvou odlišných geografických oblastí – *C. appendiculata* (DNA izolát číslo 293 a 729). Nalezená myxospora u *Merlangius merlangus* (DNA izolát číslo 297) byla identifikována jako *C. informis*. Zbývající dva druhy zatím nebyly druhově determinovány.



Obr. 1: Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* odvozené metodou maximální parsimonie. Procentuální hodnoty bootstrapů nad 50% jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Jako outgroupy byly zvoleny druhy *Kudoa thyrsites* a *Myxidium gadi*.



Obr. 2: Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* odvozené metodou maximum likelihood. Procentuální hodnoty bootstrapů nad 50% jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Jako outgroupy byly zvoleny druhy *Kudoa thyrssites* a *Myxidium gadi*. Měřítko pro délky větví znázorněno pod stromem.



Obr. 3: Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* odvozené metodou minimum evolution. Procentuální hodnoty bootstrapů nad 50% jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Jako outgroupy byly zvoleny druhy *Kudoa thyrsites* a *Myxidium gadi*. Měřítko pro délky větví znázorněno pod stromem.

## 6 Diskuze

V předložené bakalářské práci bylo sekvenčně charakterizováno a fylogeneticky analyzováno jedenáct vybraných vzorků myxosporeí, které morfologicky odpovídají charakteristice rodů *Ceratomyxa* a *Leptotheca*. Během vypracovávání bakalářské práce byla publikována studie, ve které byl na základě fylogenetické analýzy zrušen rod *Leptotheca* (Gunter a Adlard 2010). Druhy tohoto rodu byly přeřazeny do rodů *Ceratomyxa* a *Sphaerospora* na základě jejich tkáňové lokalizace. Vzorky 295 a 297, které byly k dispozici pro sekvenční analýzu morfologicky odpovídaly charakteristice rodu *Leptotheca* a zároveň byly získány ze žlučového měchýře ryb. Pozice těchto druhů jako druhů *Leptotheca* v rámci skupiny *Ceratomyxa* by znamenala porušení monofilie rodu *Ceratomyxa*. Fylogenetickou analýzou jsme zjistili jejich pozici uvnitř skupiny všech druhů r. *Ceratomyxa* a ověřili správnost přeřazení těchto dvou druhů do rodu *Ceratomyxa*.

Tyto dva bývalé druhy rodu *Leptotheca* se podařilo na základě totožné morfologie a rozměrů spory a shodného hostitele identifikovat s druhy *C. informis* (297) a *C. longipes* (295). *C. longipes* byla pomocí molekulárních metod také zaznamenána v jiném vzorku z *Merlangius merlangus* (296), ve kterém byl pomocí světelné mikroskopie zaznamenán pouze jeden odlišný druh. *C. longipes* byla popsána zatím pouze u dvou hostitelů *Brosme brosme* a *Melanogrammus aeglefinus* (MacKenzie a kol. 2005, Gunter a Adlard 2010). Je velmi pravděpodobné, že *C. longipes* je parazitem dalšího druhu treskovité ryby *Merlangius merlangus* ze Severního moře, protože smíšené infekce jsou běžným jevem u myxosporeí. Tento druh nebyl zaznamenán světelnou mikroskopií, protože mohlo jít o slabou infekci s produkcí nepatrného množství spor a nebo nákaza mohla být v ranné fázi v podobě časných plazmodií bez přítomnosti zralých spor. Ve zmíněném vzorku 296 z *Merlangius merlangus* byl světelnou mikroskopií prokázán typový druh rodu *Ceratomyxa* – *C. arcuata*. Tento druh parazituje na širokém spektru patnácti druhů rybích hostitelů v SV Atlantiku, Středozezemním a Černém moři (MacKenzie a kol. 2005). V bakalářské práci byl sekvenční analýzou prokázán tento druh celkem u tří hostitelů – *Merlangius merlangus* (296), *Callionymus lyra* (299) a *Lophius piscatorius* (302). U posledně zmíněného hostitele nebyla zatím *C. arcuata* popsána a tudíž se hostitelské spektrum rozrostlo o další rybí druh. Vzorky z *L. piscatorius* byly k dispozici také z pobřeží Norska. U těchto vzorků nebyla prokázána přítomnost *C. arcuata*, což potvrzuje domněnku MacKenzieho a kol. (2005), že *C. arcuata* je omezena na SV



Atlantik s výjimkou pobřeží Norska. U *L. piscatorius* byla nalezen a sekvenčně charakterizován také jiný druh *C. appendiculata* ve vzorcích jak z Norska (729) tak ze Skotska (293). Tento druh byl zaznamenán u *L. piscatorius* ze Středozemního moře u pobřeží Francie (Eiras 2006). V této bakalářské práci bylo prokázáno širší geografické rozšíření tohoto druhu rodu *Ceratomyxa*. Druhově zatím nebyla určena *Ceratomyxa* sp. (731), která byla také nalezena ve žlučovém měchýři *L. piscatorius* z Norska. Sekvenčně je tento druh téměř identický (99,5%) s morfologicky odlišným druhem *Ceratomyxa* sp., který byl nalezen u *Scorpaena porca* (182 a 184). Půjde pravděpodobně o smíšenou infekci, jak se také předpokládá v případě *C. longipes*, což by bylo ve shodě s prací Gunter a kol. (2009), která popsala sekvenčně téměř identické druhy s odlišnou morfologií. Posledním sekvenčně charakterizovaným a identifikovaným druhem je *Ceratomyxa* sp. (297) ze *Synapobranchus kaupii*, který se také ještě nepodařilo druhově determinovat. Nesnadná druhová determinace druhů rodu *Ceratomyxa* je dána tím, že v současnosti je popsán velký počet 209 druhů tohoto rodu a současně se rod *Ceratomyxa* vyznačuje pleomorfitou ve tvaru spory (Lom a Dyková 1992, Gunter a Adlard 2010).

SSU rDNA sekvence s jedenácti získaných vzorků umožnily identifikovat v několika případech přítomnost stejných druhů v různých vzorcích. Sekvenční data ovšem nepřiradila ani jeden vzorek k žádnému ze 44 dosud sekvenovaných druhů rodu *Ceratomyxa*. V bakalářské práci se tedy podařilo nově sekvenčně charakterizovat celkem šest druhů včetně typového druhu. Získaná sekvence typového druhu je důležitá vzhledem k budoucím taxonomickým změnám v systému myxozoi, který neodpovídá fylogenezi (Fiala 2006, Holzer a kol. 2007).

Publikace Gunter a kol. (2009) přinesla velký počet nových SSU rDNA spolu s popisem nových druhů rodu *Ceratomyxa*. Tato práce umožnila srovnání sekvencí získaných v této bakalářské práci s reprezentativním počtem taxonů. Topologie stromů z provedených analýz se v některých uzlech liší, což je dáno celkově velmi nízkou podporou velkého počtu uzlů. Tato nízká podpora je ve shodě s výše zmíněnou publikovanou analýzou, která je také charakteristická nízkou podporou větvení a také řadou polytomií. Topologie stromů je také zajímavá celou řadou krátkých ale i velmi dlouhých větví vedoucích k jednotlivým druhům, to značí velmi odlišnou rychlost evoluce SSU rDNA genu, která byla potvrzena LSU rDNA analýzou se stejným charakterem délky větví (Bartošová a kol. 2009). Některé sekvenčně téměř identické nově objevené druhy byly popsány na základě odlišné morfologie, jako druhy

pro vědu nové (Gunter a kol. 2009). Sekvence získané ze tří vzorků, které obsahovaly morfologicky identické spory a byly determinovány jako *C. arcuata*, se sekvenčně více odlišovali v rámci jednotlivých vzorků než například *C. talboti* a *C. moseri*. Tento rozdíl může spočívat v tom, že *C. arcuata* patří spolu s *C. longipes* do skupiny „dlouhovětevných“ ceratomyx a evoluční rychlost SSU rDNA u jednotlivých populací druhů může být odlišná. Rovněž i *C. appendiculata* náleží do jiné skupiny „dlouhovětevných“ ceratomyx v blízké příbuznosti k *C. anko* a *C. vikrami*, které mají extrémně dlouhé větve v porovnání s ostatními druhy r. *Ceratomyxa*. Zajímavá je i pozice *C. informis* a *Ceratomyxa* sp. (425), které jsou jedny z nejbazálnějších druhů rodu *Ceratomyxa* v blízké příbuznosti s *C. shasta*, jejíž pozice jako nejbazálnějšího druhu byla nedávno publikována (Gunter a Adlard 2010).

## 9 Závěr

Pomocí metod molekulární taxonomie jsem určila fylogenetickou pozici 11 vzorků myxosporeí. Analýza odhalila ve vzorcích celkem 6 sekvenčně odlišných druhů rodu *Ceratomyxa*. Čtyři druhy se podařilo ztotožnit s druhy v literatuře popsány: *C. arcuata*, *C. longipes*, *C. appendiculata* a *C. informis*. Dva druhy jsem zatím na základě dostupné literatury druhově nedeterminovala a pravděpodobně půjde o druhy pro vědu nové. Typový druh *C. arcuata* jsem identifikovala u nového hostitele *Lophius piscatorius*.

## 8 Literatura

ABDEL-AAL A.A., BADAWY G.G., GATTAS M.W. (2001). Light and electron microscopic studies on myxosporean parasites of some marine fishes with description of two new species. *Assiut. Vet. Med. J.* 44:2115-2131

BARTA J.R., MARTIN, D.S., LIBERATOR, P.A., DASHKEVICZ, M., ANDERSON, J.W., FEIGHNER, S.D., ELBRECHT, A., PERKINS-BARROW, A., JENKINS, M.C., DANFORTH, H.D., RUFF, M.D., PROFOUS-JUCHELKA, H., 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 83, 262-271.

BARTHOLOMEW J.L., ATKINSON S.D., HALLETT S.L., LOWENSTINE L.J., GARDINER C.H., RIDEOUT B.A., KEEL M.K., BROWN J.D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *Int. J. Parasitol.* 38:1199-1207

BARTHOLOMEW J.R., ROHOVEC J.S., FRYER J.L. (1989). Development, characterization, and use of monoclonal and polyclonal antibodies against the myxosporean, *Ceratomyxa shasta*. *J. Protozool.* 36:397-401

BARTOŠOVÁ P., FIALA I., HYPŠA V. (2009). Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics. *Mol. Phzlogenetic. Evol.* 53:81-93

BOREHAM R.E., HENDRICK S., O'DONOGHUE P.J., STENZEL D.J. (1998). Incidental finding of *Myxobolus* spores (Protozoa:Myxozoa) in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms. *J. Clin. Microbiol.* 36:3728-3730

BÜTSCHLI (1882). Mixosporidia. In: Bronn's klassen und ordnungen des teirreichs. 1. Protozoa, Second Edition C.F. Winter, Leipzig, pp. 590-603

CANNING E.U., CURRY A., FEIST S.W., LONGSHAW M. a OKAMURA B. (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasite sof bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J. Eukaryot. Microbiol.* 47:456-468

CANNING E.U., OKAMURA B. (2004). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Adv. Parasitol.* 56:44-131

DAVIS H.S. (1917). The myxosporidia of the Beaufort region. A systematic and biologic study. *Bull. Bur. Fish.* 35:201-243

- DOFLEIN F. (1899). Fortschritte auf dem Gebiete der Myxosporidienkunde. Zusammenfassende Uebersicht. Zool. Zentralbl. 6:361-379
- EIRAS J.C. (2006). Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea; Ceratomyxidae). Syst. Parasitol. 65:49-71
- EL-MATBOULI M., HOFFMANN R.W. (1998). Light and elektron microscopic study on the chronological development of *Myxobolus Cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. Int. J. Parasitol. 28:195-217
- FIALA I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. Int. J. Parasitol. 36:1521-1534
- FRIEDRICH C., INGOLIC E., FREITAG B., KASTBERGER G., HOHMANN V., SKOTFITSCH G., NEUMEISTER U., KEPKA O. (2000). A myxozoan- like parasite causing xenomas in the brain of the mole *Talpa europia* L., 1758. Parasitology. 121:483-492
- GUNTER N., ALDARD R. (2010). The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). Syst. Parasitol. 75:81-104
- GUNTER N., WHIPPS C.M., ALDARD R.D. (2009). *Ceratomyxa* (Myxozoa:Bivalvulida) parasites od dameselfisches with description of twelve novel species from Australia's Great Barrier Reef. Parasitology. 135:1165-1178
- HALL T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/ NT. Nucl. Acids Symp. Ser., 41:95-98
- HEDRICK R.P., EL-MATBOULI M., ADKISON M.A. a MACCONNELL E. (1998). Whirling dinase: re-emergence among wild trout. Immunol. Rev. 166:365-376
- HESSEN E.M., ZAMZAME M.L. (2004). *Myxobolus* sp.: possible new opportunistic parasite immunocompromised patients in Ismailia. J. Egypt. Soc. Parasitol. 34:925-930
- HOLZER A.S., WOOTTEN R., SOMMERVILLE C. (2007) The secondary structure of the unusually long 18S ribosomal RNA of the myxozoan *Sphaerospora truttae* and structural evolutionary trends in the Myxozoa. International Int. J. Parasitol. 37:1281-1295
- IKEDA J. (1912). Studies on some sporozan parasites of sipunculoids. I. The life history of new *Actinomyxidian*, *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. Arch. Protistenkd. 25:240-242
- JIMÉNEZ-GURI E., PHILIPPE H., OKAMURA B., HOLLAND P.W.H. (2007). *Buddenbrockia* is a Cnidarian worm. Science. 317:116-118

- KENT M.L., ANDREE K.B., BARTHOLOMEW J.L., EL-MATBOULI M., DESSER S.S., DELVIN R.H., FEIST S.W., HEDRICK R.P., HOFFMANN R.W., KHATTRA J., HALLET S.L., LESTER R.J.G., LONGSHAW L., PALENZUALA O., SIDDALL M.E., XIAO C. (2001). Recent Advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:395-413
- KØIE M., WHIPPS C.M., KENT M.L. (2004). *Ellipsomyxa gobii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Anelida: Plichaeta) as invertebrate hosts. *Folia Parasitol.* 51:14-18
- LOM J., DYKOVÁ I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol.* 53: 1-36
- LOM J., ARTHUR J.R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J. Fish Dis.* 12:151-156
- LOM J., DYKOVÁ I. (1992). Protozoan parasite of fish. Elsevier. 187:275-281
- LOM J., NOBLE E.R. (1984). Revised classification of the myxosporea Bütschli (1881). *Folia Parasitol.* 31:93-205
- LOWENSTINE L.J., RIDEOUT B.A., GARDNER M., BUSCH M., MACE M., BARTHOLOMEW J.L., GARDINER C.H. (2002). Myxozoanosis in waterfowl: a new host record? *Proc. Am. Soc. Zoo Veterinarians.* 86-87
- MACKENZIE K., KALAVATI C., GAARD M., HEMMINGSEN W. (2005). Myxosporea gall bladder parasite of gadid fishes in the North Atlantic: Their geographical distributions and assessment of their economic importance in fisheries and mariculture. Elsevier. 76:454-465
- MONCADA L.I., LOPEZ M.C., MURCIA M.I., NICHOLS S., LEON F., GUIO O.L., CORREDOR A. (2001). *Myxobolus* sp., another opportunistic parasite immunosuppressed patients? *J. Clin. Microbiol.* 39:1938-1940
- MONTEIRO A.S., OKAMURA B., HOLLAND P.W.H. (2002). Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan. *Mol. Biol. Evol.* 19:968-971
- MORRIS D. J., ADAMS A. (2007) Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the bryozoan host *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Parasitol. Res.* 100:5, 983-992
- POSADA D., CRANDALL K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14:817-818

- 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 Parasitol.* 54:159-164
- SHULMAN S.S. (Ed) (1984). Parasitic protozoa. Vol.1. In: O.N. Bauer (Ed) Key to the Parasite of Freshwater Fauna of USSR, Vol. 140 of the Keys to the Fauna of the USSR. Nauka, Leningrad, 428pp. (In Russian)
- SHULMAN S.S., KOVALEVA A.A., DUBINA V.R. (1979). New myxosporidians from fishes of the Atlantic coast of Africa. *Parazitol.* 13: 71-79. (in Russian)
- SMOTHERS J.F., VON DOHLEN C.D., SMITH JR. L.H. and SPALL R. D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans, *Science.* 265: 1719-1721
- SWOFFORD D.L. (2001). PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- ŠTOLC A. (1899). Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaires parent des Myxosporidies. *Bull. Intl. Acad. Sci. Boheme.* 22: 1-12
- THÉLOHAN P. (1892). Observations sur les myxosporidies et essai de classification de ces organismes. *Bull. Soc. Philom.* 4:165-178
- THÉLOHAN P. (1895). Recherches sur les Myxosporidies. *Bull. Sci. Fr. Belg.,* 26:100-394
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNAIK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.,* 25:4876-4882
- WEILL R. (1938). L'interprétation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle Compaq à la phase larvaire des Narcomeduses Cuninides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereaux.* 13:727-744
- WOLF K., MARKIW M.E. (1984). Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternative of invertebrate and vertebrate hosts. *Science.* 225:1449-1452
- YOKOYAMA H., MASUDA K. (2001). *Kudoa* sp. (Myxozoan) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific octopus *Paroctopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 21:266-268
- ZINN J.L., JOHNSON K.A., SANDERS J.E., FRYER J.L. (1977). Susceptibility of salmonid species and hatchery strains of chinook salmon (*Oncorhynchus Tshawytscha*) to infections by *Ceratomyxa Shasta*. *J. Fish. Res. Board Can.* 34:933-936