

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fylogenetické vztahy kokcií parazitujících u myšice
temnopásé (*Apodemus agrarius*) na základě sekvencí COX 3 genu**

Bakalářská práce

Jan Kamiš

Školitel: MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

Školitel – specialista, konzultant: prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

České Budějovice 2019

Kamiš J., 2019: Fylogenetické vztahy kokcií parazitujících u myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*) na základě sekvencí COX 3 genu. [Phylogenetic relationships of coccidia parasitizing striped field mice (*Apodemus agrarius*) based on sequences of the COX 3 gene. Bc. thesis, in Czech.] – 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Phylogenetic relationships of coccidia parasitizing *Apodemus agrarius* were analyzed and evaluated. The study was based on analyses of the mitochondrial COX 3 gene that were then compared with analyses of the COX 1 gene. Methods of molecular biology together with phylogenetic computer programmes were used in the course of this study.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval 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 jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. 4. 2019

Jan Kamiš

Tímto chci poděkovat své školitelce MVDr. Janě Kvičerové, Ph.D. za její mimořádnou podporu v průběhu tvorby této práce. Děkuji za vedení, rady, a také zkušenosti, které jsem získal. Rodině děkuji za trpělivost a své fence Dorince za nervy uklidňující canisterapii.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Ribozomální markery	2
1.1.1	18S rDNA.....	3
1.1.2	5.8S rDNA.....	4
1.1.3	28S rDNA.....	4
1.1.4	Internal transcribed spacers 1 a 2 (ITS 1 a ITS 2).....	5
1.2	Mitochondriální markery	6
1.2.1	Cytochrom c oxidáza podjednotka 1 (COX 1).....	7
1.2.2	Cytochrom c oxidáza podjednotka 3 (COX 3).....	7
1.3	Cytochrom b	8
1.4	Plastidové markery	9
1.4.1	Open reading frame 470 (ORF 470).....	9
1.4.2	23S rDNA.....	10
1.5	Kokcidie jako modelový organismus	11
1.5.1	Fylogeneze.....	11
1.5.2	Taxonomie.....	15
1.5.3	Morfologie oocyst a determinace kokcidií rodu <i>Eimeria</i>	16
1.5.4	Životní cyklus.....	17
1.5.5	Hostitelská specifita.....	19
1.5.6	Hlodavci jako hostitelé kokcidií.....	19
1.6	Myšice temnopásá jako modelový organismus	20
2	Cíle práce.....	24
3	Metodika.....	26
3.1	Původ studovaných vzorků, jejich odběr a vyšetření	26
3.2	Molekulární analýzy	26
3.2.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	26
3.2.2	Elektroforéza	27
3.2.3	Enzymatické čištění produktů	27
3.2.4	Úprava a zpracování sekvencí.....	28
3.3	Fylogenetické analýzy	28
3.3.1	Alignment.....	28
3.3.2	Rekonstrukce fylogenetických vztahů.....	28
4	Výsledky.....	30

4.1	Sekvenace	30
4.2	Fylogenetické analýzy	32
4.2.1	Maximum likelihood analýza sekvencí genu COX 3.....	32
4.2.2	Bayesovská analýza sekvencí genu COX 3.....	34
4.2.3	Maximum likelihood analýza sekvencí genu COX 1.....	36
4.2.4	Bayesovská analýza sekvencí genu COX 1.....	38
4.2.5	Maximum likelihood analýza konkatenovaného alignemntu sekvencí COX 1 a COX 3	40
4.2.6	Bayesovská analýza konkatenovaného alignmentu sekvencí COX 1 a COX	342
5	Diskuze.....	44
6	Závěr.....	47
7	Použitá literatura	48
7.1	Odborné publikace	48
7.2	Internetové zdroje	60
8	Přílohy	61

1 Úvod

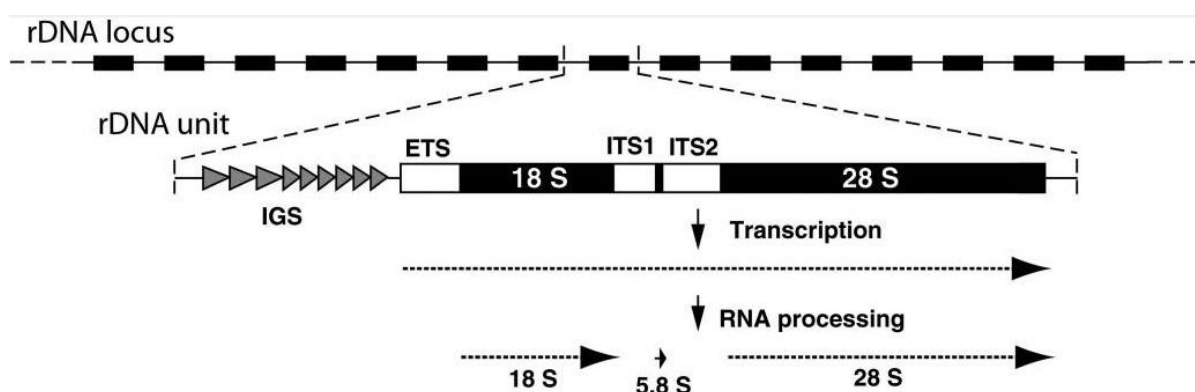
V minulosti byly organismy popisovány a identifikovány na základě morfologických znaků, což se mnohdy ukazovalo jako problematické, zejména na úrovni druhů nebo u organismů s jednoduchou morfologickou strukturou (Schneider, 1881; Long a Reid, 1982; Barta a kol., 1997; Gubbels a kol., 1999). Následné objevení DNA markerů způsobilo revoluční změny ve vědě a výzkumu, a umožnilo analýzy nezávislé na morfologických znacích. Již první použití allozymů v 70. letech 19. století odstartovalo dramatický rozvoj molekulární genetiky, díky kterému se výzkum zaměřil například i na lidský genom (Liu a Cordes, 2004). Vědci se zprvu zaměřovali na jaderné geny, jako jsou ribozomální rRNA a ITS oblasti (Collins a Allsopp, 1999).

Jaderná rDNA byla nejprve používána pro molekulární analýzy za účelem odhalení evolučních vztahů a genetických diverzit mezi taxony (Hillis a Dixon, 1991; Olsen a Woese, 1993; Tenter a Johnson, 1997; Daugbjerg a kol., 2000). Je složena z tandemových repetitivních jednotkami bazí, které obsahují transkripční kódující geny, jako například 18S, 5.8S a 28S rDNA, a z nekódujících úseků ITS 1 a 2 (internal transcribed spacers 1 a 2). Individuální kódující a nekódující oblasti rDNA mají různou míru sekvenční variability, která se liší vhodností pro zjišťování příbuzenských vztahů na vyšších nebo nižších taxonomických úrovních (Adachi a kol., 1996).

Postupem času se však ukázalo, že se ribozomální markery poměrně pomalu vyvíjejí (Eickbush a Eickbush, 2007), což může zapříčinit nedostatek fylogenetického signálu v analýzách, jak naznačuje například studie Collins a Allsopp (1999) zabývající se třemi poddruhy parazita *Theileria parva* (Apicomplexa: Piroplasmorida). Amplifikací rRNA genů se jim nepodařilo poddruhy *T. parva* zcela rozlišit. Zaměřili se proto na ITS oblasti, ve kterých prokázali vyšší variabilitu než u konzervativních rRNA genů. ITS oblasti jsou sice variabilnější než rDNA, jejich nevýhodou je ale velká náchylnost k homoplaziím a vysoký počet kopií (Álvarez a Wendel, 2003). Později se tedy pozornost zaměřila na mitochondriální DNA (mtDNA), která má oproti rDNA několik výhod. Molekula mtDNA je díky své struktuře stabilnější, a vzhledem k vyššímu výskytu mutací má rychlejší vývoj a vyšší variabilitu (Bannikova, 2004; De Salle a kol., 2017).

1.1 Ribozomální markery

Ribozomální RNA je hlavní strukturální komponent ribozomu a obsahuje komplementární sekvence k mRNA oblastem, se kterými může interagovat. Ribozomy jsou komplexy složené až z 80 ribozomálních proteinů, které jsou syntetizovány v cytoplazmě, a poté transportovány do jádra ke složení (Avisé, 2004; Eickbush a Eickbush, 2007; Lodish a kol., 2007; Alberts a kol., 2008; Bhagavan a Ha, 2015). Součástí ribozomálního RNA genového clusteru u eukaryot je celkem sedm komponentů: 5' external transcribed spacer, 18S rDNA exon, internal transcribed spacer 1 (ITS 1), 5.8S rDNA exon, internal transcribed spacer 2 (ITS 2), 28S rDNA exon, a 3' external transcribed spacer. 18S rDNA lze také označit jako malou ribozomální podjednotku (SSU), 5.8S rDNA a 28S rDNA jsou součástí velké ribozomální podjednotky (LSU), a dohromady se obě podjednotky opakují v ribozomální RNA v tandemových repetitcích (Obr. 1) (Wheeler a Honeycutt, 1988; Fisher a Bellows, 1999; Eickbush a Eickbush, 2007; Alberts a kol., 2008). Z historických důvodů je každý z exonů charakterizován sedimentačním koeficientem, který představuje určitou velikost. U prokaryot najdeme sedimentační koeficienty (v závorkách je uveden průměrný počet nukleotidů) 5S (120), 16S (1550) a 23S (2900), které jsou standardizovány podle bakterie *Escherichia coli*. U eukaryot jsou molekuly rRNA obecně větší, a jejich koeficienty jsou standardizovány podle rRNA molekul z krysích jater. Patří sem následující sedimentační koeficienty s průměrným počtem nukleotidů uvedeným v závorkách: 18S (2100), 5.8S (150) a 28S (5050) (Bhagavan a Ha, 2015).



Obr. 1: Organizace ribozomálních RNA (rRNA) genů u eukaryotních organismů (převzato z Eickbush a Eickbush, 2007).

1.1.1 18S rDNA

Malá ribozomální podjednotka (18S) je dobře známý gen, velmi často používaný k molekulárním analýzám a rekonstrukcím fylogenetických vztahů nejrůznějších organismů. Je organizována do transkripčních jednotek s ostatními ribozomálními geny a obecně u eukaryot existuje více kopií tohoto genu, uspořádaných v tandemových repeticích (Vrba a kol., 2011). 18S rDNA je často používána i k rekonstrukcím fylogenetických vztahů u různých skupin protist, včetně parazitů skupiny Apicomplexa (Morrison a kol., 1997; Carreno a kol., 1998; Gleeson, 2000; Zhao a Duszynski 2001a, b, c; Matsubayashi a kol., 2005).

Tento gen je také používán pro analýzy polymorfismu délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism (RFLP) analýzy), též označované jako riboprinting, během kterých lze pomocí PCR amplifikace RNA genů – jako je například 18S rDNA – s následným použitím restričních enzymů studovat taxonomii, fylogenezi a genetickou diverzitu různých eukaryotických organismů, detekovat kryptické druhy, sekvenční polymorfismus, či hodnotit genetické vzdálenosti mezi druhy (Clark, 1997). Výhodou riboprintingu je potřeba jen malého množství rRNA pro PCR amplifikaci, bez nutnosti klonování či sekvenování (Clark, 1997). U kokcií představuje riboprinting efektivní metodu, jak získat molekulární data i ze vzorků obsahujících pouze malé množství oocyst (Hnida a Duszynski, 1999a).

Bylo opakovaně prokázáno, že jaderná 18S rDNA není kvůli své vysoké konzervativnosti vhodná pro analýzy vnitrodruhových vztahů, ani vztahů blízkce si příbuzných druhů organismů (Hnida a Duszynski, 1999a; Zhao a Duszynski, 2001b, c; Aktas a kol., 2007; Tian a kol., 2013). Rovněž bylo prokázáno, že se nehodí ani pro fylogenetické analýzy morfologicky si podobných oocyst kokcií, jak bylo potvrzeno u rodu *Eimeria*, kde dva druhy kokcií nebyly rozlišeny i přesto, že odchty jejich hostitelů proběhly na místech od sebe vzdálených tisíce kilometrů (Hnida a Duszynski, 1999a).

Jelikož se však u kokcií jednalo o jeden z prvních genů, který se začal používat pro fylogenetické analýzy, je stále – víceméně z historického hlediska či z jakési setrvačnosti – používán i v současnosti. Nemalou roli přitom hraje i skutečnost, že pro kokcie se v databázi GenBank zatím stále nachází největší počet sekvencí právě tohoto genu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>¹). Tudíž je poměrně snadné vytvořit alignment zahrnující různé rody a druhy kokcií z různých druhů hostitelů. Analýzy tohoto genu jsou pak vhodné

k hodnocení evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy eimerií (tj. k hodnocení mezidruhových vztahů).

U kokcií byl tento marker úspěšně použit například pro klasifikaci a zjištění mezidruhových vztahů u nově popsáných druhů (např. Šlapeta a kol., 2001; Matsubayashi a kol., 2005), dále pro objasnění taxonomického zařazení některých rodů (například příbuznost rodu *Cyclospora* ke kokciím rodu *Eimeria* – Relman a kol., 1996; příbuznost savčích isospor (dnes rod *Cystoisospora*) kokciím čeledi Sarcocystidae – Carreno a kol., 1998; Franzen a kol., 2000), či k prokázání monofylie kmene Apicomplexa (Barta a kol., 1991).

Fylogenetické analýzy založené pouze na tomto genu však odrážejí fylogenezi pouze tohoto genu, nikoliv nutně fylogenezi daného organismu. Proto již Tenter a kol. (2002) navrhovali kombinovat 18S rDNA analýzy s analýzami dalších markerů, například mitochondriálních nebo plastidových.

1.1.2 5.8S rDNA

Ribozomy eukaryot a prokaryot jsou si podobné, avšak u eukaryot najdeme navíc několik dalších proteinů, větší molekuly rRNA, a také, jak se zdá, evoluční novinku 5.8S rDNA (Walker a Pace, 1983). Je to nekódující RNA komponent velké podjednotky eukaryotických ribozomů, který je důležitý při proteinové translaci, a také při ribozomální translokaci (Elela a Nazar, 1997). Nachází se ve všech eukaryotických cytoplazmatických ribozomech a studie naznačují, že je vysoce konzervativní; například nukleotidové sekvence 5.8S si jsou velmi podobné u myši, krys, želv, a dokonce i u člověka. Přibližně 75 % sekvencí je také homologních s kvasinkami (Rubin, 1973; Nazar a kol., 1975, 1976; Nazar a Roy, 1978; Nazar, 1980). 5.8S lze využít ve fylogenetických analýzách, kde může poskytnout užitečné informace o příbuznosti mezi různými řády uvnitř kmene, jako tomu bylo například ve studii Chilton a kol. (1996), kteří porovnávali vztahy řádu Strongylida s řády Rhabditida a Tylenchida v rámci kmene Nematoda (hlístice).

1.1.3 28S rDNA

28S rDNA je největší rDNA-kódující oblast. Skládá se z několika informačních jednotek, které patří do dvou oblastí. První se označuje jako „core“, je nezbytná pro funkce ribozomu a je relativně konzervativní, druhá obsahuje dvanáct D domén, které jsou divergentní a vysoce variabilní (Hassouna a kol., 1984; Lenaers a kol., 1989; Raué a kol., 1990).

28S rDNA je často používána k analýzám fylogenetických vztahů mezi vzdálenými druhy, vzhledem k její relativně pomalé evoluční rychlosti. Současně bylo zjištěno, že se u ní vyskytuje četné množství delecí a inzercí bazí (tzv. indely), čímž je komplikovanější vytvořit alignment z těchto sekvencí (Okamoto a kol., 2009).

Ki (2009) porovnával výsledky 18S rDNA a 28S rDNA analýz u řas *Noctiluca scintinallis* (Dinophyceae; Noctilucales). Z této studie vyplynulo, že 28S rDNA poskytla větší rozlišení, a také byla více variabilní. Další studie (Okamoto a kol., 2009) uvádí, že 28S rDNA je účinnější například ve vnitrodruhových analýzách vybraných druhů roupů z rodu *Syphacia* (Nematoda: Oxyurida) než cytochrom c oxidáza podjednotky 1. Obě studie se ale shodují v tom, že by se měl k fylogenetickým analýzám 28S rDNA přidat ještě další marker, aby byly analýzy robustnější.

1.1.4 Internal transcribed spacers 1 a 2 (ITS 1 a ITS 2)

ITS 1 je první a ITS 2 je druhá nekódující oblast ribosomálního genového clusteru, složeného ze tří genů (18S rDNA, 5.8S rDNA a 28S rDNA), které jsou transkribovány do RNA, ale nejsou translatovány do proteinu. Česky bývají nazývány jako „mezerníky“. Úsek tří genů je transkribován jako samostatný transkript oddělený dvěma regiony ITS 1 a ITS 2, které jsou následně vystřiženy (spliced out) a dále neslouží žádnému účelu. Z tohoto důvodu na ně působí velmi slabý selekční tlak a mohou u nich velmi rychle nastat substituční mutace, což může být velmi užitečné pro fylogenetické analýzy zabývající se příbuzností blízkých druhů (Cruickshank, 2002).

Mezi výhody ITS regionů patří intergenomická variabilita, díky které mohou být využity pro fylogenetické analýzy na úrovni čeledí, rodů, i druhů (Baldwin, 1992; Baldwin a kol., 1995); dále jsou oproti ostatním jaderným markerům snadněji izolovány díky tandemovým repetičím (Álvarez a Wendel, 2003).

Nevýhodou ITS regionů je jejich vysoká náchylnost k homoplaziím. Dále vysoký počet tandemových repetičí, a tím pádem i kopií genů. U některých kopií se mohou vyskytnout degenerace, a celá kopie genu se tak přemění v tzv. pseudogen. Takto přeměněné kopie jsou buď odstraněny z genomu, nebo tam zůstávají, nelze je amplifikovat, a mohou se samovolně vyvíjet nezávisle na funkčních protějšcích. Pseudogeny tak mohou negativně ovlivňovat výsledky fylogenetických analýz (Álvarez a Wendel, 2003).

ITS 1 sekvence již v minulosti prokázaly, že mohou poskytnout užitečné informace v analýzách na úrovni rodu (nebo i druhu) u širokého spektra organismů (Baldwin, 1993; Bowles a kol., 1995; Messner a kol., 1995; Okamoto a kol., 1997; Hnida a Duszynski, 1999b). Hnida a Duszynski (1999b) využili ITS 1 pro fylogenetické analýzy několika druhů kokcií z rodu *Eimeria*, jejichž oocysty byly morfologicky téměř nerozlišitelné. Z jejich výsledků je patrné, že ITS 1 lze použít pro taxonomické a fylogenetické analýzy morfologicky si podobných druhů. Stejně tak jsou ITS 1 sekvence vhodné, pokud není dostatek oocyst pro některé molekulární metody, jako je například RAPD-PCR.

Navajas a kol. (1999) porovnali sekvence ITS 1 a ITS 2 u několika druhů roztočů z čeledi Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata), a došli k závěru, že ITS 1 sekvence jsou více variabilní, ale také se hůře alignují. ITS 1 oblasti byly také jediné, které vykazovaly známky polymorfismu, ačkoliv jen v malé míře.

ITS 2 oblasti byly zřejmě prvně použity v molekulární fylogenetice Navajasem a kol. (1992) u roztočů z čeledi Tetranychidae (Acari: Prostigmata). Jednalo se o amplifikaci ITS 2 pomocí primerů amplifikujících úseky 5.8S a 28S rDNA. Výsledky studie ukázaly, že ITS 2 oblasti jsou vhodné pro zkoumání fylogenetických vztahů na úrovni rodů. Později Navajas a kol. (1998) použili ITS 2 sekvence v kombinaci s cytochrom c oxidázou podjednotky 1 k analýzám vnitrodruhové variability u roztočů druhu *Tetranychus urticae* a zjistili, že sekvence ITS 2 byly značně homogenní oproti polymorfismu u cytochrom c oxidázy podjednotky 1. Naopak heterogenita ITS 2 sekvencí byla prokázána u klíšťat (Rich a kol., 1997). Navajas a kol. (2000) poté rozšířili dataset o další taxony, a odhalili tak velmi nízkou variabilitu ITS 2 oblastí, což potvrzují i jiné studie (Zahler a kol., 1998; Essig a kol., 1999).

Cruickshank (2002) jako nevýhody ITS 2 uvádí nemožnost amplifikace ITS 2 oblastí u některých druhů univerzálními ITS 2 primery (Fenton a kol., 1997; Yli-Mattiala a kol., 2000). ITS 2 oblasti by se podle něj měly používat pouze u velmi příbuzných druhů, vzhledem k jejich charakteru (viz. odstavec nad).

1.2 Mitochondriální markery

Pro účely molekulárně-fylogenetických analýz patří mezi nejčastěji používané mitochondriální markery cytochrom c oxidáza (CcO) (Cruickshank, 2002; Lodish a kol., 2007; Alberts a kol., 2008; Patwardhan a kol., 2014). CcO je terminální respirační enzym, který katalyzuje redukci molekulárního kyslíku na vodu, a zároveň umožňuje pumpování protonů přes vnitřní mitochondriální membránu (Wikstrom, 1977). Rozděluje se do tří evolučních linií:

typ A (mitochondriální oxidázy), typ B (ba_3 oxidázy) a typ C (cbb_3 oxidázy) (Pereira a kol., 2001), přičemž tři největší membránové podjednotky (COX 1-3) jsou zařazeny do evoluční linie typu A. Podjednotky 1 a 2 zajišťují všechny nezbytné komponenty, potřebné ke katalýze redukce kyslíku a pohonu protonové pumpy. Podjednotka 3 neobsahuje žádná redoxní centra, pouze specifické lipidy, a zajišťuje tak celkovou stabilitu enzymu (Hosler, 2004).

1.2.1 Cytochrom c oxidáza podjednotka 1 (COX 1)

Již Besansky a kol. (2003) naznačili, že by COX 1 mohla být vhodným markerem pro fylogenetické analýzy zabývajícími se evolučními vztahy u blízce příbuzných parazitů, jako například u zástupců skupiny Apicomplexa, a morfologicky si podobných kokcií. Lane (2009) prokázal její informativnost ve fylogenetických analýzách na úrovni druhu, a také zjistil, že může být vhodným doplněním k analýzám jaderných genů. Mitochondriální COX 1 gen získal v poslední době více pozornosti díky rozvíjícímu se DNA barcodingu, jenž se stal nástrojem pro rychlou a přesnou identifikaci různých taxonů, a pomocí COX 1 byl použit i k určení několika nezařazených druhů (Dawney a kol., 2007; Arif a Khan, 2009; Teletchea, 2010). Vznikl tak „Barcode of Life Data System“, do kterého bylo vloženo více než jeden milion sekvencí COX 1, a který je využíván k identifikaci systémů zvířat, včetně parazitů (Ogedengbe a kol., 2011).

COX 1 má podobné využití jako ITS 2, ale vyvíjí se rychleji. Navzdory vysoké frekvenci substitučních mutací se ale doporučuje používat tento marker jen na nižších taxonomických úrovních, jelikož se zdá, že na něj blízká příbuznost druhů nemá vliv (Cruickshank, 2002). Například u organismů, jako jsou někteří zástupci řádu Diptera, kteří mají nízkou vnitrodruhovou i mezidruhovou genetickou variabilitu, se nepodařilo pomocí COX 1 rozlišit přibližně 70 % ze 449 zástupců (Meier a kol., 2006).

1.2.2 Cytochrom c oxidáza podjednotka 3 (COX 3)

Gen COX 3 kóduje podjednotku 3 cytochromu c oxidázy v mitochondriálním genomu. COX 3 polypeptid byl původně identifikován z izolátu *Polytomella* sp. (Chlorophyceae: Chlorophyta), a N-terminální sekvence byly determinovány podle Edmanovy degradace (Pérez-Martínez a kol., 2000). Předpokládalo se, že by se COX 3 mohla podílet na tvorbě COX 1 (Barrientos a kol., 2004), na regulaci kyslíku (Brunori a kol., 1987), nebo v modulaci přenosu elektronů a funkcí protonové pumpy (Lincoln a kol., 2003). Nyní je známo, že COX 3 stabilizuje aktivní centra v podjednotkách 1 a 2, a funguje jako iniciální akceptor protonů (Haltia a kol., 1991; Hosler, 2004; Varanasi a Hosler, 2012). Podjednotka 3 cytochromu c

oxidázy je silně hydrofobní (Alnajjar a kol., 2015), neobsahuje prostetické skupiny (Soto a kol., 2012), a je tvořena strukturními doménami s fosfolipidovými vazebnými místy. Mutace uvnitř těchto domén způsobují úbytek vazebných fosfolipidů, což souvisí s poklesem aktivity přenosu elektronů v podjednotce 3 (Alnajjar a kol., 2015).

COX 3 se používá k fylogenetickým analýzám proto, že má značné evoluční tempo, které vede k větší variabilitě sekvencí, a tím je oproti COX 1 více divergentní (Hikosaka a kol., 2010). Tento fakt také potvrzuje studie Tian a kol. (2013), ve které byly provedeny fylogenetické analýzy pomocí COX 3 k rozlišení několika druhů protistů rodu *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida). V porovnání s 18S rDNA a cytochromem b výsledky naznačují, že COX 3 je vhodný marker pro vnitrodruhové analýzy, díky své vysoké divergenci.

1.3 Cytochrom b

Cytochrom b je mitochondriální protein eukaryotických buněk. Je součástí elektronového transportního řetězce a je hlavní podjednotkou transmembránového cytochromu bc1 (Esposti a kol., 1993; Lodish a kol., 2007; Alberts a kol., 2008; Patwardhan a kol., 2014). Cytochrom b je považován za jeden z nejužitečnějších genů a je běžně používaným mitochondriálním markerem k determinaci fylogenetických vztahů zejména mezi mnohobuněčnými organismy (Irwin a kol., 1991; Meyer, 1994; Johns a Avise, 1998; Castresana, 2001). Analýzy na základě sekvencí cytochromu b mohou také pomoci při klasifikaci rodů u nově objevených druhů (Giao a kol., 1998).

Variabilita sekvencí cytochromu b z něj činí velmi užitečný marker pro analýzy vztahů mezi druhy v rámci stejného rodu nebo čeledi (Irwin a kol., 1991; Castresana, 2001). Proto jeho použití ve fylogenetických analýzách způsobilo změny v klasifikačních systémech, které lépe vystihují evoluční příbuznost mezi jednotlivými druhy (Arnason a kol., 1995; Lara a kol., 1996; LeDuc a kol., 1999). Zároveň má cytochrom b i několik nevýhod, mezi které patří například rozdílné evoluční tempo vývoje jednotlivých linií, saturace na třetí pozici kodonu a omezené množství změn na první a druhé pozici kodonu, což vede k nedostatku fylogenetické informace pro rozlišení fylogenetických vztahů na hlubších úrovních (Mayer, 1994; Farias a kol., 2001).

1.4 Plastidové markery

Plastidy jsou semiautonomní organely, které se nacházejí v buňkách rostlin a řas. Vyskytují se ale i u několika taxonů mořských měkkýšů, nebo také u kmene Apicomplexa ve formě tzv. apikoplastu. Jednotlivé typy plastidů mají důležité funkce, mezi které patří například tvorba aminokyselin a lipidů, zásoba škrobu a olejů, dále udávají zbarvení rostlin, a jsou důležité při fotosyntéze (Bogorad a Vasil, 1991; Lewin, 1993; Bock, 2007; Wise a Hooper, 2007).

Apikoplast je organela typická pro parazity z kmene Apicomplexa. Obsahuje vlastní genom a předpokládá se, že vznikl sekundární endosymbiózou z chloroplastu. První pokusy o popsání apikoplastu, jakožto nově objevené organely, která se lišila od mitochondrie, proběhly již v 60. letech 20. století (Gleeson, 2000; Ralph a kol., 2004). Prvně byl apikoplast morfologicky identifikován u organismu *Eimeria perforans* (Apicomplexa: Conoidasida: Coccidia) a pojmenován jako „spherical bodies“ (Kheysin, 1972).

Apikoplast je svými jedinečnými vlastnostmi populárním cílem výzkumů, zejména kvůli vlastnímu genomu, částečnému metabolismu, proteinovému importnímu mechanismu, ale také kvůli svému nejasnému evolučnímu původu a možnému cíli pro antiparazitické léky (McFadden a Roos, 1999; Roos a kol., 1999; Wilson, 2002; Foth a McFadden, 2003; Singh a kol., 2003; Williams a Keeling, 2003; Ralph a kol., 2004).

1.4.1 Open reading frame 470 (ORF 470)

Open reading frame (ORF) 470 je plastidový gen, který se podle všeho podílí na syntéze proteinů. Zároveň je součástí odpovědi na oxidativní stres, a také se účastní hospodaření se železem (Wilson a kol., 1996; Law a kol., 2000; Ellis a kol., 2001; Wilson a kol., 2003). Je to poměrně nedávno objevený gen a různé studie předpokládají, že je široce rozšířený nebo dokonce univerzální u kmene Apicomplexa (Kilejian, 1975; Gleeson a Johnson, 1999; Gleeson, 2000). Poprvé byl použit ve fylogenetických analýzách spolu s jadernou 18S rDNA na začátku 21. století a výsledky prokázaly, že jej lze použít jako vhodný marker k odvozování vztahů mezi druhy rodu *Eimeria* (Hnida a Duszynski, 1999a).

Zhao a Duszynski (2001c) jako první použili sekvence ORF 470 u kokcií, a to ke zjištění evoluční příbuznosti různých druhů rodu *Eimeria* parazitujících u hlodavců, přičemž průměrná délka jimi získaných sekvencí činila ~ 700 bp. Zároveň ve své studii porovnávali vhodnost použití plastidového ORF 470 s jadernou 18S rDNA a došli k závěru, že sekvence

ORF 470 jsou vhodné k analýzám mezidruhových fylogenetických vztahů u kokcií rodu *Eimeria*. V porovnání s 18S rDNA obsahuje ORF 470 díky častějším nukleotidovým substitucím více fylogenetické informace, zároveň je však i dostatečně konzervativní pro vytvoření alignmentu zahrnujícího velkou škálu taxonů. Autoři také například na základě fylogenetických analýz ORF 470 prokázali, že různé druhy kokcií rodu *Eimeria* získané z 10 severoamerických hlodavců ze tří čeledí klastrovaly do dvou jasně oddělených linií, které se vzájemně lišily přítomností či absencí residua oocysty (OR) (více k této problematice viz kapitola 1.5.1 Fylogeneze).

1.4.2 23S rDNA

23S rDNA je plastidový gen, který je lokalizován ve stroma apikoplastu. Nedávné studie naznačují, že si 23S rDNA ponechala část prokaryotických funkcí a podílí se na translaci proteinů při jejich průchodu membránami. Zároveň se podle všeho také účastní post-translačního transportu proteinů do membrán (Bogorad a Vasil, 1991; Dünschede a kol., 2015; Ahmed a kol., 2016; Maréchal, 2018).

Studie Zhao a kol. (2001a, b) dokazují, že 23S rDNA lze použít pro fylogenetické analýzy. Ve své studii (2001b) porovnávali příbuznost netopýří kokcidie druhu *Eimeria antrozoí* s několika jinými druhy rodu *Eimeria*, parazitujícími u netopýřů a hlodavců. Zároveň bylo také cílem porovnat výsledky 23S rDNA s ribozomálním markerem 18S rDNA. Autoři došli k závěru, že sekvence 23S rDNA jsou vhodné měřítko ke stanovení příbuznosti vybraných druhů z rodu *Eimeria*. U ribozomální 18S rDNA se projevila její konzervativní povaha, čímž se rovněž potvrdilo tvrzení, že není vhodná pro fylogenetické analýzy blízké příbuzných druhů. 23S rDNA se v této studii ukázala jako vhodnější marker.

1.5 Kokcidie jako modelový organismus

Kokcidie jsou jednobuněční obligátně intracelulární paraziti z kmene Apicomplexa. Jsou schopny infikovat široké spektrum hostitelů včetně savců, ještěřů, obojživelníků a ptáků. V rámci třídy Aves se dokonce vyskytují téměř u všech známých řádů ptáků (Kheysin, 1972; Levine, 1988; Duszynski a kol., 2000). Charakteristickým znakem této skupiny parazitů je apikální komplex, který je tvořen rhoptriemi, mikronemy, polárním prstencem z mikrotubulů, a konoidem, který leží uvnitř polárního prstence. Apikální komplex je důležitý při interakci parazita s hostitelem, jelikož umožňuje invazi parazita do buňky hostitele. Zároveň také slouží k uchycení parazita na povrchu hostitelské buňky (Levine, 1988). Dalším typickým znakem této skupiny je apikoplast, který vznikl pravděpodobně sekundární endosymbiózou zelené, nebo červené řasy prokaryotním organismem, který se podobal cyanobakteriím. Skládá se ze čtyř membrán a obsahuje sférická tělíška, která těsně spolupracují s mitochondrií. Apikoplast napomáhá metabolickým procesům, DNA replikaci, transkripci i translaci, a zároveň také kóduje přibližně 50 proteinů. Pro tyto vlastnosti je cílem vývoje léčiv, která mají za úkol vyřadit tuto organelu z provozu, a tím zamezit následnému šíření parazitární infekce (Lim a McFadden, 2010). Kokcidie představují značně různorodou skupinu parazitických protist. Některé druhy jsou monoxenní, to znamená, že se vyvíjejí jen přes jednoho hostitele, a mohou tak být vysoce hostitelsky specifické. Naproti tomu heteroxenní druhy mají ve svém vývojovém cyklu několik různých hostitelů (Tenter a kol., 2002). Proniknutí kokcidie do buněk hostitele a jejich následné namnožení může vyvolat infekční onemocnění, které se obecně nazývá kokcidióza. Kokcidie tak mohou mít negativní ekonomický dopad, zejména v chovech hospodářských zvířat (Williams, 1999; Chapman, 2014). V poslední době se zvyšuje zájem o kokcidie volně žijících zvířat, a to z důvodu studia jejich vlivu na populace, ekologii a evoluci jejich hostitelů (Knight a kol., 2018).

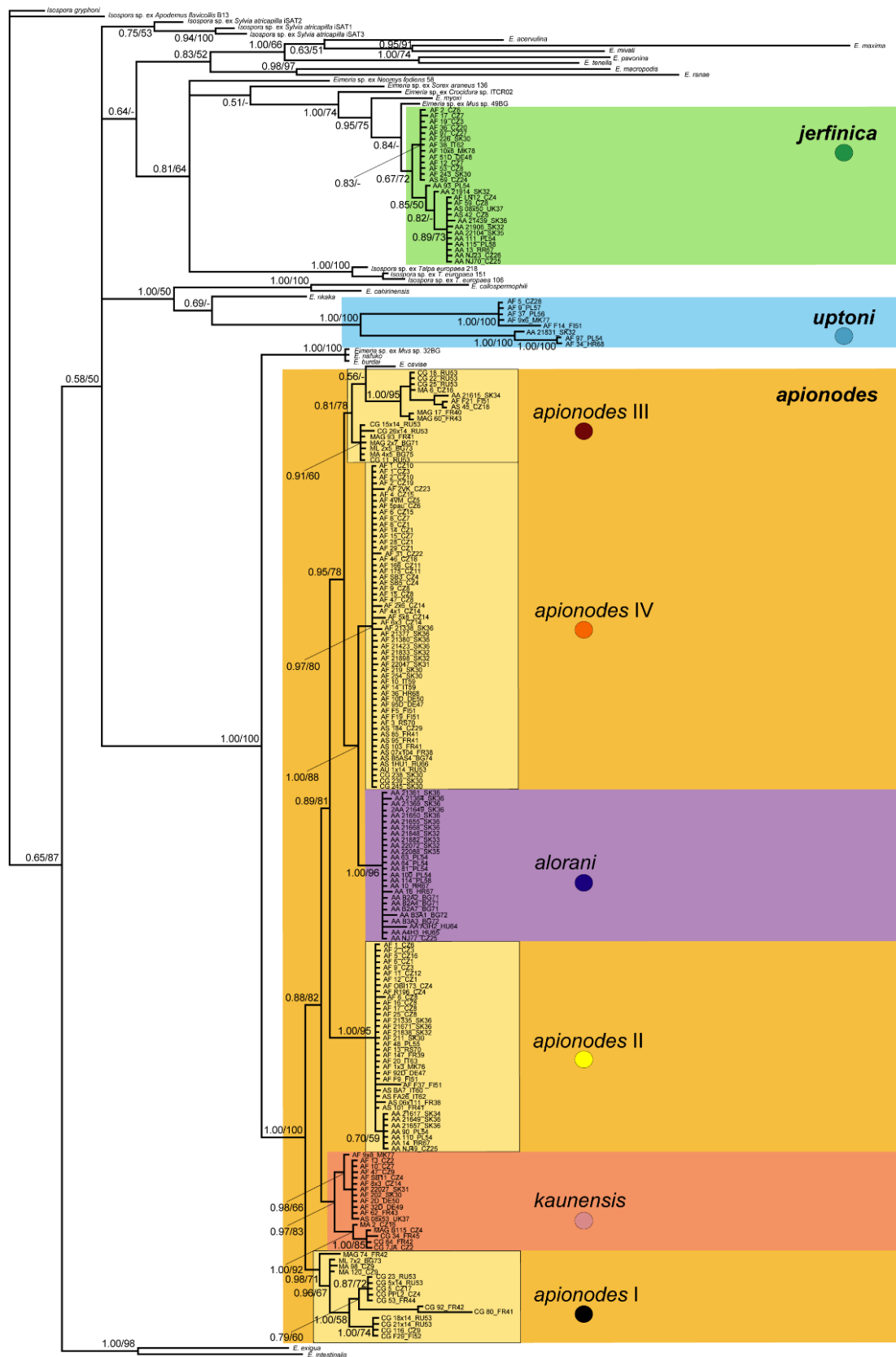
1.5.1 Fylogeneze

Tvrzení, že je kmen Apicomplexa monofyletický, nasvědčovalo již v minulosti několik studií (například Johnson a kol., 1987, 1990). Avšak až Barta a kol. (1991) tuto skutečnost potvrdili pomocí molekulárních metod. Další studie zároveň ukazují, že skupiny tvořící kmen Apicomplexa již monofyletické nejsou; jedná se o skupiny Aconoidasida a Conoidasida, ale i o skupinu Coccidia (Conoidasida), do které patří kokcidie rodu *Eimeria* (Adl a kol., 2012). Většina molekulárně-fylogenetických studií v rámci kmene Apicomplexa je zaměřena zejména na lékařsky či veterinárně významné taxony (Barta a kol., 1997; Kvičerová a kol., 2008; Pakandl, 2009; Wellehan, 2016; Clark a kol., 2017; Knight a kol., 2018).

Pro monoxenní kokcidie rodu *Eimeria* je typické, že se dělí na několik hostitelsky specifických linií, které parazitují například u hlodavců, králíků, skotu nebo drůbeže (Barta a kol., 1997; Matsubayashi a kol., 2005; Kvičarová a kol., 2008; Knight a kol., 2018). Příbuzenskými vztahy hlodavčích kokcidií rodu *Eimeria* se dosud zabývalo několik studií. Již práce Reduker a kol. (1987), která studovala vztahy mezi vybranými druhy eimerií u hlodavců čeledi Muridae na základě morfologických znaků oocyst a izozymových dat naznačila, že tvoří dvě linie, ve studii pojmenované jako typ A a typ B. Ve výsledku se příbuznost obou typů zakládala spíše na morfologické podobnosti vysporulovaných oocyst než na podobnosti v hostitelských spektrech. Zhao a Duszynski (2001c) použili ve fylogenetických analýzách plastidový gen ORF 470 a jaderný gen 18S rRNA ke zjištění fylogenetické příbuznosti 10 druhů hlodavčích eimerií, a došli k podobnému závěru jako předchozí studie. V další studii zvolili Zhao a Duszynski (2001a) opět jadernou 18S rDNA a nově také plastidový gen 23S rRNA. Výsledky tentokrát rozdělení hlodavčích eimerií na dvě linie nepotvrdily, vzhledem k většímu počtu analyzovaných eimerií a větší variabilitě v morfologii analyzovaných oocyst. Pro eimerie typu A byla charakteristická malá variabilita ve velikosti a tvaru vysporulovaných oocyst, jejichž součástí bylo také reziduum oocysty a přítomnost jedné nebo dvou polárních granul. Naopak vysporulované oocysty eimerií typu B byly více variabilní ve velikosti a tvaru. Zároveň jim také chybělo reziduum oocysty, které se ukázalo být hlavním znakem pro rozdělení hlodavčích eimerií na tyto dvě linie. Srovnatelné výsledky získali také Kvičarová a kol. (2008) u eimerií parazitujících u králíků na základě jaderné 18S rDNA. Podobně jako u výše zmíněných studií, fylogenetické analýzy rozdělily eimerie králíků na dvě linie, přičemž u jedné se opět vyskytovalo reziduum oocysty, u druhé nikoli. Hypotéza existence dvou linií hlodavčích eimerií byla překonána až zařazením dalších druhů eimerií z různých rodů a čeledí hlodavců do analýz, kdy došlo k vytvoření ještě třetí linie (Kvičarová a kol., 2011), nebo dokonce několika samostatných linií (Kvičarová a Hypša, 2013; Mácová a kol., 2018).

Na předchozí výzkumy navazuje recentní rozsáhlá studie Mácová a kol. (2018), která se zabývala vlivy hostitelské specifity a fylogenetickými vztahy kokcidií rodu *Eimeria* parazitujících u hlodavců z čeledí Muridae (rod *Apodemus*) a Arvicolidae (rody *Microtus* a *Myodes*). Pro účely tohoto výzkumu probíhaly odchyty hlodavců v různých oblastech Evropy po několik let. Fylogenetické analýzy byly provedeny na základě jaderné 18S rDNA, a mitochondriálního genu COX 1. Eimerie získané z hlodavčích čeledí Muridae a Arvicolidae klastrovaly v několika dobře podpořených skupinách, což dalo vzniku třem hlavním jasně odděleným monofyletickým liniím, které byly pojmenovány na základě morfologické

podobnosti s dosud popsányými druhy eimerií z myšic rodu *Apodemus* – *E. apionodes*, *E. jerfinica* a *E. uptoni* (Obr. 2). Linie *E. apionodes* byla dále rozdělena na podlinie *E. apionodes* I-IV a na parafyletické morfotypy *E. alorani* a *E. kaunensis*. Jednotlivé linie se od sebe lišily stupněm hostitelské specifity. Vyšší hostitelská specifita byla zaznamenána u podlinie *E. apionodes* I, která zahrnovala pouze hlodavce z čeledi Arvicolidae. Podlinie *E. apionodes* III a morfotyp *E. kaunensis* měly hostitelskou specifitu nižší, a byly tvořeny vzorky z čeledí Muridae i Arvicolidae; u *E. apionodes* IV ale převládaly vzorky z rodu *Apodemus*. Linie *E. jerfinica* a *E. uptoni* zformovaly samostatné monofyletické skupiny, fylogeneticky vzdálené od linie *E. apionodes*, které byly striktně hostitelsky specifické k rodu *Apodemus*. Hostitelskou specifitu k rodu *Apodemus* prokázaly také podlinie *E. apionodes* II a morfotyp *E. alorani*, přičemž morfotyp *E. alorani* byl hostitelsky specifický výhradně pro myšici temnopásou, *Apodemus agrarius* (Mácová a kol., 2018).



0.1

Obr. 2: Fylogenetický strom získaný analýzou BI na základě sekvencí COX 1 kokcií rodu *Eimeria*, která byla zaměřena na eimerie myšovitých a hrabošovitých hlodavců (převzato z Mácová a kol., 2018).

1.5.2 Taxonomie

Kmen Apicomplexa představuje různorodou skupinu protozoí, pro které je typická přítomnost apikálního komplexu ve vývojovém stadiu zoitů (Levine, 1970; Cox, 1994; Tenter a Johnson, 1997; Tenter a kol., 2002). S narůstajícími znalostmi v oblasti morfologie, životních cyklů a hostitelské specifity organismů se postupně začal ke klasifikaci protozoí používat širší rozsah fenotypových znaků (Cox, 1991; Tenter a kol., 2002). Proto bylo během druhé poloviny 20. století navrženo několik klasifikačních systémů protozoí, včetně kokcií. Rozvoj metod molekulární biologie vedl začátkem 21. století k velké taxonomické revizi protozoí, která byla založena na kombinaci fenotypových a molekulárních znaků. V červenci roku 2001 se konala debata o klasifikaci protozoí zaměřená zejména na kokcidie rodu *Eimeria*, které představují jednu z nejpočetnějších skupin parazitických protozoí (Tenter a kol., 2002).

Klasifikace druhů kokcií je často považována za nepřesnou, protože mnohdy jsou k dispozici jen vzorky trusu hostitelů, které obsahují exogenní vývojová stádia ve formě oocyst. Endogenní stádia, která se vyvíjejí v nejrůznějších tkáních hostitele, většinou nebývají k dispozici, protože hostitele lze jen těžko vyhledat nebo podrobit pitvě, v některých případech může být také ohrožený nebo zákonem chráněný (Williams a kol., 2010; Chapman a kol., 2013). Vzhledem k taxonomickým komplikacím a k existenci velkého množství zdrojů a dat byla založena internetová stránka „The Coccidia of the World“ (biology.unm.edu²), která má za cíl zaznamenávat a řešit problematiku a platnost dosud popsáných druhů kokcií. Stránku spravují prof. Donald Duszynski a Lee Couch z Nového Mexika v USA. Momentálně největší část této databáze představuje skupina Eimeriorina.

Ve své práci jsem se zabýval především monoxenním rodem *Eimeria*, který je jednou z taxonomicky nejkontroverznějších skupin protozoí. Do současnosti proběhlo několik taxonomických revizí mezinárodní komisí (Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists) (Cox, 1991, 1994; Tenter a kol., 2002). Já jsem vycházel z recentně uznávané klasifikace dle Adl a kol. (2012), která uvádí zařazení kokcií rodu *Eimeria* následovně:

Eukaryota (Whittaker a Margulis, 1978)

Super-skupina: Sar (Adl a kol., 2012)

Skupina: Alveolata (Cavalier-Smith, 1991)

Skupina: Apicomplexa (Levine, 1980)

Skupina: Conoidasida (Levine, 1988)

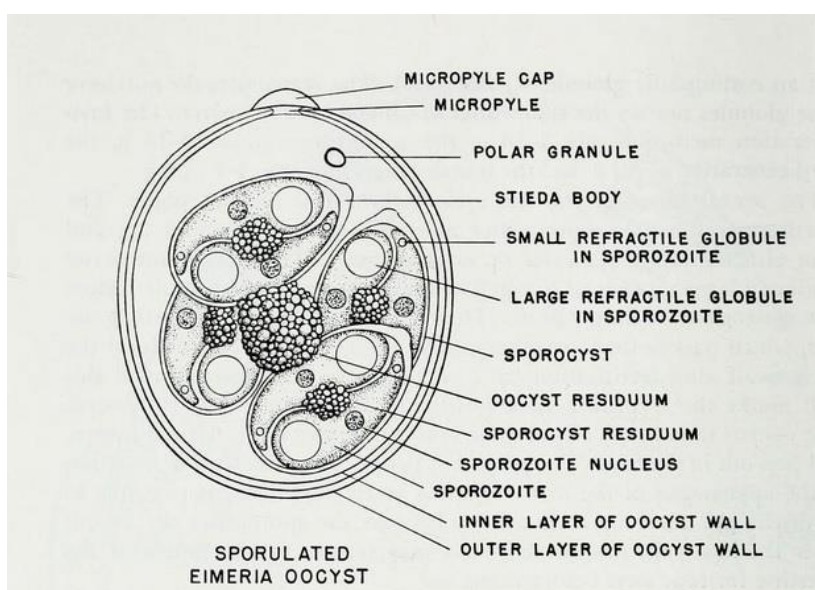
Skupina: Coccidia (Leuckart, 1879)

Skupina: Eimeriorina (Léger, 1911)

1.5.3 Morfologie oocyst a determinace kokcií rodu *Eimeria*

Jednotlivé rody kokcií se mezi sebou liší počtem sporocyst v oocystě a počtem sporozoitů ve sporocystě. Kokcie rodu *Eimeria* mají 4 sporocysty, přičemž v každé se nacházejí 2 sporozoiti. Většina druhů eimerií byla popsána pouze na základě morfologie vysporulovaných oocyst. Některé druhy nemají všechny morfologické znaky, uvedené na Obr. 3, a tak přítomnost nebo absence těchto znaků napomáhají rozpoznání či určení konkrétního druhu. Pro determinaci je důležitá délka, šířka, a poměr délky a šířky (tzv. shape-index, SI) u oocyst a sporocyst kokcií. Oocysty se mezi sebou liší tvarem, charakterem stěny a strukturami uvnitř oocysty. Často se pro popis tvaru oocysty nepřesně používá termín „oválná“, přičemž pokud je jeden pól kulatější než druhý, je tento tvar označován jako „vejcovitý“. Jestliže je oocysta na obou pólech stejná, označuje se jako „elipsoidní“. Vnější stěna oocysty je nejčastěji jedno-, nebo dvouvrstvá, výjimečně třívrstvá. Může být hladká nebo drsná. Některé druhy mají ve vnější stěně pigment, který udává zbarvení oocysty. Často jde o hnědou a žlutou barvu, která může být u různých druhů intenzivnější, nebo naopak světlejší. Na jednom pólu oocysty se může nacházet ztenčení, tzv. micropyle, které může být kryto čepičkou. Při procesu excystace (viz kapitola 1.5.4) tudíž z oocysty unikají sporozoity. Uvnitř oocysty se mohou nacházet reziduální tělíska, jejichž velikost a charakter (např. kompaktní, difuzní, vakuolární) se mezi druhy liší. Jedná se o nahromaděné lipidy, které nebyly spotřebovány během procesu sporogonie. Sporocysty se také vyznačují několika klíčovými determinačními znaky. Obvykle se liší tvarem, přičemž i jejich stěna může mít různou tloušťku. Dalším určovacím znakem je Stiedovo tělísko, konkrétně jeho přítomnost či absence, tvar a rozměry; toto tělísko je umístěno na jednom z pólů sporocysty a umožňuje vypuštění sporozoitů během procesu excystace. Ve sporocystě se může nacházet reziduum sporocysty,

keré je buď kompaktní, nebo je složeno z několika roztroušených granulí. Konečným stádiem sporogonie jsou sporozoity. Tyto útvary jsou nejčastěji protáhlé, a na jednom pólu se rozšiřují. Tvarem však mohou být značně různorodé – popsány jsou například válcovitý, hruškovitý, banánovitý či dokonce i špendlíkovitý tvar. Součástí sporozoitu je velké a malé refraktilní tělísko, která jsou bílkovinného původu. Velké refraktilní tělísko se nachází v rozšířené části sporozoitu, malé refraktilní tělísko na druhém pólu v zúžené části sporozoitu; mezi nimi je obvykle uloženo jádro sporozoitu (Levine a Ivens, 1965; Kheysin, 1972; Duszynski a Wilber, 1997).



Obr. 3: Morfologické determinační znaky u vysporulované oocysty eimerie (převzato z Levine a Ivens, 1965).

1.5.4 Životní cyklus

Životní cyklus kokcií lze rozdělit podle počtu hostitelů na monoxenní, u kterého figuruje pouze jeden hostitel a na heteroxenní, jejichž životní cyklus zahrnuje několik hostitelů. Dále lze životní cyklus rozdělit na nepohlavní a pohlavní část. Životní cyklus skupiny Eimeriorina je monoxenní, a je rozdělen do čtyř fází: sporogonie, excystace, merogonie, a gametogonie (Levine a Ivens, 1965; Kheysin, 1972; Duszynski a Upton, 2001; Allen a Fetterer, 2002).

Oocysty kokcií čeledi Eimeriidae jsou vylučovány do vnějšího prostředí ve výkalech hostitele, přičemž v tomto stádiu obsahují pouze jednu buňku označovanou jako sporont. Za přítomnosti kyslíku, a při vhodné vlhkosti a teplotě, se sporont diferencuje a vytváří sporocystu, která obsahuje infekční sporozoity. Tento proces se označuje jako sporulace; trvá hodiny až několik dnů, a jeho délka trvání je důležitá pro druhovou determinaci kokcií.

Pozřením vysporulovaných oocyst vhodným hostitelem dojde k jejich rozpadu, což vede k uvolnění sporozoitů, které napadají epitelální buňky gastrointestinálního traktu, nejčastěji tenkého střeva, a mění se v první generaci schizontů. Schizonty rostou, dělí se, a přibližně po 36 hodinách zformují první generaci merogonie čítající 20 až 36 merozoitů (Levine a Ivens, 1965; Kheysin, 1972; Allen a Fetterer, 2002).

Merozoity následně opouštějí epitelální buňky a vstupují do dalších buněk, kde zformují druhou generaci schizontů, které rostou a produkují 10-14 merozoitů druhé generace přibližně do dvou dnů po infekci. Tento proces se může ještě několikrát opakovat (počet cyklů merogonie se zdá být pro různé druhy fixní, a tudíž charakteristický), kdy generační merozoity, které následně vstupují do pohlavní fáze životního cyklu, jsou produkovány jako poslední, přibližně po třech až čtyřech dnech po infekci. Merozoity poslední generace vstupují do nových epitelálních buněk, kde tvoří samčí mikrogametocyty, nebo samičí makrogamety (Levine a Ivens, 1965; Kheysin, 1972; Duszynski a Upton, 2001).

Během gametogonie produkují mikrogametocyty vícenásobným dělením velké množství bičíkatých mikrogamet. Makrogamety rostou a obsahují plastické granule (tzv. wall-forming bodies), které se během zrání přesouvají k obvodu buňky. Po oplození makrogamety mikrogametou tyto granule splynou, a vytvoří stěnu oocysty. Oocysta poté opouští hostitelskou buňku, vstupuje do lumenu střeva, a spolu s výkaly se pak dostává do vnějšího prostředí. Tímto je životní cyklus uzavřen. Prepatentní perioda (interval od pozření vysporulované oocysty hostitelem do opuštění nové oocysty z téhož hostitele do vnějšího prostředí) trvá několik dní, a je rovněž pro jednotlivé druhy kokcií specifická. Interval, po který jsou oocysty vylučovány v trusu hostitele do vnějšího prostředí, se nazývá patentní perioda, a je rovněž charakteristický pro jednotlivé druhy kokcií. Některé sporozoity nevstupují do hostitelských buněk ihned, a mohou přečkávat v lumenu střeva po několik dnů (Kheysin, 1972; Knight a kol., 2018).

Pokud není hostitel znovu infikován, je kokcióza limitovaná. Po průchodu sexuální fází životního cyklu a vytvoření oocyst, které opustí hostitele, je infekce u konce. Reinfekce je možná, závisí však na imunitě hostitele vytvořené během primární infekce. Dále závisí na podmínkách vnějšího prostředí, ve kterém se oocysta nachází. V některých případech, jako jsou hromadné chovy zvířat, dochází k reinfekcím hostitele často, a to zejména z důvodu kontaminace podestýlky, nástrojů a ploch oocystami (Duszynski a Upton, 2001; Allen a Fetterer, 2002; Knight a kol., 2018).

1.5.5 Hostitelská specifita

Za hostitelskou specifitu se považuje schopnost parazita infikovat určitou škálu hostitelů a dokončit v nich svůj vývoj, a představuje jednu ze základních charakteristik parazitických taxonů. V parazitologii byla tato vlastnost tradičně považována za vysoce konzervativní, což vedlo k rozvoji studií zabývajících se koevolucí a kospeciací mezi hostitelem a parazitem. Vlivy, na nichž závisí stupeň hostitelské specifity, nejsou příliš známé. Některé studie naznačují, že mezi hlavní faktory patří vitalita, fekundita a genetika parazita a habitat, ve kterém se zrovna vyskytuje. Dále hraje významnou roli ekologie a imunitní systém hostitele (Adamson a Caira, 1994; Duszynski a Upton, 2001; Chapman a kol., 2013; Kvičerová a Hypša, 2013).

Monoxenní kokcidie bývají často značně hostitelsky specifické. Znamená to, že k dokončení svého vývoje musí infikovat konkrétní druh/y hostitelů (Tenter a kol., 2002). Striktní hostitelská specifita, kdy se kokcidie vyvíjí pouze v jednom jediném druhu, je celkem neobvyklá, nicméně ji najdeme například u rodu *Choleoeimeria*, který striktně infikuje konkrétní druhy ještěrů (Jirků a kol., 2009; Szczepaniak a kol., 2016). Pro rod *Eimeria* je typická vyšší hostitelská specifita. Například *Eimeria agrarii* je striktně hostitelsky specifická a parazituje u myšice temnopásé, naopak nižší specifitu najdeme u *Eimeria uptoni*, která je schopná infikovat minimálně čtyři druhy myšic (Higgs a Nowell, 1991; Hůrková a kol., 2005).

1.5.6 Hlodavci jako hostitelé kokcií

Hlodavci (*Rodentia*) jsou řazeni do skupiny placentálních savců. Jsou druhově nejpočetnější a evolučně nejúspěšnější z řádů savců. Se svými více než 2000 druhy tvoří hlodavci téměř polovinu řádu savců (Hutchins a kol., 2003; Merritt, 2010). Většina hlodavců je drobné až střední velikosti, s podobnou anatomickou stavbou těla. Jejich hmotnost se obvykle pohybuje pouze kolem několika desítek gramů, výjimkou je například kapybara, dosahující hmotnosti až 70 kg. Pro hlodavce jsou charakteristické dva páry řezáků (hlodáků), oddělené od zbytku zubů mezerou (diastémou). Společným znakem této skupiny je také krátká doba březosti, přičemž samice mívá obvykle několik vrhů do roka. Fylogeneze hlodavců je považována za velmi složitou, vzhledem k jejich rychlému evolučnímu tempu, což komplikuje i samotnou taxonomii (Hutchins a kol., 2003; Merritt, 2010). Ta se neustále mění, protože i recentně jsou stále objevovány a popisovány nové druhy či dokonce rody (například Rowe a kol., 2016).

Již Levine a Ivens (1965) zaznamenali ve své review existenci 204 druhů kokcií rodu *Eimeria* a jen 10 druhů rodu *Isospora*, parazitujících u hlodavců. O 25 let později Levine a Ivens (1990) zaznamenali již 374 eimerií a 39 isospor parazitujících u hlodavců. Duszynski a Upton (2001) ve své rešeršní práci uvádějí, že kokcie rodu *Eimeria* jsou u hlodavců zastoupeny 415 druhy, a kokcie rodu *Isospora* 40 druhy.

Kokcie rodu *Eimeria* jsou častými parazity myšovitých hlodavců rodu *Apodemus*. Doposud různé morfologické a molekulární studie naznačovaly komplexnost vztahů mezi eimeriemi a jejich hlodavčími hostiteli, přičemž některé druhy eimerií jsou schopny infikovat až několik druhů hlodavců z rodu *Apodemus* (viz kapitola 1.5.5). Nedávné studie zároveň odhalily, že některé eimerie byly schopny hostitelského přeskočku právě u těchto hlodavců. Jako příklad lze uvést nezávislý hostitelský přeskoček kokcií *E. alorani* a *E. apionodes* II z *Apodemus flavicollis* a *A. sylvaticus* na *A. agrarius* (Kvičarová a Hypša, 2013; Mácová a kol., 2018).

U myšic rodu *Apodemus* bylo dosud popsáno více než 30 druhů kokcií rodu *Eimeria* (Higgs a Nowell, 1991). Některé z nich mají nižší hostitelskou specifitu, a tak mohou parazitovat na širším spektru hostitelů (viz. kapitola 1.5.5). Mezi takové řadíme například *E. apionodes*, *E. apodemi* a *E. arcutinae*. Všechny tři mohou parazitovat u třech druhů myšic rodu *Apodemus* – *A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*. Vyšší hostitelskou specifitu vykazují například *E. sylvatica* parazitující u *A. sylvaticus*, nebo *E. agrarii* parazitující výhradně u *A. agrarius* (Levine, 1990; Hůrková a kol., 2005).

1.6 Myšice temnopásá jako modelový organismus

Rod *Apodemus* (Rodentia: Muridae: Murinae) tvoří 14 druhů rozdělených do dvou podrodů – *Apodemus* a *Sylvaemus* (Wilson a Reeder, 2005). Tato klasifikace je založena zejména na stavbě zubů, kostry, měkkých tkání, a na tělesných rozměrech. Myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*) je spolu s *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* a *A. microps/uralensis* jedním ze čtyř druhů myšic rodu *Apodemus*, které se vyskytují na území České republiky.

Myšice temnopásá je drobný hlodavec z čeledi myšovitých. Váží 15-50 g a jeho tělo dorůstá délky až 13 cm. Celková barva srsti se pohybuje v odstínech šedi a hnědi, často se žlutými až rezavými místy. Spodek těla je světlý nebo našedivělý, s bílou srstí na končetinách. Unikátním poznávacím znakem je černý pruh vprostřed hřbetu, 2-3 mm široký, který se táhne

od hlavy až k ocasu. Na ocasu, který je dlouhý až 14 cm, má 120-140 kroužků zrohovatělé kůže. Pro myšice je typické, že je kůže ocasu křehká, snadno praská a stahuje se, a slouží tak jako obranný mechanismus při napadení predátorem. Myšice temnopásá je všežravá, živí se plody, semeny, kořeny, a zelenými částmi rostlin. Výjimkou nejsou ani larvy hmyzu nebo drobní živočichové, jako pavouci a žížaly. Rozmnožuje se od začátku dubna do konce září. Samice obvykle mívá v této době dva až tři vrhy po třech až devíti mláďatech. Březost trvá obvykle 21-22 dní a jednotlivé porody mají mezi sebou přibližně 50 denní pauzu. Sedmý den po narození jsou mláďata již osrstěná, a za další čtyři dny otevírají oči. Jejich pohlavní dospělost nastává mezi 7. a 8. týdnem života. V průměru se dožívá 2-4 let (Nowak, 1999; Dungel a Gaisler, 2002; Anděra a Horáček, 2005; Velenská, 2007).

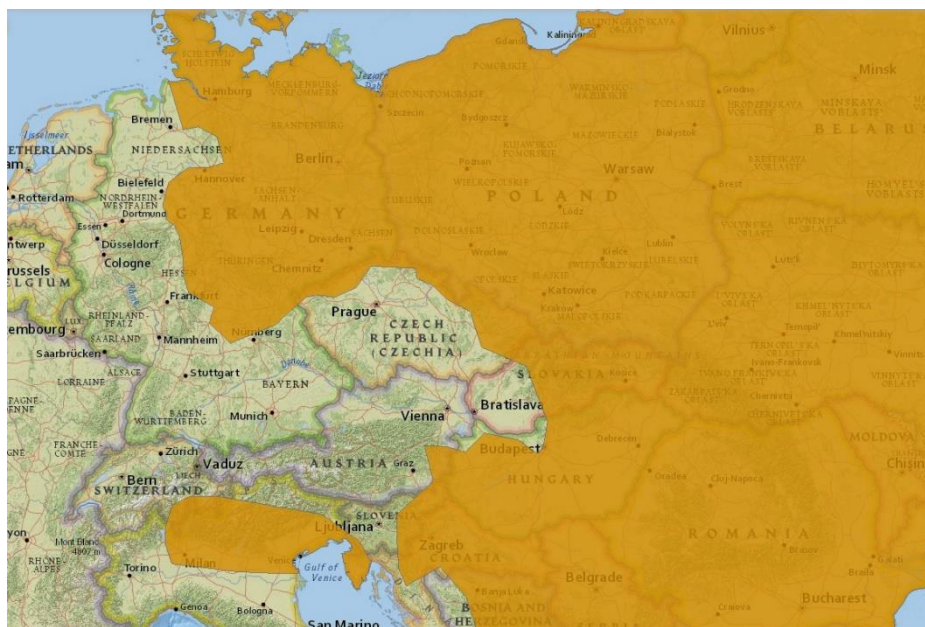
Myšice temnopásá obvykle tráví svůj život v areálu o rozloze kolem 180 m², přičemž hustota osídlení je přibližně 54 myšic na hektar. Na rozdíl od jiných druhů myšic se vyznačuje denní aktivitou. Výborně šplhá, dobře skáče a plave. Typické jsou pro ni vlhčí stanoviště podél řek s bujnou vegetací, lesní okraje a křovinami porostlé stráně. Na podzim a v zimě má tendenci se stahovat do blízkosti lidských sídel, ale převážně hloubí hluboké nory, kde poté přečkává. Systém nor je složen z cirkulárních tunelů, uspořádaných obvykle kolem stromu, s jedním hlavním hnízdem a vedlejšími vstupními tunely. Zároveň si v síti tunelů buduje zásobárny jídla (Nowak, 1999; Velenská, 2007).

Vyskytuje se ve dvou izolovaných oblastech. První oblast tvoří Korea, Čína, Taiwan, a ruský Dálný východ. Druhou oblastí jsou střední Asie, Kavkaz až střední Evropa, konkrétně po Severoněmeckou nížinu a severní Itálii (Obr. 4 a 5). K jejímu intenzivnějšímu pronikání do evropského vnitrozemí brání zalesněná horstva karpatského systému (Anděra a Horáček, 2002). Na Slovensku je výskyt myšice temnopásé rozdělen na dvě větve, které obě začínají na východním Slovensku. První větev, severní, vede podtatranskými kotlinami a pokračuje dále na severní Moravu. Druhá větev, jihovýchodní, kopíruje jižní obvod Karpat (Ambros a kol., 2010). V České republice se myšice temnopásá vyskytuje v odlesněných oblastech, které navazují na severní větev jejího rozšíření. Najdeme ji například na Šluknovsku, Frýdlantsku, Děčínsku, Chebsku, Českolipsku, a také na hřebenech Krušných hor. V některých oblastech Česka se vyskytuje jen ostrůvkově a její populace tam v nepravidelných intervalech zaniká a znovu se obnovuje (jde o tzv. pulzování hranic areálu). Na Moravě a ve Slezsku se myšice temnopásá vyskytuje hojněji. V nedávné době došlo k posunu její hranice blíže na střední Moravu (Olomoucko, Brno, Kroměřížsko a Prostějovsko), některé nové studie uvádějí její výskyt ještě dále na Hodonínsku a Znojemsku (Anděra a Horáček, 2005; Velenská, 2007).

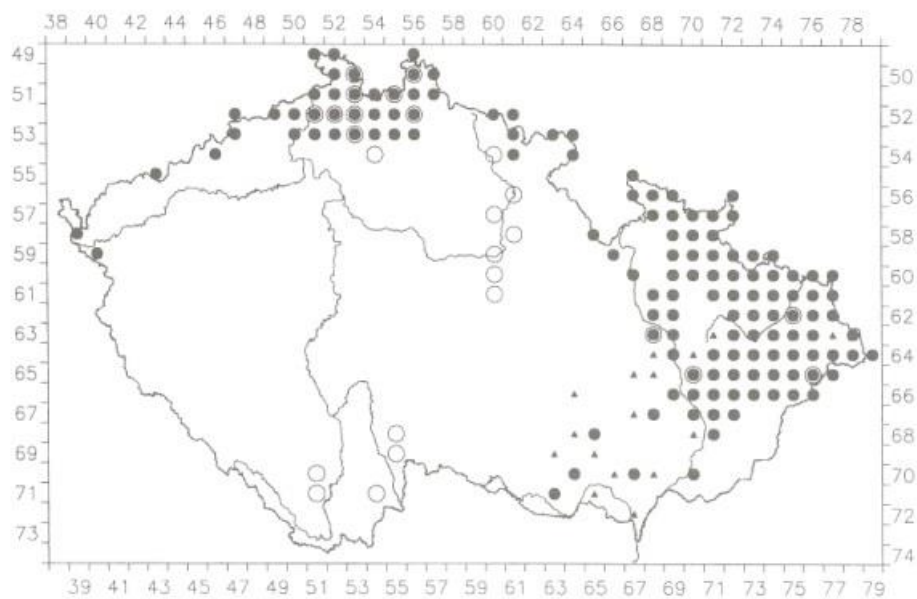
Celkově nejvíce nálezů myšice temnopásé pochází z poloh do 300 m. n. m. Některé další nálezy zejména na horách (Krušné hory, Hrubý Jeseník) datují její výskyt do 800 m. n. m. V Krkonoších se výjimečně objevuje i v nadmořské výšce 1000-1400 m. n. m. (Obr. 6) (Anděra a Horáček, 2005).



Obr. 4: Výskyt myšice temnopásé ve světě (převzato z www.iucnredlist.org³).



Obr. 5: Výskyt myšice temnopásé v Evropě (převzato z www.iucnredlist.org³).



Obr. 6: Mapa výskytu myšice temnopásé v České republice (převzato z Anděra a Beneš, 2002). Prázdné kolečko znázorňuje oblasti výskytu do roku 1950; plné kolečko znázorňuje oblasti výskytu, které byly potvrzeny po roce 1950; trojúhelník znázorňuje data od Farského (1965).

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo rekonstruovat na základě sekvencí genu pro cytochrom c oxidázu III (COX 3) fylogenetické vztahy kokcidií rodu *Eimeria* parazitujících u myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*: Muridae, Murinae) z různých oblastí Evropy, a zhodnotit využitelnost tohoto genu jako vhodného markeru pro analýzy a interpretaci mezidruhových a vnitrodruhových fylogenetických vztahů u kokcidií rodu *Eimeria*.

Zvolený hostitelský druh, myšice temnopásá, pochází narozdíl od ostatních druhů myšic žijících na evropském území z východní Asie. Postupně se rozšířila i do Evropy. Je zajímavým modelovým organismem pro studium kokcidií u volně žijících zvířat, jelikož tím naši laboratoře recentně prokázal, že u kokcidií došlo k hostitelským přeskokům na tento druh myšice z myšic pocházejících z Evropy (*Apodemus flavicollis* a *Apodemus sylvaticus*).

Recentně existuje tlak, aby fylogenetické vztahy byly interpretovány na základě analýz dvou či více genů. V současné době je pro analýzy fylogenetických vztahů kokcidií používán zejména gen pro 18S rRNA a gen pro cytochrom c oxidázu I (COX 1). První zmíněný je vysoce konzervativní a nelze jej použít pro rekonstrukce vnitrodruhových vztahů či vztahů blízce příbuzných druhů. COX 1 gen již je pro takové analýzy vhodný. Rozpačité výsledky podávají plastidové geny pro ORF 470 a 23S rRNA. Proto by bylo vhodné najít ještě další gen, který podpoří výsledky získávané analýzami COX 1 genu. V této bakalářské práci byl vůbec poprvé u kokcidií použit a testován gen pro COX 3.

Pro splnění cílů své práce jsem použil zejména metody molekulární biologie, a analýzy dat pomocí počítačových programů.

K dosažení cílů práce jsem provedl následující dílčí kroky:

- Příprava vzorků pro PCR
- Amplifikace COX 3 genu kokcidií metodou PCR
- Zpracování PCR produktů elektroforézou a jejich vyhodnocení na UV transiluminátoru
- Enzymatické čištění PCR produktů
- Odeslání přečištěných PCR produktů na sekvenaci Sangerovou metodou

- Zpracování sekvencí pomocí počítačových programů
- Tvorba fylogenetických stromů a rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi eimeriemi z myšice temnopásé
- Porovnání fylogenetických vztahů získaných na základě analýz COX 3 genu s informací obsaženou v analýzách COX 1 genu pro tentýž dataset, a pro tytéž morfotypy eimerií

Práce je dílčí součástí širšího projektu laboratoře prof. Hypši, a byla finančně podpořena grantovým projektem GA ČR č. 17-19831S.

3 Metodika

3.1 Původ studovaných vzorků, jejich odběr a vyšetření

Vzorky, které jsem zpracovával, byly získány školitelkou a jejími studenty při odchycích hlodavců v různých oblastech Evropy (Tab. 2; Obr. 13, 14 v příloze). Odchyty byly prováděny do klasických pérových sklapovacích pastí vnađených knotem napuštěným sádlem s hovězím bujonem, případně pomazaným játrovou paštikou. Odchyceným jedincům byl odebrán tračník s trusem, a konzervován ve 4% vodném roztoku dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$). Vzorky trusu byly následně vyšetřeny standardní flotační metodou s použitím Sheatherova cukerného roztoku o hustotě 1,30 (Zajac a Conboy, 2006; Modrý a kol., 2015). Vzorky pozitivní na oocysty kokcií byly podrobeny morfologické analýze a byla z nich komerčním kitem FastDNA[®] SPIN for Soil Kit (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, California, USA) izolována genomová DNA. Já jsem pracoval až s takto vyizolovanou DNA. V dalších kapitolách se tedy podrobněji věnuji metodám, které jsem používal přímo já.

3.2 Molekulární analýzy

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázovou řetězovou reakci jsem použil k amplifikaci genu pro cytochrom c oxidázu III (COX 3). Primery mi byly poskytnuty školitelkou, a jejich sekvence byly získány od Johna R. Barty (University of Guelph, Ontario, Kanada) na základě osekvenovaných mitochondriálních genomů některých kokcií.

Nejprve byla napipetována reakční směs o celkovém objemu 25 μ l. Jednotlivé složky byly zastoupeny v následujícím množství:

- 2,5 μ l pufru (10 \times PCR buffer, 1,5 mM $MgCl_2$; Qiagen[®], Hilden, Německo)
- 2,0 μ l vyizolované DNA
- 1,0 μ l nukleotidů (dNTPs; 10mM roztok – 2,5 mM každé báze)
- 0,5 μ l primeru forward 799R (25 pmol/ μ l; Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, ČR)
- 0,5 μ l primeru reverse 172F (25 pmol/ μ l; Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, ČR)
- 0,2 μ l HotStarTaq[®] Plus DNA polymerázy (5 U/ μ l; Qiagen[®], Hilden, Německo)
- 18,3 μ l PCR H_2O

Tab. 1: Sekvence primerů použitých pro PCR amplifikaci mitochondriálního genu COX 3.

Gen	Primer	
	Forward (172F)	Reverse (799R)
COX 3	5'-AGAAAACCTAAAATCATCATGT-3' (22 bázi)	5'-AAGTGAGTTCGCATGTTTAC-3' (20 bázi)

Polymerázová řetězová reakce probíhala za standardních podmínek v termocykleru Mastercycler[®] Nexus značky Eppendorf. Nejprve byla zahájena iniciální denaturace DNA při teplotě 95 °C po dobu 5 minut, při níž byla aktivována HotStarTaq[®] Plus DNA polymeráza. Poté následoval cyklus tří kroků, který se opakoval celkem 30×. Prvním krokem cyklu byla denaturace DNA při teplotě 94 °C po dobu 45 sekund. Poté následoval druhý krok cyklu, annealing, tedy navázání primerů na DNA podle principu komplementarity, a to při teplotě 48 °C po dobu 45 sekund. Nejvhodnější teplotu annealingu jsem zjistil provedením gradientové PCR při rozmezí teplot 46-51 °C. Třetím krokem cyklu byla elongace, tedy nasednutí Taq polymerázy a syntéza nových vláken DNA. Tento krok proběhl při teplotě 72 °C po dobu jedné minuty. Posledním krokem programu byla finální elongace, která probíhala při 72 °C po dobu 10 minut.

3.2.2 Elektroforéza

Výsledky polymerázové řetězové reakce byly následně zpracovány elektroforetickou metodou. Jednotlivé vzorky byly smíchány s kapkou barviva SYBR Green (přibližně 1 µl na 1 vzorek) a poté přeneseny na 1% agarózový gel. Do samostatné jamky byly napipetovány 4 µl velikostního standardu GeneRuler 1kB DNA Ladder (0,1 µg/µl; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Elektroforéza probíhala v elektroforetických vanách MiniRun GE-100 nebo Advance Mupid[®]-One při 100 až 135 V po dobu přibližně 25 minut. Vizualizace výsledků poté proběhla na UV transiluminátoru a programu Alliance Uvitec Cambridge. Pozitivní PCR produkty byly následně enzymaticky přečištěny.

3.2.3 Enzymatické čištění produktů

K jednotlivým PCR produktům bylo napipetováno 0,2 µl enzymu Exonuclease I (Exo I, 20 U/µl; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 0,2 µl enzymu Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAp, 1 U/µl; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Produkty smíchané s enzymem byly opět vloženy do termocykleru s přednastaveným programem pro čištění. Tento program zahrnoval dva kroky a trval 30

minut. První krok probíhal při teplotě 37 °C po dobu 15 minut, druhý krok probíhal při teplotě 80 °C, také po dobu 15 minut. Takto přečištěné PCR produkty byly následně odeslány společností FedEx[®] na Sanger sekvenaci do firmy MacroGen, Inc. (Amsterdam, Holandsko).

3.2.4 Úprava a zpracování sekvencí

Získané sekvence byly zkontrolovány v programu Sequence Scanner Software 2 (Thermo Fisher Scientific, Inc.; verze 2.0). U vzorků, ze kterých nebyly získány čisté sekvence, byla znovu zopakována PCR, a pokud ani po třetím pokusu nebyla sekvenace úspěšná, vzorek byl vyřazen. Identita úspěšně získaných sekvencí byla dále ověřena v databázi GenBank pomocí algoritmu BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov⁴). Sekvence byly poté uloženy do potřebného formátu v programu EditSeq (DNASTAR, Inc.; verze 5.05), a forward a reverse části následně složeny pomocí programu SeqMan (DNASTAR, Inc.; verze 5.05) v celek, tzv. consensus. Čtecí rámce výsledných celkových sekvencí byly zkontrolovány v programu EditSeq, a pokud bylo zapotřebí (tj. pokud byly posunuty), byly manuálně upraveny.

3.3 Fylogenetické analýzy

3.3.1 Alignment

V databázi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov¹) byly vyhledány sekvence genů pro COX 3 dalších kokcidií rodů *Cyclospora*, *Caryospora*, *Eimeria* a *Isospora* (Tab. 3 v příloze). Následně byl z nich a z vlastních získaných sekvencí (Tab. 2) vytvořen dataset v textovém formátu FASTA. Z něj byl pomocí algoritmu ClustalW (Thompson a kol., 1994) sestrojen alignment v programu BioEdit (Hall, 1999; verze 7.0.5). Alignment byl poté manuálně upraven a ořezán. Stejným způsobem byl vytvořen alignment sekvencí genu COX 1, který poté v analýzách sloužil k porovnání s výsledky analýz COX 3 genu.

3.3.2 Rekonstrukce fylogenetických vztahů

Alignment byl uložen ve formátech FASTA, PHYLIP a NEXUS. Pro Maximum likelihood (ML) analýzu byl použit formát PHYLIP a spočítán nejvhodnější evoluční model pomocí programu SMS: Smart Model Selection (www.atgc-montpellier.fr/sms⁵) jako GTR + Γ + I. Poté proběhl výpočet fylogenetického stromu programem PHYML (Guindon a Gascuel, 2003; verze 2.4.3). Bootstrapové hodnoty byly počítány pro 1000 replikací. Stejně byl zpracován také alignment pro sekvence genu COX 1.

Pro Bayesovskou analýzu byl použit formát NEXUS a program MrBayes (SourceForge, 2003; verze 3.2.2). Evoluční model byl nastaven na GTR + Γ + I. Mcmc byl nastaven pro 10 milionů generací s frekvencí sběru každých 500 generací, a burn-in na 25 %. Stejným způsobem byla zpracována analýza genu COX 1.

V rámci zhodnocení informativnosti COX 3 genu a jeho využitelnosti pro fylogenetické analýzy jsem rovněž sestrojil a analyzoval i konkatenát COX 1 a COX 3 genů. Alignment konkatenovaného datasetu byl vytvořen v programu SeaView (Galtier a kol., 1996; Gouy a kol., 2010; verze 4.6.3). Stanovení nejvhodnějšího evolučního modelu a následné fylogenetické analýzy proběhly stejným způsobem jako u výše popsaných analýz COX 1.

Výsledné fylogenetické stromy ze všech analýz byly vizualizovány v programu TreeView (Page, 2001; verze 1.6.6) a poté graficky upraveny pomocí programu Adobe Illustrator CC (Adobe, Inc.; verze 23.0.2).

4 Výsledky

4.1 Sekvenace

Celkový počet vzorků DNA kokcií z myšice temnopásé, který jsem měl k dispozici, byl 123, přičemž pouze u 74 vzorků se mi podařilo získat čisté sekvenace COX 3 o celkové délce 753 bp pro fylogenetické analýzy. Vzorky analyzované v této práci jsou uvedeny v Tabulce 2, spolu se zemí a lokalitou odchyty, a na základě morfologie zjištěným druhem/morfotypem kokcie. Lokality odchyťů jsou orientačně zaznamenány na obrázcích 13 a 14 v kapitole Přílohy.

Tab. 2: Seznam vzorků použitých pro fylogenetické analýzy genu COX 3 (referenční vzorky použité pro analýzy genu COX 1, které se nevyskytují v COX 3 analýzách, jsou označeny v závorce).

Země	Lokalita	Kód vzorku	Druh/Morfotyp kokcie
ČR	Křečov (okr. Louny)	CSua_54STR	<i>Eimeria</i> sp.
	Křivoklát (okr. Rakovník)	AF_1Kri (COX 1)	<i>E. apionodes</i> IV
	Litvínov (okr. Most)	AF_SB11	<i>E. kaunensis</i>
	Solany (okr. Litoměřice)	AF_1Sol (COX 1)	<i>E. apionodes</i> II
	Solany (okr. Litoměřice)	AF_2Sol (COX 1)	<i>E. jerfinica</i>
	Vykmanov (okr. Karlovy Vary)	AF_1VyK (COX 1)	<i>E. apionodes</i> IV
	Vykmanov (okr. Karlovy Vary)	AF_2VyK (COX 1)	<i>E. apionodes</i> II
	Varnsdorf (okr. Děčín)	AA_3VARN	<i>Isospora</i> sp.
	Bartošovice (okr. Nový Jičín)	AA_NJ23	<i>E. jerfinica</i>
	Staříč (okr. Frýdek-Místek)	AA_1STAR	<i>E. alorani</i>
		AA_2STAR	<i>E. apionodes</i> II
		AA_5STAR	<i>E. apionodes</i> II
	Pusté Jakartice (okr. Opava)	AA_NJ77	<i>E. alorani</i>
Slovensko	Rozhanovce	AA_21364	<i>E. alorani</i>
		AA_21369	<i>E. alorani</i>
		AA_21649	<i>E. alorani</i> , <i>E. apionodes</i> II
		AA_21650	<i>E. alorani</i>
		AA_21655	<i>E. alorani</i> , <i>E. jerfinica</i>
		AA_21657	<i>E. apionodes</i> II, <i>E. alorani</i>
		AA_21668	<i>E. alorani</i>
	Košice – Botanická zahrada	AA_21805	<i>E. jerfinica</i>
		AA_21831	<i>E. uptoni</i>

		AA_21847	<i>E. alorani</i>
		AA_21848	<i>E. alorani</i> , <i>E. apionodes</i> II
	Košice – Anička	AA_21882	<i>E. alorani</i>
	Košice – Botanická záhrada	AA_21914	<i>E. jerfinica</i>
		AA_22072	<i>E. alorani</i>
		AA_22087	<i>E. alorani</i>
	Nižné Kapustníky	AA_22088	<i>E. alorani</i>
		AA_22094	<i>E. jerfinica</i>
		AA_22101	<i>E. uptoni</i>
		AA_22104	<i>E. jerfinica</i>
AA_22105		<i>E. jerfinica</i>	
Hrhov	AA_23473	<i>E. alorani</i>	
Šebastovce	AA_23503	<i>E. jerfinica</i>	
Komárno	AA_23SK16	<i>E. jerfinica</i>	
Bulharsko	Mohyla Kosmatka	AA_B2AGR2	<i>E. alorani</i>
		AA_B2AGR4	<i>E. alorani</i> , <i>E. jerfinica</i>
	Studena (Bjala)	AA_B3AA1	<i>E. alorani</i>
		AA_B3AGR3	<i>E. alorani</i>
Chorvatsko	Lupoglav	AA_CH1E7AGR7	<i>E. alorani</i>
		AA_CH1V3AA14	<i>E. apionodes</i> II
		AA_CH1V7AGR13	<i>E. jerfinica</i>
		AA_CHAA16	<i>E. alorani</i>
		AA_CH1V14AGR11	<i>E. apionodes</i> II
		AA_CH1V15AGR10	<i>E. alorani</i>
	Jamarica	AA_CH3E12AGR37	<i>E. jerfinica</i>
	Sunja	AA_CH4E7AGR57	<i>E. jerfinica</i>
		AA_CH4E9AGR59	<i>E. jerfinica</i>
		AA_CH4E11AGR58	<i>E. uptoni</i>
Kazachstán	Poperechnoe	AA_KAZ27	<i>E. apionodes</i> II
		AA_KAZ28	<i>E. alorani</i>
		AA_KAZ35	<i>E. jerfinica</i>
		AA_KAZ45	<i>E. alorani</i>
	Sekisovka	AA_KAZ66	<i>E. jerfinica</i>
Litva	Zeimai	AA_1Li2	<i>E. alorani</i>
		AA_9Li2	<i>E. apionodes</i> II
Lotyšsko	Livani/Rožupe	AA_1LO3	<i>E. alorani</i>
	Riga	AA_22LO2	<i>E. uptoni</i>
		AA_29LO2K	<i>E. jerfinica</i>
Maďarsko	Kovacsicstanya u Nyírbogát	AA_3HU3	<i>E. jerfinica</i>

		AA_H3A2	<i>E. alorani</i>
	Debrecen	AA_4HU3	<i>E. alorani</i>
	Bugyi	AA_HUB14AAGR2	<i>E. jerfinica</i>
	Keckskeméti Utca	AA_HUD14AA28	<i>E. jerfinica</i>
Polsko	Gant	AA_40PL	<i>E. jerfinica</i>
	Gierzwald	AA_63PL	<i>E. alorani</i>
		AA_64PL	<i>E. alorani</i>
		AA_65PL	<i>E. jerfinica</i>
		AA_100PL	<i>E. alorani</i>
		AA_105PL	<i>Isospora</i> sp.
	Slupno	AA_113PL	<i>E. jerfinica</i>
		AA_115PL	<i>E. jerfinica</i>
		AA_117PL	<i>E. jerfinica</i>
Rumunsko	Hitiaş, Timiş	AA_24RUM16	<i>E. jerfinica</i>
Srbsko	Bela Crkva – Banat	AA_17SRB	<i>E. alorani</i>
	Sremska Mitrovica, Vojvodina	AA_68SRB	<i>E. jerfinica</i>
	Kikinda, Vojvodina	AA_79SRB	<i>E. alorani</i>

Písmena na začátku kódu vzorku označují hostitele: AA, *Apodemus agrarius*; AF, *A. flavicollis*; CSua, *Crocidura suaveolens*.

4.2 Fylogenetické analýzy

4.2.1 Maximum likelihood analýza sekvencí genu COX 3

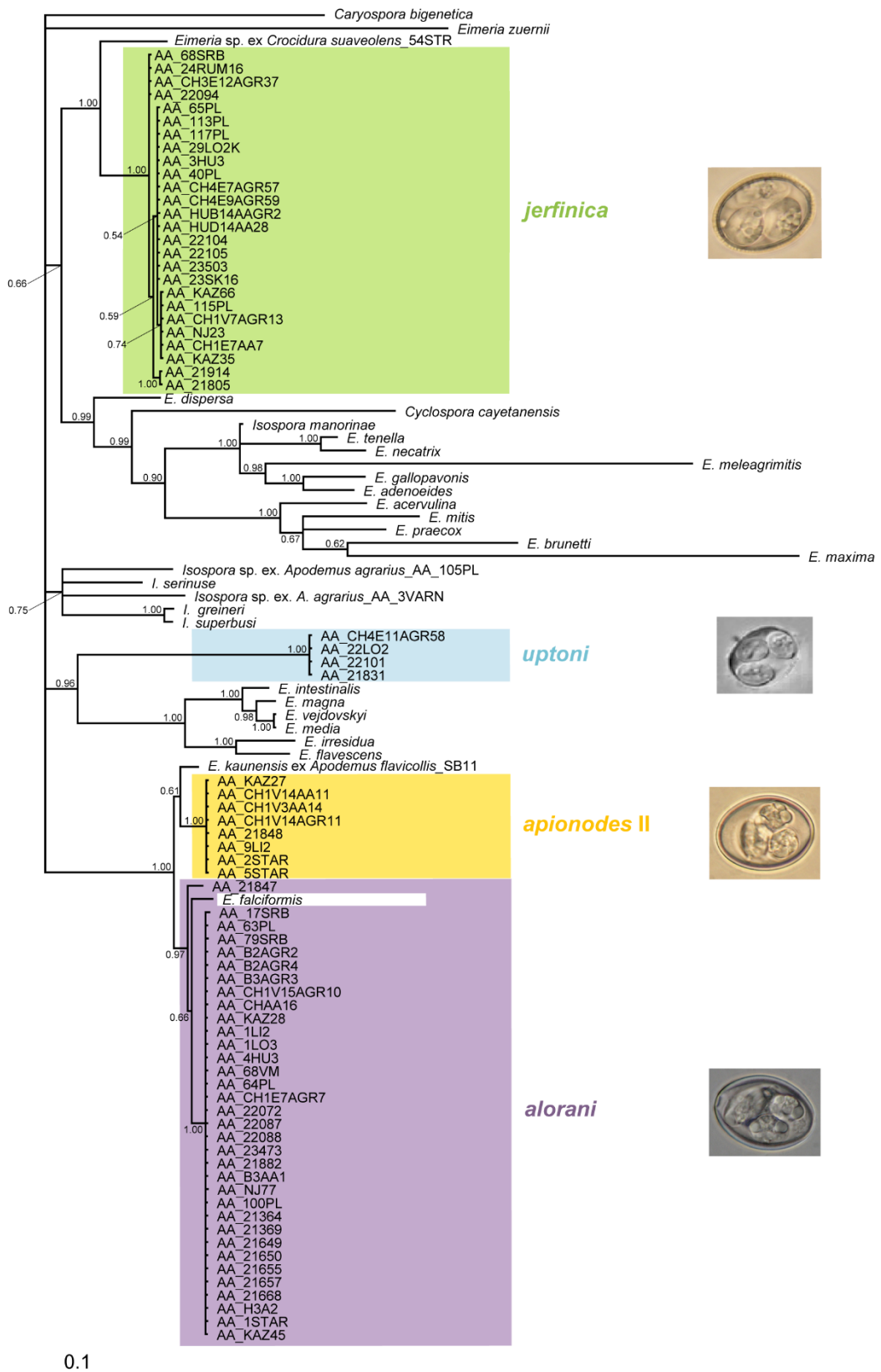
Pro fylogenetickou analýzu maximum likelihood (ML) jsem použil 74 sekvencí genu COX 3 kokcidií, které jsem získal z myšice temnopásé, spolu se sekvencí eimerie z bělozubky šedé a *A. flavicollis* (Tabulka 2), a s 25 sekvencemi kokcidií různých rodů (*Caryospora*, *Cyclospora*, *Isospora*, *Eimeria*,) získaných z databáze GenBank, přičemž většina z nich parazituje převážně u králíků, drůbeže a dobytka. Z datasetu obsahujícího 101 sekvencí a ořezaného na celkovou délku 753 bp byl spočítán fylogenetický strom pomocí programu PHYML s parametry uvedenými v kapitole 3.3.2. Za outgroup byla zvolena sekvence *Caryospora bigenetica*. Fylogenetická analýza rozdělila získané sekvence kokcidií z myšice temnopásé na celkem čtyři jasně oddělené linie, odpovídající čtyřem morfotypům, dříve popsaným v publikaci Mácová a kol. (2018) – *E. alorani*, *E. apionodes* II, *E. jerfinica* a *E. uptoni*. Všechny 4 linie byly dobře podpořeny vysokými bootstrapovými hodnotami, a s výjimkou *E. alorani*, do které se začlenila *E. falciformis* popsaná z myši domácí, byly monofyletické (Obr. 7).



Obr. 7: Fylogenetický strom získaný analýzou ML na základě sekvencí COX 3 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota u uzlů odpovídá hodnotě bootstrapu; hodnoty nižší než 50 % nejsou uvedeny. Strom je zakořeněn taxonem *Caryospora bigenetica*. AA, *Apodemus agrarius*; kód za zkratkou AA odpovídá kódům vzorků, které jsou uvedeny a charakterizovány v Tab. 2.

4.2.2 Bayesovská analýza sekvencí genu COX 3

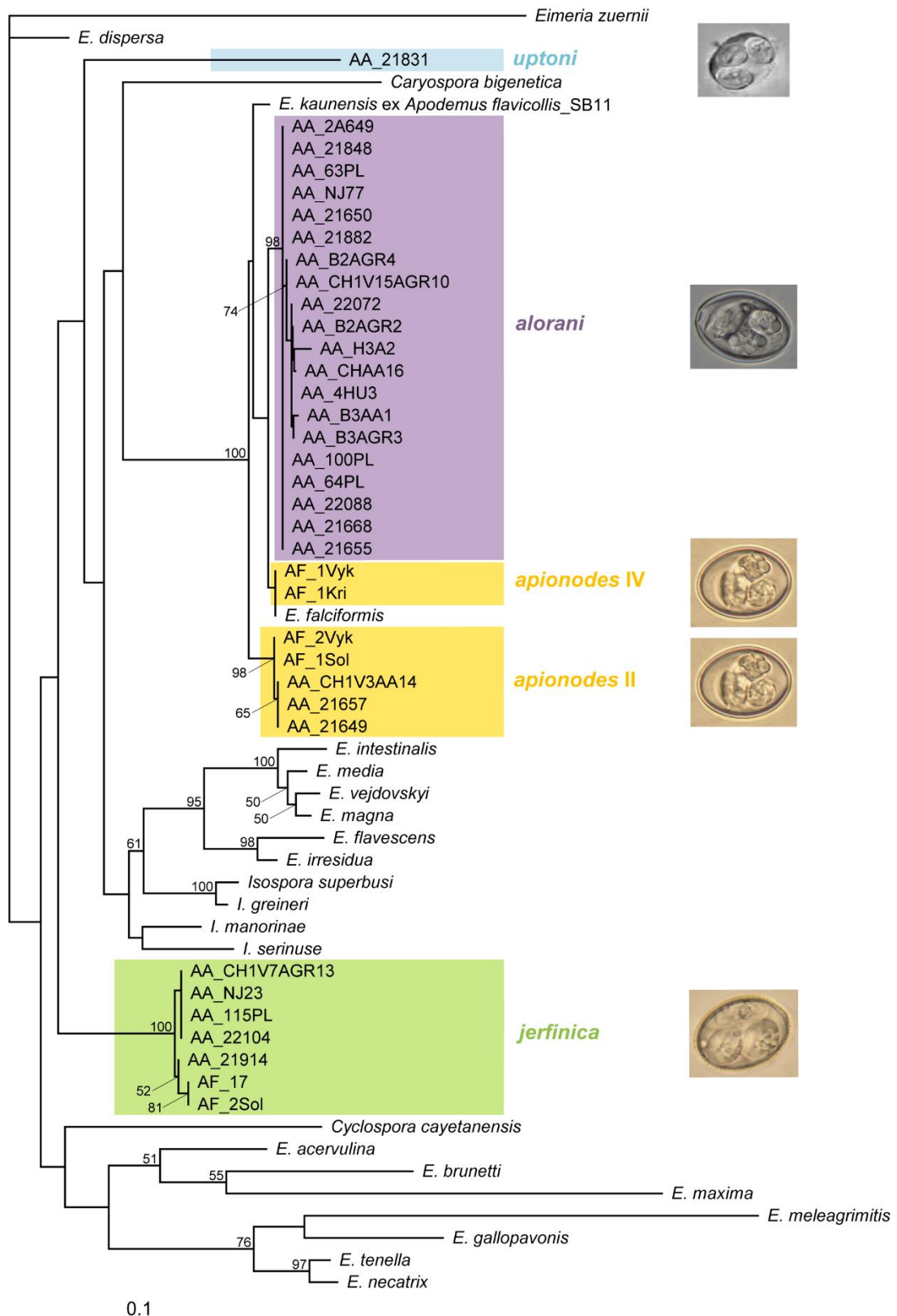
Pro Bayesovskou fylogenetickou analýzu (BI) sekvencí genu COX 3 jsem opět použil 74 sekvencí kokcidií získaných z myšice temnopásé, spolu se sekvencí eimerie z bělozubky šedé a *A. flavicollis*, a s 25 sekvencemi kokcidií různých rodů (*Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*) získaných z databáze GenBank. Z datasetu obsahujícího 101 sekvencí a ořezaného na celkovou délku 753 bp byl spočítán fylogenetický strom pomocí programu MrBayes s parametry uvedenými v kapitole 3.3.2. Analýza byla dokončena s average standard deviation of split frequencies o hodnotě 0,005238. Za outgroup byla zvolena sekvence *Caryospora bigenetica*. Na rozdíl od ML analýzy, analýza BI vytvořila několik polytomií. I tato fylogenetická analýza však zřetelně rozdělila získané sekvence kokcidií z myšice temnopásé na čtyři linie, odpovídající čtyřem morfotypům uvedeným v kap. 4.2.1 (*E. alorani*, *E. apionodes* II, *E. jerfinica* a *E. uptoni*). Všechny 4 linie byly opět dobře podpořeny vysokými hodnotami posteriorní pravděpodobnosti, a s výjimkou *E. alorani*, do které se začlenila *E. falciformis*, byly opět monofyletické (Obr. 8).



Obr. 8: Fylogenetický strom získaný analýzou BI na základě sekvencí COX 3 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota u uzlů odpovídá hodnotě posterior probabilities; hodnoty nižší než 0.50 nejsou uvedeny. Strom je zakořeněn taxonem *Caryospora bigenetica*. AA, *Apodemus agrarius*; kód za zkratkou AA odpovídá kódům vzorků, které jsou uvedeny a charakterizovány v Tab. 2.

4.2.3 Maximum likelihood analýza sekvencí genu COX 1

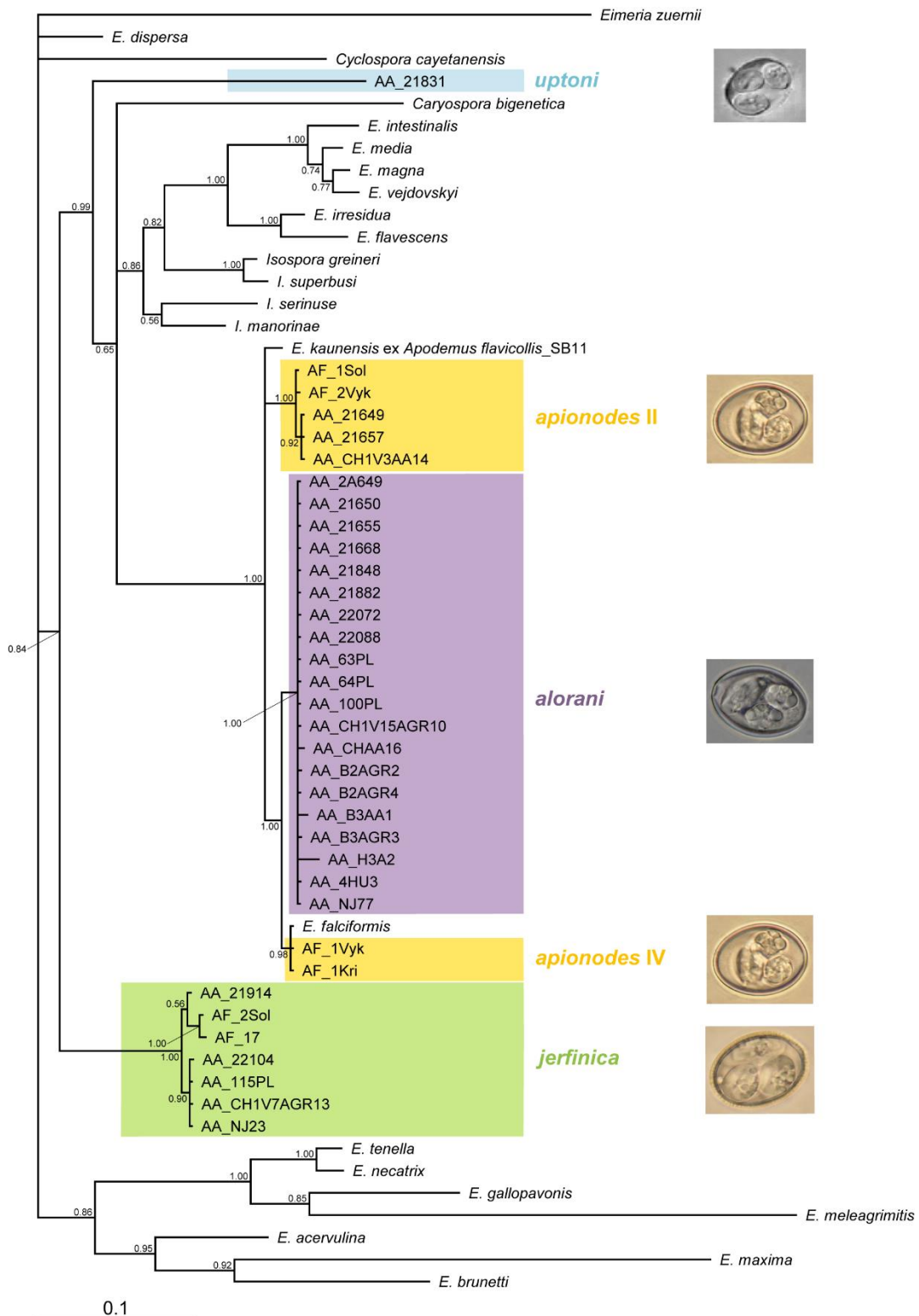
Pro ML analýzu bylo vybráno 29 sekvencí kokcidií rodu *Eimeria* z myšice temnopásé, získaných v minulosti školitelkou a jejími studenty; jednalo se o vzorky, ke kterým byly dostupné i mnou získané sekvence COX 3, aby bylo možné porovnání fylogenetických stromů obou genů. Do datasetu byly opět přidány sekvence kokcidií různých rodů (*Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria* a *Isospora*) z databáze GenBank, a také 4 sekvence referenčních vzorků (AF_1Kri, AF_1Sol, AF_1Vyk, AF_2Vyk) získaných z *A. flavicollis*. Z datasetu obsahujícího 58 sekvencí a ořezaného na celkovou délku 756 bp byl spočítán fylogenetický strom pomocí programu PHYML s parametry uvedenými v kapitole 3.3.2. Jako outgroup byla zvolena sekvence *Eimeria zuernii*. Tato fylogenetická analýza podobně jako analýza COX 3 zřetelně rozdělila získané sekvence kokcidií z myšice temnopásé na čtyři linie, odpovídající morfotypům *E. alorani*, *E. apionodes* II, *E. jerfinica* a *E. uptoni*. Všechny 4 linie byly opět dobře podpořeny vysokými bootstrapovými hodnotami, a byly monofyletické (Obr. 9). Dvě referenční sekvence z *A. flavicollis* (AF_1Kri a AF_1Vyk) vytvořily samostatnou linii (v publikaci Mácová a kol., 2018 odpovídá linii *E. apionodes* IV), do níž se nyní zařadila i *E. falciformis*.



Obr. 9: Fylogenetický strom získaný analýzou ML na základě sekvencí COX 1 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota u uzlů odpovídá hodnotě bootstrapu; hodnoty nižší než 50 % nejsou uvedeny. Strom je zakořeněn taxonem *Eimeria zuernii*. AA, *Apodemus agrarius*; AF, *Apodemus agrarius*; kód za zkratkou AA a AF odpovídá kódům vzorků, které jsou uvedeny a charakterizovány v Tab. 2.

4.2.4 Bayesovská analýza sekvencí genu COX 1

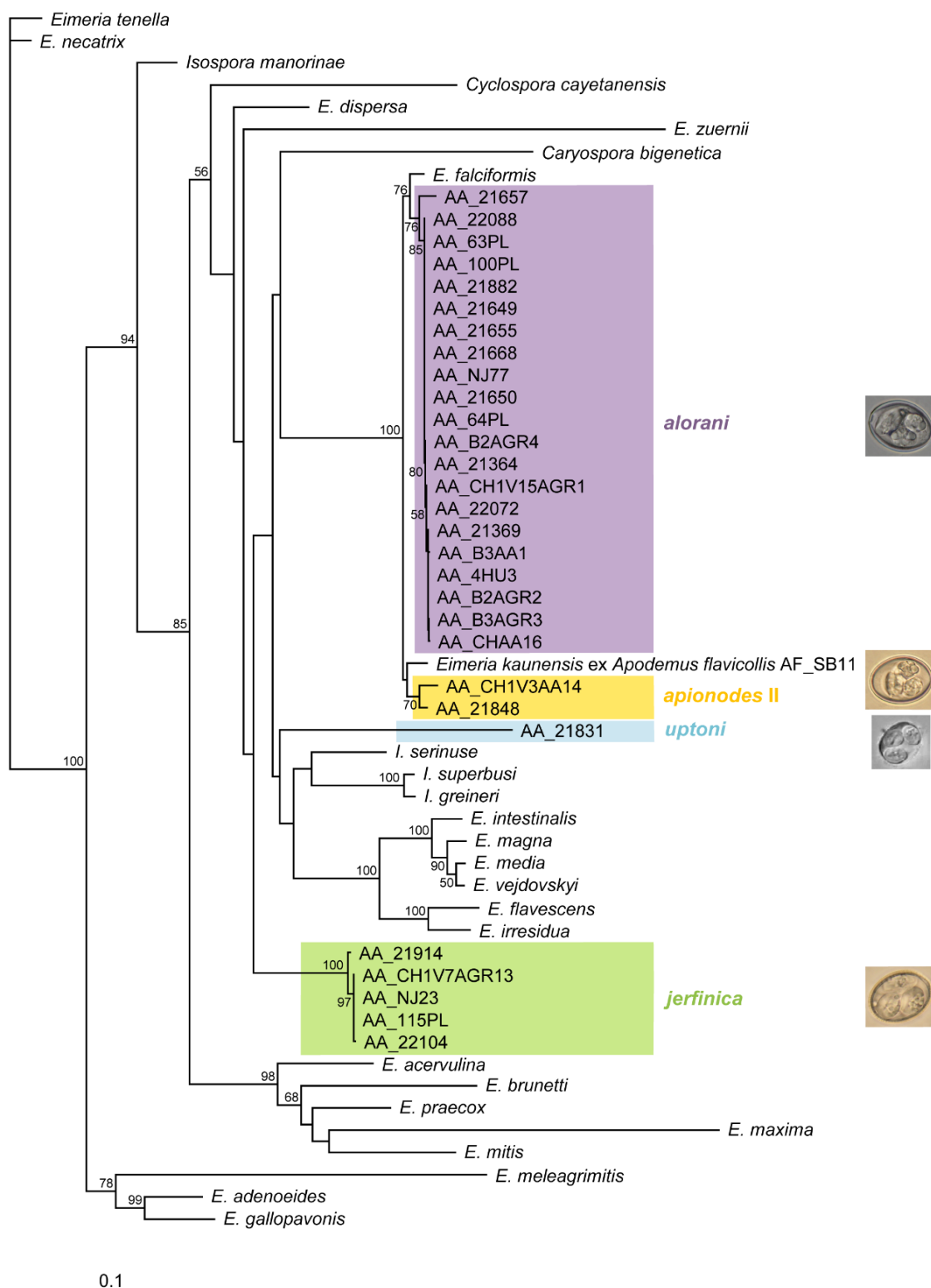
BI analýza sekvencí genu COX 1 byla provedena se stejným datasetem jako ML analýza (viz kapitola 4.2.3). Z datasetu obsahujícího 58 sekvencí a ořezaného na celkovou délku 756 bp byl spočítán fylogenetický strom pomocí programu MrBayes s parametry uvedenými v kapitole 3.3.2. Analýza byla dokončena s average standard deviation of split frequencies o hodnotě 0,003396. Jako outgroup byla zvolena sekvence *Eimeria zuernii*. Na rozdíl od ML analýz, i tato analýza BI vytvořila několik polytomií. I tato fylogenetická analýza však zřetelně rozdělila získané sekvence kokcidií z myšice temnopásé na čtyři linie, odpovídající čtyřem výše uvedeným morfotypům. Všechny 4 linie byly opět dobře podpořeny vysokými hodnotami posteriorní pravděpodobnosti, a byly monofyletické (Obr. 10). Dvě referenční sekvence z *A. flavicollis* (AF_1Kri a AF_1Vyk) vytvořily samostatnou linii (v publikaci Mácová a kol., 2018 odpovídá linii *E. apionodes* IV), do níž se i v této analýze zařadila *E. falciformis* z myši domácí.



Obr. 10: Fylogenetický strom získaný analýzou BI na základě sekvencí COX 1 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota u uzlů odpovídá hodnotě posterior probabilities; hodnoty nižší než 0.50 nejsou uvedeny. Strom je zakořeněn taxonem *Eimeria zuernii*. AA, *Apodemus agrarius*; AF, *Apodemus flavicollis*; kód za zkratkou AA a AF odpovídá kódům vzorků, které jsou uvedeny a charakterizovány v Tab. 2.

4.2.5 Maximum likelihood analýza konkatenovaného alignemntu sekvencí COX 1 a COX 3

Pro ML analýzu konkatenátu genů COX 1 a COX 3 jsem použil 29 sekvencí kokcií z myšice temnopásé, spolu se sekvencí eimerie z *A. flavicollis*, a s 25 sekvencemi kokcií různých rodů (*Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*) získaných z databáze GenBank. Z datasetu obsahujícího 55 sekvencí a ořezaného na celkovou délku 1446 bp byl spočítán fylogenetický strom pomocí programu PHYML s parametry uvedenými v kapitole 3.3.2. Jako outgroup byla zvolena sekvence *Eimeria tenella*. Fylogenetická analýza opět rozdělila získané sekvence kokcií z myšice temnopásé na celkem čtyři jasně oddělené linie, odpovídající čtyřem morfotypům – *E. alorani*, *E. apionodes* II, *E. jerfinica* a *E. uptoni*. Všechny 4 linie byly podpořeny vyššími bootstrapovými hodnotami než původní analýzy (Obr. 11).

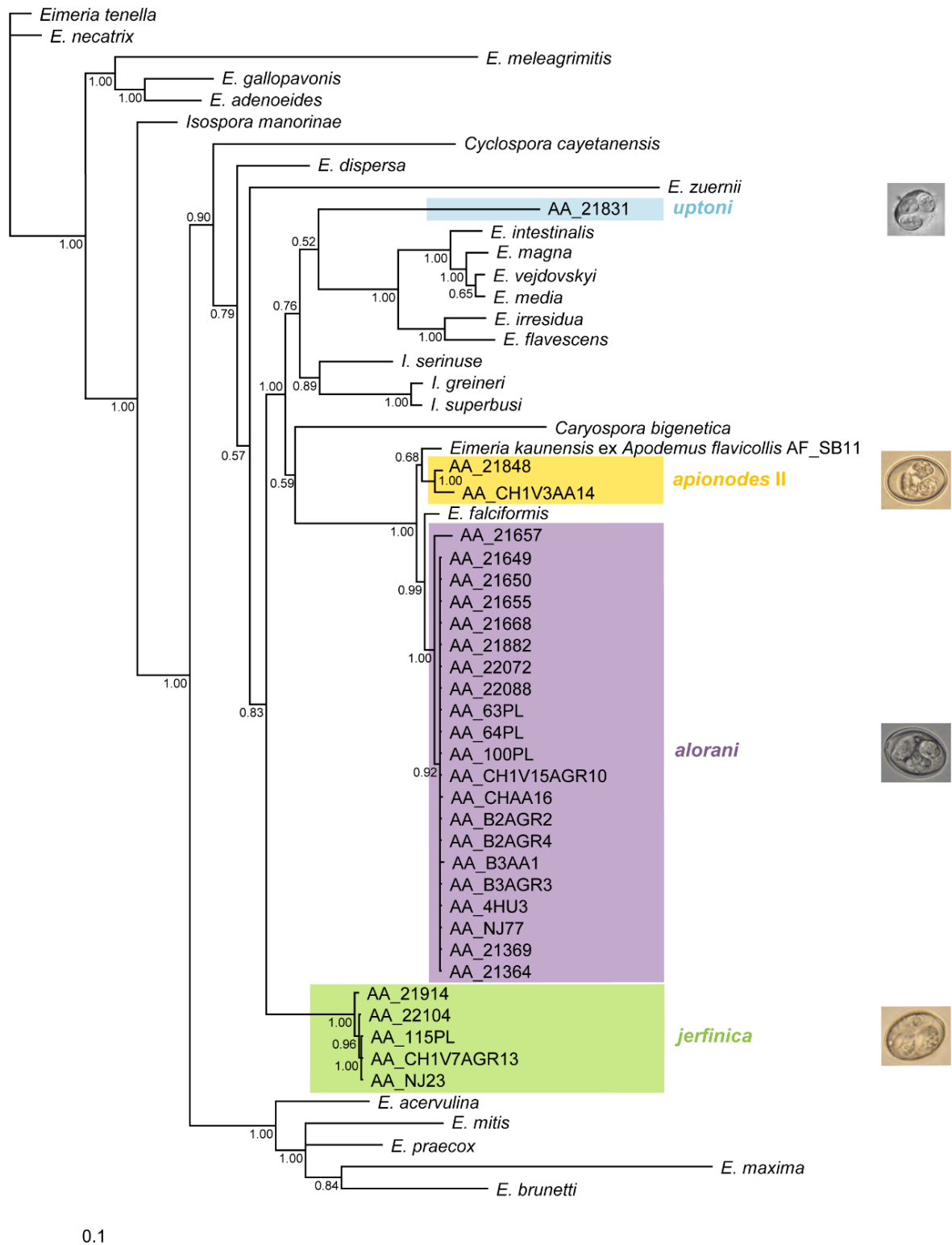


Obr. 11: Konkatovaný fylogenetický strom získaný analýzou ML na základě sekvencí COX 3 a COX 1 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota u uzlů odpovídá hodnotě bootstrapu; hodnoty nižší než 50 % nejsou uvedeny. Strom je zakořeněn taxonem *Eimeria tenella*.

AA, *Apodemus agrarius*; AF, *Apodemus agrarius*; kód za zkratkou AA a AF odpovídá kódům vzorků, které jsou uvedeny a charakterizovány v Tab. 2.

4.2.6 Bayesovská analýza konkatenovaného alignmentu sekvencí COX 1 a COX 3

Pro BI analýzu konkatenátu genů COX 1 a COX 3 jsem použil 29 sekvencí kokcií z myšice temnopásé, spolu se sekvencí eimerie z *A. flavicollis*, a s 25 sekvencemi kokcií různých rodů (*Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*) získaných z databáze GenBank. Z datasetu obsahujícího 55 sekvencí a ořezaného na celkovou délku 1446 bp byl spočítán fylogenetický strom pomocí programu MrBayes s parametry uvedenými v kapitole 3.3.2. Analýza byla dokončena s average standard deviation of split frequencies o hodnotě 0,002453. Jako outgroup byla zvolena sekvence *Eimeria tenella*. Fylogenetická analýza i v tomto případě rozdělila získané sekvence kokcií z myšice temnopásé na čtyři samostatné linie, odpovídající čtyřem morfotypům – *E. alorani*, *E. apionodes* II, *E. jerfinica* a *E. uptoni*. Všechny čtyři linie byly podpořeny vyššími hodnoty posteriorní pravděpodobnosti než původní analýzy (Obr. 12).



Obr. 12: Konkatovaný fylogenetický strom získaný analýzou BI na základě sekvencí COX 3 a COX 1 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota u uzlů odpovídá hodnotě posterior probabilities; hodnoty nižší než 0.50 nejsou uvedeny. Strom je zakořeněn taxonem *Eimeria tenella*.

AA, *Apodemus agrarius*; AF, *Apodemus flavicollis*; kód za zkratkou AA a AF odpovídá kódům vzorků, které jsou uvedeny a charakterizovány v Tab. 2.

5 Diskuze

Pro fylogenetické analýzy kokcidií bylo dosud použito několik genů, od jaderných (18S rRNA, 5.8S rRNA a 28S rRNA), přes plastidové (23S rRNA), až po mitochondriální (COX 1). Největší zastoupení mají fylogenetické analýzy založené na 18S rDNA, která ale není vhodná pro analýzy vnitrodruhových vztahů, ani vztahů blízkce si příbuzných druhů organismů, vzhledem ke své vysoké konzervativnosti (Hnida a Duszynski, 1999a; Zhao a Duszynski 2001b, c; Matsubayashi a kol., 2005). Proto se v poslední době čím dál častěji využívají mitochondriální geny, například COX 1, která je díky svému rychlejšímu evolučnímu tempu vhodnější přinejmenším pro zjišťování evolučních vztahů na úrovni druhu (Besanski a kol., 2003; Meier a kol., 2006; Lane, 2009). V této studii jsem se zaměřil na možnosti využití mitochondriálního genu COX 3, který byl dosud použit jen v několika málo studiích (např. Tian a kol., 2013), přičemž ve fylogenetických analýzách kokcidií nebyl zatím použit vůbec. Mezi jeho výhody patří značné evoluční tempo, které vede k větší variabilitě, a tím je podle všeho schopen konkurovat výše zmíněnému genu COX 1 (Hikosaka a kol., 2010). Nevýhodou je však nedostatek fylogenetických studií, ve kterých byl tento gen použit, tudíž nedostatek dat ke srovnání.

Maximum likelihood analýza (Obr. 7) rozdělila celkem 72 sekvencí genu COX 3 eimerií získaných z *A. agrarius* do čtyř linií, které odpovídají morfotypům *E. alorani*, *E. apionodes* II, *E. jerfinica* a *E. uptoni* popsáným v publikaci Mácová a kol. (2018). Výsledky ukazují blízkou příbuznost morfotypů *E. apionodes* II a *E. alorani*, které spolu s *E. kaunensis* z *A. flavicollis* tvoří sesterské linie a společný klast. Naopak morfotypy *E. jerfinica* a *E. uptoni* jsou vzdálené tomuto klastru, a tvoří samostatné, dobře oddělené linie. Fylogenetické vztahy získaných morfotypů jsou v souladu s výsledky COX 1 analýzy publikovanými v Mácová a kol. (2018). Bayesovskou analýzou (Obr. 8) jsme získali podobné výsledky jako z ML, s tím rozdílem, že analýza BI vytvořila několik polytomií. Tento jev bývá ve fylogenetických analýzách BI u kokcidií rodu *Eimeria* poměrně běžný (např. Mácová a kol., 2018; Trefancová a kol., 2018). Nicméně zásadní je, že obě analýzy rozdělily eimerie parazitující u myšice temnopásé na 4 linie odpovídající 4 dříve popsáným morfotypům. Tyto linie jsou jasně oddělené, vysoce podpořené (bootstrapovými hodnotami 100 v ML, a posteriorní pravděpodobností ~ 1.00 v BI), a – s drobnou výjimkou představující taxon *E. falciiformis*, diskutovanou níže – monofyletické.

Pro porovnání výsledků získaných fylogenetickými analýzami genu COX 3, a tím jeho vhodnosti pro budoucí analýzy, byl zvolen gen COX 1. Fylogenetické analýzy COX 1 provedené se stejným datasetem, do kterého jsem navíc přidal ještě 4 referenční sekvence eimerií z *A. flavicollis*, rozdělily kokcidie eimerií parazitující u *A. agrarius* opět na 4 linie výše uvedených morfotypů (Obr. 9). Linie byly opět jasně oddělené, dobře statisticky podpořené, a zcela monofyletické (jelikož z linie *E. uptoni* byla k dispozici pouze jedna sekvence COX 1, monofylii této linie nelze potvrdit). BI analýza opět vytvořila několik polytomií (Obr. 10). Ve srovnání s analýzami COX 3 genu byly statistické podpory obou analýz (tj. ML i BI) u COX 1 nižší. Naopak u COX 1 byla v obou analýzách patrnější vnitřní struktura linií *E. alorani*, *E. apionodes* II, i *E. jerfinica*.

V analýzách COX 3 se do linie *E. alorani* vmísil druh *E. falciformis*, původně popsáný z myši domácí (*Mus musculus*), v analýzách COX 1 se tento druh přiřadil do linie *E. apionodes* z *A. flavicollis* (Obr. 7-10). Tento jev byl u analýz různých datasetů kokcidií občas pozorován (např. Mácová a kol., 2018 nebo Heitlinger a kol., rukopis v přípravě). Heitlinger a kol. (rukopis v přípravě) dokonce tvrdí, že na základě klasických fylogenetických analýz 1-3 genů není možné odlišit *E. falciformis* od *E. apionodes*, neboť tyto analýzy neposkytují dostatečné rozlišení pro posouzení hostitelské specifity. Každopádně se tyto dva druhy významně liší minimálně morfologií vysporulovaných oocyst (tvar a velikost oocyst, přítomnost rezidua oocysty) (Pellérdy, 1974; Mácová a kol., 2018).

Vzorky AA_21657 a AA_21848 jsou jediné, které byly v každé z analýz (COX 3 a COX 1) zařazeny do různých morfotypů. Vzorek AA_21657 se v COX 3 analýzách zařadil do morfotypu *E. alorani*. V analýzách COX 1 byl ale součástí morfotypu *E. apionodes* II. U vzorku AA_21848 to bylo naopak, v analýzách COX 1 byl zařazen pod morfotyp *E. alorani*, a v COX 3 analýzách do morfotypu *E. apionodes* II (Obr. 7-10). U obou vzorků byla mikroskopicky zjištěna smíšená infekce těmito dvěma morfotypy eimerií, přičemž se preferenčně amplifikoval vždy jeden z morfotypů. Tento jev bývá u kokcidií při smíšených infekcích obvyklý (Kvičarová a Hypša, 2013; Mácová a kol., 2018; Heitlinger, Hofmannová, Kvičarová, Seville, osobní pozorování). Který druh/morfotyp však bude amplifikován a proč, není dosud známo. Určujícím faktorem pravděpodobně není množství oocyst jednotlivého druhu/morfotypu ve vzorku, jelikož často dochází i k amplifikaci druhu/morfotypu, kterého je ve vzorku méně (Hofmannová a Kvičarová, osobní pozorování).

Dataset COX 3 obsahoval i dva vzorky (AA_3VARN a AA_105PL), které byly fylogenetickými analýzami přiřazeny k ptačím isosporám (Obr. 7, 8). Na základě flotačního vyšetření trusu s následnou mikroskopií jsme zjistili, že tyto dva vzorky obsahují kokcidie jiného rodu, a to rodu *Isospora*. Jejich příbuznost ptačím druhům naznačuje, že se skutečně může jednat o oocysty isospor ptáků, které pouze prošly jako pasáž trávicím traktem myšice. Tento fakt byl diskutován a prokázán v publikaci Trefancová a kol. (2018) u norníků rudých (*Myodes glareolus*; Rodentia: Arvicolidae).

ML i BI analýza konkatenovaného alignmentu opět potvrdily společné klastrování morfotypů *E. alorani*, *E. apionodes* II a *E. kaunensis*, a existenci samostatných, fylogeneticky vzdálenějších linií *E. jerfinica* a *E. uptoni*. Zde se již *E. falciformis* vyčlenila zvlášť, a nezařadila se do žádného z morfotypů eimerií myšic rodu *Apodemus*. Konkatenovaný strom má ve srovnání s jednotlivými COX 1 a COX 3 stromy nejvyšší jak bootstrapové hodnoty, tak hodnoty posteriorní pravděpodobnosti (Obr. 11, 12).

Z výsledků analýz tedy lze konstatovat, že gen COX 1 vykazuje větší variabilitu sekvencí, a má tak lepší rozlišovací schopnost (tj. naznačuje i vnitřní strukturu jednotlivých linií) ve fylogenetických analýzách kokcidií rodu *Eimeria*, než samotný gen COX 3. Nejlepších výsledků však dokážeme konkatenací těchto dvou genů, kdy jsou nejvyšší jak statistické podpory, tak je dobře patrné i vnitřní členění linií (Obr. 11, 12).

6 Závěr

V této práci jsem se zabýval rekonstrukcí fylogenetických vztahů kokcií parazitujících u myšice temnopásé. Pro fylogenetické analýzy byly použity vzorky získané odchytom hlodavců z 11 zemí Evropy a Asie. Molekulárními metodami se mi podařilo získat 76 sekvencí mitochondriálního genu COX 3 kokcií (74 sekvencí pro rod *Eimeria* a 2 sekvence pro rod *Isospora*). Výsledné fylogenetické analýzy rozdělily kokcidie parazitující u myšice temnopásé na čtyři linie odpovídající čtyřem různým morfotypům/druhům. Tyto linie byly jasně oddělené, dobře podpořené, a monofyletické. Fylogenetické vztahy mezi liniemi jsou ve shodě s prací Mácová a kol. (2018), která se zabývala studiem fylogenetických a populačně-genetických vztahů mezi stovkami eimerií čtyř druhů myšic rodu *Apodemus* na základě sekvencí 18S rRNA a COX 1 genů.

Pro porovnání vhodnosti genu COX 3 pro fylogenetické analýzy kokcií byl v mé práci zvolen gen COX 1. Výsledky analýz potvrdily, že COX 3 je vhodným markerem pro rozlišení druhů i jednotlivých linií kokcií rodu *Eimeria*, nicméně COX 1 stále zůstává pro tyto analýzy vhodnější. Nejlepší je však použití konkatenátu těchto dvou genů, a to jak z hlediska výsledných statistických podpor jednotlivých uzlů, tak z hlediska možnosti zachycení i vnitřní struktury jednotlivých linií.

7 Použitá literatura

7.1 Odborné publikace

Adachi M., Sako Y., Ishida Y. (1996) Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *Journal of Phycology* 32: 424-432.

Adamson M. L., Caira J. N. (1994) Evolutionary factors influencing the nature of parasite specificity. *Parasitology* 109: 85-95.

Adl S. M., Simpson A. G., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Le Gall L., Lynn D. H., McManus H., Mitchell E. A., Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C. L., Smirnov A., Spiegel F. W. (2012) The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429-493.

Ahmed T, Yin Z, Bhushan S (2016) Cryo-EM structure of the large subunit of the spinach chloroplast ribosome. *Scientific Reports* 6: 35793.

Aktas M., Bendele K. G., Altay K., Dumanli N., Tsuji M., Holman P. J. (2007) Sequence polymorphism in the ribosomal DNA internal transcribed spacers differs among *Theileria* species. *Veterinary Parasitology* 147: 221-230.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular biology of the Cell*. Garland Science, USA.

Allen P.C., Fetterer R.H. (2002) Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 58-65.

Alnajjar K. S., Cvetkov T. L., Prochaska L. J. (2015) The role of phospholipids of subunit III in the regulation of structural rearrangements in cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 54: 1053-1063.

Álvarez I., Wendel J. F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.

Ambros M., Dudich A., Miklós P., Stollmann A. Žiak D. (2010) Ryšavka tmavopása (*Apodemus agrarius*) – nový druh cicavca Podunajskej roviny (Rodentia: Muridae). *Lynx* 41: 5-13.

Anděra M., Beneš B. (2002) Atlas rozšíření savců v České republice IV – Hlodavci, část 2 – Myšovití (*Muridae*), myšivkovití (*Zapodidae*). Národní muzeum, Praha, Česká republika.

Anděra M., Horáček I. (2005) *Poznááme naše savce*. Sobotáles, Jihlava, Česká republika.

Arif I. A., Khan H. A. (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and Conservation* 32: 9-17.

Arnason U., Bodin K., Gullberg A., Ledje C., Mouchaty S. (1995) A molecular view of pinniped relationships with particular emphasis on the true seals. *Journal of Molecular Evolution* 40: 78-85.

Avise J. C. (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer Associates, USA.

Baldwin B. G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.

Baldwin B.G. (1993) Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *American Journal of Botany* 80: 222-238.

Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M., Wojciechowski M. F., Campbell C. S., Donoghue M. J. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82: 247-277.

Bannikova A. (2004) Molecular markers and modern phylogenetics of mammals. *Zhurnal Obshchei Biologii* 65: 278.

Barrientos A, Zambrano A., Tzagoloff A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 23: 3472-3482.

Barta J. R., Jenkins M. C., Danforth H. D. (1991) Evolutionary relationships of avian *Eimeria* species among other Apicomplexan protozoa: monophyly of the Apicomplexa is supported. *Molecular Biology and Evolution* 8: 345-355.

Barta J. R., Martin D. S., Liberator P. A., Dashkevich 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. *Journal of Parasitology* 83: 262-271.

Besansky N. J., Severson D. W., Ferdig M. T. (2003) DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology* 19: 545-546.

Bhagavan N. V., Ha Ch. (2015) *Essentials of medical biochemistry*. Academic Press, USA.

Bock R. (2007) *Cell and molecular biology of plastids*. Springer, Germany.

Bogorad L., Vasil I. K. (1991) *The molecular biology of plastids*. Academic Press, USA.

Boore J. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 27: 1767-1780.

Bowles J., Blair D., McManus D. P. (1995) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110: 317-328.

- Brunori M., Antonini M., Malatesta F., Sarti P., Wilson M. T. (1987) Cytochrome-c oxidase. Subunit structure and proton pumping. *European Journal of Biochemistry* 169: 1-8.
- Carreno R. A., Schnitzler B. E., Jeffries A. C., Tenter A. M., Johnson A. M., Barta J. R. (1998) Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 184-188.
- Castresana J. (2001) Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution* 18: 465-471.
- Clark E. L., Tomley F. M., Blake D. P. (2017) Are *Eimeria* genetically diverse and does it matter? *Trends in Parasitology* 33: 231-241.
- Clark G. C. (1997) Riboprinting: a tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44: 277-283.
- Collins N. E., Allsopp B. A. (1999) *Theileria parva* ribosomal internal transcribed spacer sequences exhibit extensive polymorphism and mosaic evolution: application to the characterization of parasites from cattle and buffalo. *Parasitology* 118: 541-551.
- Cox F. E.G. (1991) Systematics of parasitic protozoa. *Parasitic Protozoa*, Academic Press, San Diego, CA. str. 55-80.
- Cox F. E. G. (1994) The evolutionary expansion of the Sporozoa. *International Journal for Parasitology* 24: 1301-1316.
- Cruickshank R. H. (2002) Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology* 7: 3-14.
- Daugbjerg N., Hansen G., Larsen J., Moestrup Ø. (2000) Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmored dinoflagellates. *Phycologia* 39: 302-317.
- Dawney N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G. R. a Thorpe R. S. (2007) Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 17: 1-6.
- De Salle R., Schierwater B., Hadrys H. (2017) MtDNA: The small workhouse of evolutionary studies. *Frontiers in Bioscience* 22: 873-887.
- Dungel J., Gaisler J. (2002) Atlas savců České a Slovenské republiky. Academia, Praha, Česká republika.
- Dünschede B., Träger C., Schröder C. V., Ziehe D., Walter B., Funke S., Hofmann E., Schünemann D. (2015) Chloroplast SRP54 was recruited for posttranslational protein transport via complex formation with chloroplast SRP43 during land plant evolution. *Journal of Biological Chemistry* 290: 13104-13114.

- Duszynski D.W., Upton S.J. (2001) Enteric protozoans: *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*, and *Cryptosporidium* spp. Parasitic Diseases of Wild Mammals, second ed. Iowa State University Press, Ames, USA. str. 416-459.
- Duszynski D. W., Wilber P. G. (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. Journal for Parasitology 83: 333-336.
- Eickbush T. H., Eickbush D. G. (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. Genetics 175: 477-485.
- Elela S. A., Nazar R. N. (1997) Role of the 5,8S rRNA in ribosome translocation. Nuclear Acids Research 25: 1788-1794.
- Ellis K. E., Clough B., Saldanha J. W., Wilson R. J. (2001) Nifs and Sufs in malaria. Molecular Microbiology 41: 973-981.
- Esposti M. D., De Vries S., Criml M., Ghelh A., Patarnello T. Meyer A. (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. Biochimica et Biophysica Acta 1143: 243-271.
- Essig A., Rinder H., Gothe R., Zahler M. (1999) Genetic differentiation of mites of the genus *Chorioptes* (Acari: Psoroptidae). Experimental and Applied Acarology 23: 309-318.
- Farias I. P., Ortí G., Sampaio I., Schneider H., Meyer, A. (2001) The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. Journal of Molecular Evolution 53: 89-103.
- Fenton B., Malloch G., Moxey E. (1997) Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals multiple simple sequence repeats. Insect Molecular Biology 6: 23-32.
- Fisher T. W., Bellows L. E. (1999) Handbook of Biological Control. Academic Press, USA.
- Foth B. J., McFadden G. I. (2003) The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. International Review of Cytology 224: 57-110.
- Franzen C, Müller A, Bialek R, Diehl V, Salzberger B, Fätkenheuer G (2000) Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. Parasitology Research 86: 669-676.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Computer Applications in the Biosciences 12: 543-548.
- Giao P. M., Tuoc D., Dung V. V., Wikramanayake E. D., Amato G., Arctander P., MacKinnon J. R. (1998) Description of *Muntiacus truongsongensis*, a new species of *muntjac* (Artiodactyla: Muntiacidae) from central Vietnam, and implications for conservation. Animal Conservation 1: 61-68.

- Gleeson M. T. (2000) The plastid in Apicomplexa: what use is it? *International Journal for Parasitology* 30: 1053-1070.
- Gleeson M. T., Johnson A. M. (1999) Physical characterization of the plastid DNA in *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology* 29: 1563-1573.
- Gouy, M. Guindon, S. & Gascuel., O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-224.
- Gubbels J. M., de Vos A. P., Van der Weide M., Viseras J., Schouls L. M., de Vries E., Jongejan F. (1999) Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1782-1789.
- Hassouna N., Michot B., Bachellerie J.-P. (1984) The complete nucleotide sequence of the mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 12: 3563-3583.
- Haltia T., Saeaste M., Wikstrom M. (1999) Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. *The Embo Journal* 10: 2015-2021.
- Higgs S., Nowell F. (1991) A review of the species of *Eimeria* infecting hosts in the genus *Apodemus*. *Systematic Parasitology* 20: 203-209.
- Hikosaka K., Watanabe Y., Tsuji N., Kita K., Kishine H., Arisue N, Palacpac N. M., Kawazu S., Sawai H., Horii T., Igarashi I., Tanabe K. (2010) Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites *Babesia* and *Theileria*. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1107-1116.
- Hillis D. M., Dixon C. T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Hnida J. A., Duszynski D. W. (1999a) Taxonomy and phylogeny of some *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) species of rodents as determined by polymerase chain reaction/restriction-fragment-length polymorphism analysis of 18S rDNA. *Parasitology Research* 85: 887-894.
- Hnida J. A., Duszynski D. W. (1999b) Taxonomy and systematics of some *Eimeria* species of murid rodents as determined by the ITS1 region of the ribosomal gene complex. *Parasitology* 119: 349-357.
- Hosler J. P. (2004) The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. str. 332-339.
- Hůrková L., Baker M. A., Jirků M., Modrý D. (2005) Two new species of *Eimeria* Schneider 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the broad-toothed field mouse, *Apodemus mystacinus* Danford and Alston 1877 (Rodentia: Muridae) from Jordan. *Parasitology Research* 97: 33-40.

Hutchins M., Kleiman D. G., Geist V. (2003) Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Gale Group, USA.

Chapman H. D. (2014) Milestones in avian coccidiosis research: a review. Poultry Science 93: 501-511.

Chapman H. D., Barta J. R., Blake D., Gruber A., Jenkins M., Smith N. C., Suo X., Tomley F. M. (2013) A selective review of advances in coccidiosis research. Advances in Parasitology 83: 93-171.

Chilton N. B., Hoste H., Hung G., Beveridge I., Gasser R. B. (1996) The 5.8s rDNA sequences of 18 species of bursate nematodes (Order Strongylida): comparison with rhabditid and tylenchid nematodes. International Journal for Parasitology 27: 119-124.

Irwin D. M., Kocher T. D., Wilson A. C. (1991) Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. Journal of Molecular Evolution 32: 128-144.

Jirků M., Jirků M., Oborník M., Lukeš J., Modrý D. (2009) A model for taxonomic work on homoxenous coccidia: redescription, host specificity, and molecular phylogeny of *Eimeria ranae* Dobell, 1909, with a review of anuran-host *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriorina). Eukaryotic Microbiology 56: 39-51.

Johns G. C., Avise J. C. (1998) A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b*. Molecular Biology and Evolution 15: 1481-1490.

Johnson A. M., Fielke R., Lumb R., Baverstock P. R. (1990) Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* determined by ribosomal RNA sequence comparison. International Journal for Parasitology 20: 141-147.

Johnson A. M., Murray P. J., Illana S., Baverstock P. R. (1987) Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii*: evolutionary implications for the Apicomplexa. Molecular and Biochemical Parasitology 25: 239-246.

Kheysin Y. M. (1972) Life cycles of coccidia of domestic animals. University Park Press. Baltimore, USA.

Ki J. (2009) Nuclear 28S rDNA phylogeny supports the basal placement of *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae; Noctilucales) in dinoflagellates. European Journal of Protistology 46: 111-120.

Kilejian A. (1975) Circular mitochondrial DNA from the avian malaria parasite *Plasmodium lophurae*. Biochimica et Biophysica Acta 390: 276-284.

Knight A., Ewen J. G., Brekke P., Santure A. W. (2018) Chapter two – the evolutionary biology, ecology and epidemiology of coccidia of passerine birds. Advances in Parasitology 99: 35-60.

Kvičerová J., Hypša V. (2013) Host-parasite incongruences in rodent *Eimeria* suggest significant role of adaptation rather than cophylogeny in maintenance of host specificity. PLoS ONE 8: e63601.

- Kvičerová J, Mikeš V, Hypša V (2011) Third lineage of rodent eimerians: morphology, phylogeny and re-description of *Eimeria myoxi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Eliomys quercinus* (Rodentia: Gliridae). *Parasitology* 138: 1217-1223.
- Kvičerová J., Pakandl M., Hypša V. (2008) Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135: 443-452.
- Lane N. (2009) On the origin of bar codes. *Nature* 462: 272-274.
- Lara M. C., Patton J. L., Da Silva M. N. (1996) The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 403-413.
- Law A. E., Mullineaux C. W., Hirst E. M., Saldanha J., Wilson R. J. (2000) Bacterial orthologues indicate the malarial plastid gene *ycf24* is essential. *Protist* 151: 317-327.
- LeDuc R. G., Perrin W. F., Dizzon A. E. (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science* 15: 619-648.
- Lenaers, G., Maroteaux, L., Michot, B., Herzog, M. (1989) Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution* 29: 40-51.
- Levine N.D (1970) Taxonomy of the sporozoa. *Journal for Parasitology*. 56: 208-209.
- Levine N. D. (1988) The protozoan phylum Apicomplexa. CRC Press, USA.
- Levine N. D. (1990) The coccidian parasites of rodents. CRC Press, USA.
- Levine N. D., Ivens V. (1965) The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of rodents. The University of Illinois Press. Illinois, USA.
- Lewin R. A. (1993) Origins of plastids. Springer Science+Business Media, USA.
- Lim L., McFadden G. I. (2010) The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 749-763.
- Lincoln A. J., Donat N., Palmer G., Prochaska L. J. (2003) Site-specific antibodies against hydrophilic domains of subunit III of bovine heart cytochrome c oxidase affect enzyme function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 416: 81-91.
- Liu Z. J, Cordes J. F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. (2007) *Molecular cell biology*. Freeman, USA.

- Long P. L., Reid W. M. (1982) A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. University of Georgia Research Report 404: 17.
- Máková A., Hoblíková A., Hypša V., Stanko M., Martinů J., Kvičarová J. (2018) Mysteries of host switching: diversification and host specificity in rodent-coccidia associations, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 179-189.
- Maréchal E. (2018) Plastids – methods and protocols. Human Press, USA.
- Martin J. W., Crandall K. A., Felder D. L. (2009) Decapod Crustacean Phylogenetics. CRC press, Taylor and Francis Group.
- Matsubayashi M., Takami K., Niichiro A., Kimata I., Tani H., Sasai K., Baba E. (2005) Molecular characterization of crane coccidia, *Eimeria gruis* and *E. reichenowi*, found in feces of migratory cranes. *Parasitology Research* 97: 80-83.
- Mazón-Suástegui J. M., Fernández N. T., Valecia I. L., Cruz-Hernández P., Latisnere-Barragán H. (2016) 28S rDNA as an alternative marker for commercially important oyster identification. *Food Control* 66: 205-214.
- McFadden G. I., Roos D. S. (1999) Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends in Microbiology* 7: 328-333.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G. (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55: 715-728.
- Merritt J. F. (2010) *The Biology of Small Mammals*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.
- Messner R., Prillinger H., Ibl M., Himmler G. (1995) Sequences of ribosomal genes and interal transcribed spacers move three plant parasitic fungi, *Eremothecium ashbyi*, *Ashbya gossypi*, and *Nematospora coryli*, towards *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 41: 31-42.
- Meyer A. (1994) Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 278-280.
- Modrý D., Petrželková K. J., Kalousová B., Hasegawa H. (2015) Parasites of African Great Apes. *Atlas of Coproscopic Diagnostics*, 1st Ed. HPI-Lab, UVPS Brno, Česká republika.
- Morrison D. A., Ellis J. T. (1997) Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of Apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution* 14: 428-441.
- Navajas, M., Cotton, D., Kreiter, S. & Gutierrez, J. (1992) Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Experimental and Applied Acarology* 15: 211-218.

- Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G. & de Moraes, G. (1999) Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mite. *Experimental and Applied Acarology* 23: 851-859.
- Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. & Boursot, P. (1998) Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742-752.
- Navajas, M., Tsagkarakov, A., Lagnel, J. & Perrot-Minnot, M.J. (2000) Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): polymorphism, host races or sibling species? *Experimental and Applied Acarology* 24: 365-376.
- Nazar R. N. (1980) A 5.8S rRNA-like sequence in prokaryotic 23S rRNA. *FEBS Letters* 119.
- Nazar R. N., Roy K. L. (1978) Nucleotide sequence of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ribosomal 5.8S ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 253: 395-399.
- Nazar R. N., Slitz T. O., Busch H. (1976) Sequence homologies in mammalian 5.8S rRNA. *Biochemistry* 15: 505-508.
- Nazar R. N., Slitz T. O., Busch H. (1975) Structural analyses of mammalian ribosomal ribonucleic acid and its precursors: nucleotide sequence of ribosomal 5.8S ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 250: 8591-8597.
- Nowak R. M. (1999) Walker's Mammals of the World. 6th edition. Johns Hopkins University Press, USA.
- Ogedengbe J. D., Hanner R. H., Barta J. R. (2011) DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology* 41: 843-850.
- Okamoto M., Agatsuma T., Kurosawa T., Ito A. (1997) Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology* 115: 661-666.
- Okamoto M., Urushima H., Hasegawa H. (2009) Phylogenetic relationships of rodent pinworms (genus *Syphacia*) in Japan inferred from 28S rDNA sequences. *Parasitology International* 58: 330-333.
- Olsen G. J., Woese C. R. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Faseb Journal* 7: 113-123.
- Pakandl M. (2009) Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitologica* 56: 153-166.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014) Molecular markers in phylogenetic studies – a review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* 2: 131.
- Pellérdy L. (1974) Coccidia and coccidiosis. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.

- Pereira M. M., Santana M., Teixeira M. (2001) A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochemica et Biophysica Acta-Bioenergetics*: 185-208.
- Pérez-Martínez X., Vázquez-Acevedo M., Tolkunova E., Funes S., Claros M. G., Davidson E., King M. P., González-Halphen D. (2000) Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome c oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 30144-30152.
- Ralph S.A., Van Dooren G. G., Waller R. F., Crawford M. J., Fraunholz M. J., Foth B. J., Tonkin C. J., Roos D. S., McFadden G. I. (2004a) Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Reviews Microbiology* 2: 203-216.
- Raué H. A., Musters W., Rutgers C. A., Vant Riet J., Planta R. J. (1990) rRNA: from structure to function. *The Ribosome, Structure, Function and Evolution*. American Society of Microbiology, Washington, DC, USA.
- Relman D. A., Schmidt T. M., Gajadhar A., Sogin M., Cross J., Yoder K., Sethabutr O., Echeverria P. (1996) Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *The Journal of Infectious Diseases* 173: 440-445.
- Rich, S.M., Rosenthal, B.M., Telford, I.S.R., Spielman, A., Hartl, D.L., Ayala, F.J. (1997) Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS2) region within individual deer ticks. *Insect Molecular Biology* 6: 123-129.
- Roos D. S., Crawford M. J., Donald R. G., Kissinger J. C., Klimczak L. J., Striepen B. (1999) Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Current Opinion in Microbiology* 2: 426-432.
- Rowe K. C., Achmadi A. S., Esselstyn J. A. (2016) A new genus and species of omnivorous rodent (Muridae: Murinae) from Sulawesi, nested within a clade of endemic carnivores, *Journal of Mammalogy* 97: 978-991.
- Rubin G. M. (1973) The nucleotide sequence of *Sacharomyces cerevisiae* 5.8S ribosomal ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 248: 3860-3875.
- Schneider A. (1881) Sur les psorospermies oviformes ou coccidies. Es-peces nouvelles ou peu connues. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 9: 387-404.
- Singh D., Chaubey S., Habib S. (2003) Replication of the *Plasmodium falciparum* apicoplast DNA initiates within the inverted repeat region. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126: 9-14.
- Soto I. C., Fontanesi F., Liu J., Barrientos A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 883-897.
- Šlapeta J. R., Modrý D., Votýpka J., Jirků M., Oborník M., Lukeš J., Koudela B. (2001) *Eimeria telekii* n.sp. (Apicomplexa: Coccidia) from *Lemniscomys striatus* (Rodentia: Muridae): morphology, pathology and phylogeny. *Parasitology* 122: 133-143.

Szczepaniak K. O., Tomczuk K., Lojszczyk-Szczepaniak A., Lopuszynski W. (2016) Reclassification of *Eimeria pogonae* Walden (2009) as *Choleoeimeria pogonae* comb. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Parasitology Research* 115: 681-685.

Teletchea F. (2010) After 7 years and 1000 citations: comparative assessment of the DNA barcoding and the DNA taxonomy proposals for taxonomists and non-taxonomists. *Mitochondrial DNA* 21: 206-226.

Tenter A. M., Barta J. R., Beveridge I., Duszynski D. W., Mehlhorn H., Morrison D. A., Thopson R. C. A., Conrad P. A. (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology* 32: 595-616.

Tenter A. M., Johnson A. M. (1997) Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Advances in Parasitology* 39: 69-139.

Tian Z., Liu G., Yin H., Luo J., Guan G., Xie J., Luo J., Zheng J., Tian M., Yuan X., Wang F., Chen R., Wang H. (2013) Cytochrome c oxidase subunit III (COX3) gene, an informative marker for phylogenetic analysis and differentiation of *Babesia* species in China. *Infection, Genetics and Evolution* 18: 13-17.

Trefancová A, Mácová A, Kvičerová J (2018) Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? *Protist* 170: 104-120.

Varanasi L., Hosler J. P. (2012) Subunit III-depleted cytochrome c oxidase provides insight into the process of proton uptake by proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 545-551.

Velenská N. (2007) Hlodavci. Robimaus, Praha, Česká republika.

Vrba V., Poplstein M., Pakandl M. (2011) The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as an independent species. *Veterinary Parasitology* 183: 47-53.

Walker T. A., Pace N. R. (1983) 5,8S Ribosomal RNA. *Cell* 33: 320-322.

Wellehan J. F., Lierz M., Phalen D., Raidal S., Styles D. K., Crosta L., Melillo A., Schnitzer P., Lennox A., Lumeij J. T. (2016) Chapter 2 – Infectious disease. *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*: 22-106.

Wheeler W. C., Honeycutt R. L. (1988) Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution* 5: 90-96.

Wikstrom M. K. F. (1977) Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature* 266: 271-273.

Williams B.A., Keeling P.J. (2003) Cryptic organelles in parasitic protists and fungi. *Advances in Parasitology* 54: 9-68.

Williams, R.B. (1999) A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccid-

iosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology* 29: 1209-1229.

Williams R.B., Thebo P., Marshall R.N., Marshall J.A. (2010) Coccidian oocysts as type – specimens: long-term storage in aqueous potassium dichromate solution preserves DNA. *Systematic Parasitology* 76: 69-76.

Wilson D. E., Reeder D. M. (2005) *Mammals Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.

Wilson R. J. M. (2002) Progress with parasite plastids. *Journal of Molecular Biology* 319: 257-274.

Wilson R. J. M., Denny P. W., Preiser P. R., Rangachari K., Roberts K., Roy A., Whyte A., Strath M., Moore D. J., Moore P. W., Williamson D. H. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology* 261: 155-172.

Wilson R. J. M., Rangachari K., Saldanha J. W., Rickman L., Buxton R. S., Eccleston J. F. (2003) Parasite plastids: maintenance and functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358: 155-164.

Wise R. R., Hooper J. K. (2007) *The Structure and Function of Plastids*. Springer, Netherlands.

Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Fenton B., Tuovinen T. (2000) Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. *Experimental and Applied Acarology* 24: 863-880.

Zahler, M., Essig, R., Gothe, R. & Rinder, H. (1998) Genetic evidence suggests that *Psoroptes* isolates of different phenotypes, hosts and geographic origins are conspecific. *International Journal for Parasitology* 28: 1713-1719.

Zajac A. M., Conboy G. A. (2006) *Veterinary Clinical Parasitology*. Blackwell Publishing, Iowa, USA. str. 3-8.

Zhao X, Duszynski D. W. (2001a) Molecular phylogenies suggest the oocyst residuum can be used to distinguish two independent lineages of *Eimeria* spp in rodents. *Parasitology Research*, 87: 638-643.

Zhao X., Duszynski D. W. (2001b) Phylogenetic position of *Eimeria antrozoi*, a bat coccidium (Apicomplexa: Eimeriidae) and its relationship to morphologically similar *Eimeria* spp. from bats and rodents based on nuclear 18S and plastid 23S rDNA sequences. *The Journal of Parasitology* 87: 1120-1123.

Zhao X., Duszynski D. W. (2001c) Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology* 31: 715-719.

7.2 Internetové zdroje

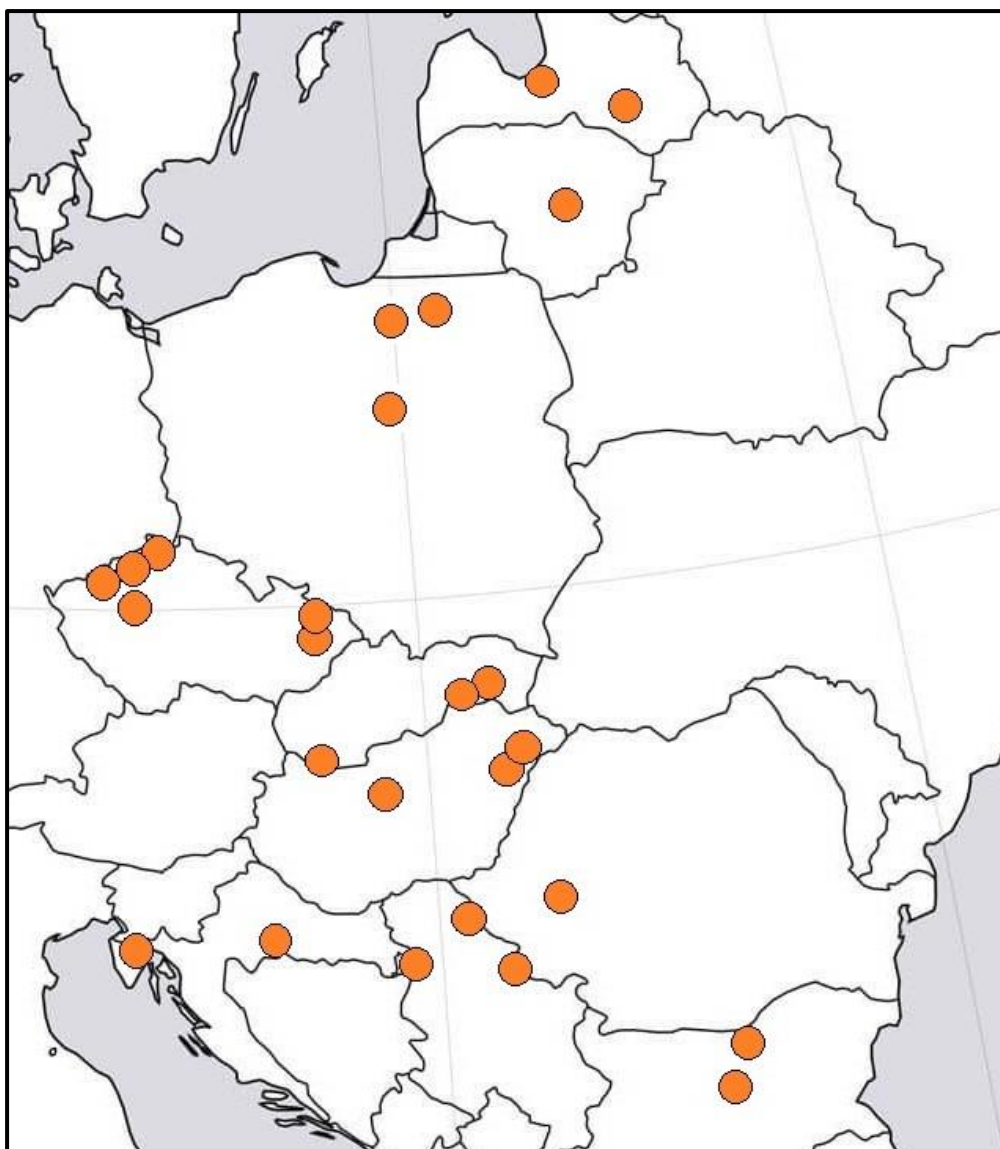
1. NCBI GenBank [online]. ©2019 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
2. The Coccidia of the World [online]. ©2019 [cit. 2019-03-11]. Dostupné z: biology.unm.edu/coccidia/home.html.
3. IUCN [online]. ©2019 [cit. 2019-03-15]. Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/1888/115057408>.
4. NCBI BLAST [online]. ©2019 [cit. 2019-01-28]. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
5. SMS: Smart Model Selection [online]. ©2019 [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: <http://www.atgc-montpellier.fr/sms/>

8 Přílohy

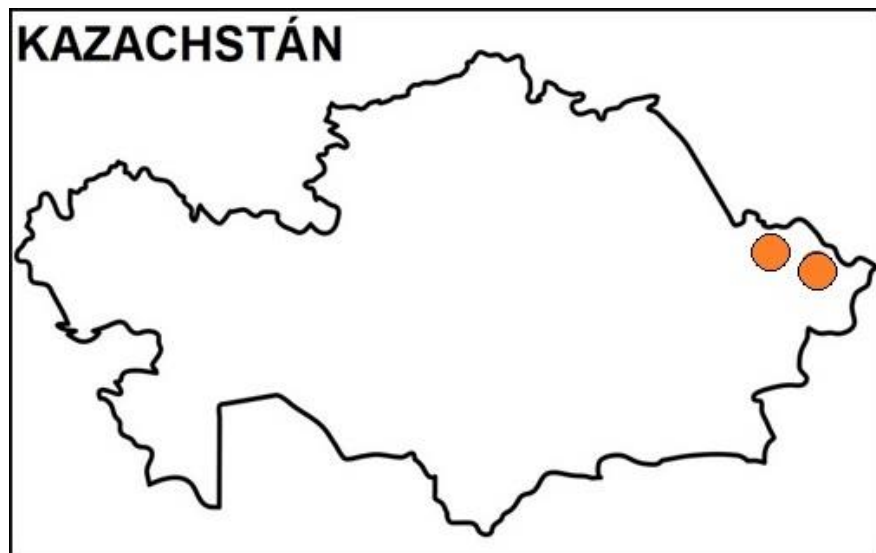
Tab. 3: Seznam použitých sekvencí genu COX 3 dalších rodů kokcií (*Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria* a *Isospora*) z databáze GenBank ve fylogenetických analýzách.

Druh kokcidie	Hostitel	GenBank Accession Number
<i>Caryospora bigenetica</i>	<i>Crotalus horridus</i> (chřestýš lesní)	KP658102
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Homo sapiens</i> (člověk)	KP231180
<i>Eimeria acervulina</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HQ702479
<i>Eimeria adenoeides</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	KJ608415
<i>Eimeria brunetti</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HQ702480
<i>Eimeria dispersa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	KJ608416
<i>Eimeria falciformis</i>	<i>Mus musculus</i> (myš domácí)	KX495129
<i>Eimeria flavescens</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	KP025693
<i>Eimeria gallopavonis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	KJ608413
<i>Eimeria intestinalis</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	KP009592
<i>Eimeria irresidua</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	KP025690
<i>Eimeria magna</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	KF419217
<i>Eimeria maxima</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HQ702481
<i>Eimeria media</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	KP025691
<i>Eimeria meleagrimitis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	KJ608414
<i>Eimeria mitis</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	JN864949
<i>Eimeria necatrix</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HQ702482
<i>Eimeria praecox</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HQ702483
<i>Eimeria tenella</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HQ702484
<i>Eimeria vej dovskyi</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f.	KP025692

	<i>domesticus</i> (králík domácí)	
<i>Eimeria zuernii</i>	<i>Bos taurus</i> (tur domácí)	KX495130
<i>Isospora greineri</i>	<i>Lamprotornis superbus</i> (leskoptev nádherná)	KR108298
<i>Isospora manorinae</i>	<i>Manorina flavigula</i> (medosavka australská)	KX276861
<i>Isospora serinuse</i>	<i>Serinus canaria</i> f. <i>domestica</i> (kanár domácí)	KX276860
<i>Isospora superbusi</i>	<i>Lamprotornis superbus</i> (leskoptev nádherná)	KT203396



Obr. 13: Mapa lokalit původu vzorků kokcií z myšice temnopásé, které jsem fylogeneticky analyzoval. Evropa.



Obr. 14: Mapa lokalit původu vzorků kokcií z myšice temnopásé, které jsem fylogeneticky analyzoval. Kazachstán.