

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa*
(Myxozoa) infikujících střeva a žlučový měchýř ryb
na základě multigenové analýzy**

Diplomová práce

Bc. Marie Hlavničková

Školitel: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2012

Diplomová práce

Hlavničková M., 2012: Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* (Myxozoa) infikujících střeva a žlučový měchýř ryb na základě multigenové analýzy [The phylogenetic relationships of species of the family *Ceratomyxidae* (Myxozoa) infecting the gall bladder and the intestine of fish based on the multigene analysis. Mgr. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Myxozoans, microscopic metazoan parasites, are economically-important fish pathogens. Phylogeny of these organisms do not agree with the current taxonomy. This master thesis aims to gain sequences of SSU rDNA, LSU rDNA and EF2 genes of the gall bladder infecting *Ceratomyxa* species including pathogenic *C. shasta* and *Ceratomyxa* sp. infecting the fish intestine. The assignment was to try to clarify phylogenetic position of *C. shasta* and to assess the phylogenetic relationships of *Ceratomyxa* species infecting the gall bladder and the intestine. Eleven LSU rDNA sequences, five SSU rDNA sequences and ten EF2 sequences were obtained. The resulted phylogenetic relationships are shown in the trees.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v ezkrácené 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.

Českých Budějovicích dne

.....

Marie Hlavničková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Ivanu Fialovi za pomoc s touto diplomovou prací, trpělivost, dobré rady a přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat celé Laboratoři rybí protistologie parazitologického ústavu za pomoc a rady v laborce. Dík patří také mé rodině a příteli, kteří mě podporují ve studiu.

OBSAH

1. Úvod	1
1.1. Charakteristika myxozoi.....	1
1.2. Životní cyklus.....	2
1.3. Klasifikace myxozoi.....	3
1.4 Čeleď Ceratomyxidae, Dolfein (1899).....	4
1.4.1 Rod Ceratomyxa, Thélohan (1892).....	4
1.5. Fylogeneze myxozoi.....	5
1.6. Taxonomie čeledi Ceratomyxidae.....	7
1.7. Fylogeneze druhů rodu Ceratomyxa.....	8
2. Cíle práce.....	10
3. Materiál.....	11
4. Metodika.....	13
4.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	13
4.2. Gelová elektroforéza.....	16
4.3. Izolace PCR produktu.....	17
4.4. Ligace.....	17
4.5. Transformace.....	17
4.6. PCR screening.....	17
4.7. Namnožení a izolace plazmidu.....	18
4.8. Sekvence.....	18
4.9. Fylogenetická analýza.....	19
5. Výsledky.....	21
6. Diskuze.....	30
7. Závěr.....	34
8. Seznam literatury.....	35

1. Úvod

1.1. Charakteristika myxozoi

Myxozoa jsou mikroskopičtí metazoární parazité infikující široké spektrum hostitelů. Převážná většina zástupců myxosporeí má jako mezihostitele sladkovodní a mořské ryby (Kent a kol. 2001; Canning a Okamura 2004; Lom a Dyková 2006). Méně častými mezihostiteli jsou obojživelníci (Eiras 2005; Jirku a kol. 2006) a plazi (Bartholomew a kol. 2008). Nedávné studie potvrdily výskyt myxozoi také u některých teplokrevných obratlovců, vývojová stádia myxozoi byla nalezena u krtka, rejska a vodních kachen (Friedrich a kol. 2000; Dyková a kol. 2007; Prunescu a kol. 2007; Bartholomew a kol. 2008). Definitivními hostiteli myxosporeí jsou sladkovodní máloštětinatci a také mořští mnohoštětinatci. Aktinospory *Tetractinomyxon intermedium* (Ikeda 1912) byly nalezeny také u mořských sumýšovců (Lom a Dyková 2006).

V současné době je popsáno více než 2300 druhů myxosporeí parazitujících na rybách (Morris 2010) a 25 druhů parazitujících na obojživelnících (Eiras 2005; Hartigan a kol. 2012). Kmen Myxozoa je tvořen dvěma třídami: Myxosporea a Malacosporea. Do třídy Myxosporea (Bütschli 1882) je řazena převážná většina zástupců. Pouze tři druhy jsou řazeny do třídy Malacosporea (Canning, Curry, Feist, Longshaw a Okamura 2000).

Myxozoa jsou charakterizována spory, které jsou složeny z několika buněk přeměněných na dvě a více chlopní, jeden až dva améboidní infekční zárodky (sporoplasmy) a jeden nebo více pólových váčků. Pólové váčky obsahují vymrštělná vlákna, která mají ukotvovací funkci. Mitochondrie mají plochý, tubulární nebo diskovitý tvar. Rozměry spor jsou 10 až 20 μm , výjimkou je např. *Myxidium giganterium*, u kterého mohou být spory dlouhé až 98 μm .

Myxosporeové spory mohou mít různou strukturu a tvar, různý počet pólových váčků a chlopní spor. Na základě těchto odlišností se taxonomicky dělí na dva řády: Bivalvulida a Multivalvulida. Spory bivalvulidů mají jeden, dva nebo čtyři pólové váčky a dvě chlopně. Spory multivalvulidů mají větší počet pólových váčků i chlopní.

Vegetativní stádia u zástupců třídy Malacosporea se mohou vyskytovat ve formě organismů s vnější bilatérní symetrií, jako je tomu v případě *Buddenbrockia plumatellae*. U Myxosporeí jsou vegetativní stádia histozoická nebo celozoická a dochází zde k vývoji na mnohobuněčná plasmodia, která ve sporogonické fázi produkují spory (Lom a Dyková 1992).

Histozoická stádia se vyskytují většinou intracelulárně, jsou nepohyblivá, zakulacená a zapouzdřená ve tkáni hostitele. Celozoická stádia se vyskytují volně v tekutině uvnitř tělních dutin nebo dutin tělních orgánů jako je žlučový měchýř, žlučovody a močový trakt a nebo jsou přichycena na stěnách těchto orgánů. Celozoická plasmodia mohou mít pohyblivá pseudopodia.

Většina myxozoi nemá na svého hostitele patogenní vliv. Některé druhy však mohou způsobovat ekonomicky významné ztráty v akvakulturách, protože snižují tržní hodnotu ryb, popřípadě způsobují i smrt svého hostitele. Jsou to například *Myxobolus cerebralis*, který napadá lososovité ryby a je také zodpovědný za pokles počtu volně žijících pstruhů v několika západních státech USA (Hedrick a kol. 1998; Nehring a Walker 1996; Nickum 1999; Vincent 1996). *Enteromyxum leei* napadá hlavně chovy ryb ve středomoří (Rigos a Katharios 2010) a Asii (Yanagida a kol. 2006, 2008; Yasuda a kol. 2005), vyvolává těžké střevní katary což má za následek extrémní vyhublost až úhyn ryb (Diamant 1994). *Tetracapsuloides bryosalmonae* způsobuje proliferativní onemocnění ledvin postihující především sladkovodní lososovité ryby v Evropě a Severní Americe (Hedrick a kol. 1993). Dva druhy rodu *Kudoa*, *Kudoa thyrssites* a *Kudoa septempunctata*, napadají svalovou tkáň platýsů a způsobují tak snížení jejich tržní hodnoty (Matsukane a kol. 2010; Yokoyama a kol. 2004). *Sphaerospora dicentrarchi* způsobuje silné infekce u mořských okounů a zapříčiňuje úhyn především mladých ryb (Alvarez-Pellitero a Sitja-Bobadilla 1993).

1.2. Životní cyklus

Životní cyklus byl poprvé popsán Wolfem a Markiwem (1984) u *Myxobolus cerebralis*. Skládá se z myxosporové a aktinosporové fáze a probíhá ve dvou hostitelích. Myxosporová fáze probíhá u nižších obratlovců, nejčastěji u ryb, a končí produkcí myxospor. Aktinosporová fáze probíhá převážně u kroužkoveců a končí produkcí aktinospor.

Aktinospory uvolněné z kroužkovce se po kontaktu s kožním nebo žaberním epitelem přichycují pomocí pólových vláken na povrch hostitele. Sporoplazma se dostává hlouběji do hostitele, dochází k presporogennímu vývoji a ke vzniku vnitřní sekundární buňky uvnitř primární buňky. Toto stádium tzv. buňka v buňce je pro Myxozoa typické. Poté dochází k endogennímu dělení sekundárních buněk. Ty po protržení membrány původních buněk vstupují přes cytoplazmu až do extracelulárního prostoru a odtud na konečné místo své

lokalizace uvnitř hostitele, kde vznikají plasmodia. Dochází ke složitému dělení a diferenciaci původních generativních buněk za vzniku sporoblastů, které po dozrání dávají vznik myxosporám. Ty po uvolnění z rybího hostitele infikují kroužkovce.

První fází vývoje v kroužkovci je schizogonie. Spory uvolněné z rybího hostitele se dostávají do střeva kroužkovce, dochází k jejich přichycení na střevní stěnu a uvolnění dvoujaderné sporoplazmy, která se začne dělit. Následuje druhá fáze: gametogonie. Při ní se jádra dvoujaderných stádií dělí na stádia se čtyřmi jádry. Vznikají dvě somatické buňky a dvě generativní buňky, které se označují jako α a β . Poté dochází ke třem mitotickým dělením generativních buněk za vzniku šestnácti diploidních gametocytů. Tyto procházejí jedním meiotickým dělením, při kterém vzniká šestnáct haploidních gametocytů a šestnáct polárních tělísek. Každý gametocyt z linie α se spojí s jedním z linie β a vzniká osm zygot. Somatické buňky dávají ve dvou děleních vznik osmi obklopujícím buňkám. Během poslední fáze, sporogonie, prochází každá zygota dvěma mitotickými děleními. Vznikají čtyřbuněčné formy. Následuje řada mitotických dělení, při kterých vznikají kapsulogenní a valvogenní buňky a následně sporoplazma aktinospory. Finální stádium, které je vypuštěno z červa, obsahuje osm aktinosporových spor.

1.3. Klasifikace myxozoi

Současná klasifikace vychází z práce Loma a Nobleho (1984). Hlavním kritériem je morfologie spor, především počet a uspořádání pólových váčků a chlopní. Celkově je tato taxonomie nepřesná neboť nezohledňuje životní cyklus myxozoi se střídáním hostitelů, morfologii aktinospor a hlavně data získaná fylogenetickou analýzou SSU rDNA. Dvě hlavní větve myxozoi, Myxosporea a Malacosporea, jsou stanoveny na základě životního prostředí jejich hostitelů - mořském a sladkovodním prostředí. Tyto třídy jsou dále rozděleny na podtřídy, ve kterých seskupení rodů a druhů ne vždy odpovídá struktuře spor. Některé druhy, které mají podobné spory, tzn. patří ke stejnému rodu, ve fylogenetických stromech klastrují odděleně. Zatímco druhy z morfologicky odlišných rodů klastrují dohromady.

Třída Myxosporea je rozdělena do dvou řádů: Bivalvulida a Multivalvulida. Zástupci řádu Bivalvulida mají dvě chlopně spojené švem. Mají většinou dva, někdy čtyři nebo vzácně jeden pólový váček a jednu či dvě sporoplazmy. Bivalvulida se dále dělí do tří podřádů: Sphaeromyxina, Platysporina a Variisporina. Zástupci podřádu Sphaeromyxina se vyznačují

krátkými, postupně se rozšiřujícími pólovými vlákny, která jsou v pólovém váčku několikrát přeložena. Jsou to celozoiční parazité mořských ryb. Do tohoto podřádu patří pouze rod *Sphaeromyxa*. Členové podtřídy Platysporina mají zpravidla dva, někdy jeden pólový váček ležící v linii švu spory. Jsou to nejčastěji histozoiční parazité sladkovodních ryb. Patří sem např. rody *Myxobolus*, *Trigonosporus*, *Henneguya*, *Thelohanellus*, *Tetrauronema*, *Neohenneguya*. Zástupci podtřídy Variisporina mají jeden, dva nebo čtyři pólové váčky, které jsou různě umístěné. Jsou převážně celozoiční parazité mořských ryb. Rody patřící do této podtřídy jsou např. *Myxidium*, *Zschokkella*, *Enteromyxum*, *Ceratomyxa*, *Sphaerospora*, *Palliatum*, *Chloromyxum*, *Auerbachia*.

Řád Multivalvulida se vyznačuje radiálně symetrickými sporama, dvěma či více chlopněmi. Linie švu je často nezřetelná. Počet pólových váčků odpovídá počtu chlopní. Plasmodia parazitují ve svalové tkáni mořských ryb. Patří sem např. rody *Kudoa*, *Unicapsula*, *Trilospora*, *Octospina*.

Zástupci třídy Malacosporea jsou parazité mechovek a ryb s jedním řádem Malacovalvulida, do kterého patří dva rody *Tetracapsuloides* a *Buddenbrockia*.

1.4 Čeleď Ceratomyxidae, Dolfein (1899)

Zástupci této čeledi mají spory s chlopněmi protáhlými do enormní šířky. Chlopně mohou být asymetrické. Pólové váčky jsou sférické nebo subsférické, umístěny blízko linie švu v kolmé rovině. Plasmodia jsou disporická, méně často mono- až poly-sporická. Jsou to převážně celozoiční parazité mořských ryb, výjimečně histozoiční parazité sladkovodních ryb.

1.4.1 Rod Ceratomyxa, Thélohan (1892)

Zástupci rodu *Ceratomyxa* jsou celozoiční parazité mořských ryb (Lom a Dyková 1992). Výjimku tvoří čtyři druhy napadající sladkovodní ryby: *Ceratomyxa anguillae*, *Ceratomyxa hilsae*, *Ceratomyxa hongzhensis*, *Ceratomyxa hungarica* (Lom a Dyková 2006); a jeden histozoický parazit: *Ceratomyxa shasta* (Ibarra a kol. 1991). *Ceratomyxa* spp. mají protáhlé spory ve tvaru půlměsíce nebo obloukovité. Chlopně jsou kuželovité a přesahují axiální průměr spor. Pólové váčky jsou subsférické. Dvoujaderná sporoplazma nezaplňuje

kompletně celou dutinu spory. Trofozoiti mohou být mono- až poly- sporické, většinou jsou však disporické. Rod zahrnuje přibližně 135 druhů (Lom a Dyková 1992).

Ceratomyxa shasta je významný zástupce rodu *Ceratomyxa*. Způsobuje onemocnění lososovitých ryb, které je charakteristické hemoragiemi a nekrózou střev. Vyskytuje se především v Severní Americe (Hoffmaster a kol. 1988; Bartholomew a kol. 1997). Napadá nejméně 10 druhů lososovitých a pstruhovitých ryb (Bartholomew a kol. 1989). Závažnost infekce se liší v závislosti na druhu a kmenu hostitele a je také ovlivněna životním prostředím, zejména teplotou vody (Udey a kol. 1975; Zinn a kol. 1977). Životní cyklus probíhá ve dvou hostitelích: lososovité rybě pro myxosporovou fázi a sladkovodním mnohoštětinatci *Manayunkia speciosa* pro aktinosporovou fázi (Bartholomew a kol. 1997). *C. shasta* byla na základě geografické lokalizace, místě infekce v hostiteli a morfologii spor považována za unikátního parazita, jehož fylogenetická pozice představuje samostatnou linii. Výsledky studie Gunter (2009) se ovšem liší a umísťují *C. shasta* do nejbazálnější pozice kladu mořských druhů rodu *Ceratomyxa*. Nedávná studie odhalila přítomnost několika genotypů v rámci populace parazita v řece Klamath v Oregonu (Atkinson a Bartholomew 2010). Na základě trinukleotidového opakování ATC byly získány 4 ITS-1 genotypy: 0, I, II, III.

1.5. Fylogeneze myxozoi

Původ a zařazení myxozoi do fylogenetického stromu nebyl donedávna zcela jasný. Jednoduchý tvar spor, plasmodium s jednotlivými uvnitř rostoucími buňkami a nálezy parazita u většiny obratlovců poskytovaly jen velmi málo indicií k objasnění původu myxozoi a jejich zařazení (Canning a Okamura 2004). Studie byly z počátku zaměřeny především na morfologii spor, vývojová stádia a reprodukci, což neřešilo příbuzenské vztahy (Kent a kol. 2001). Částečné rozřešení přinesla genetická studie, která zařadila Myxozoa k metazoím (Smothers a kol. 1994). Výsledky dalších studií za pomoci molekulárních metod se však neshodovaly a řadily Myxozoa buď k žahavcům nebo k bilateriím (Siddall a kol. 1995; Schlegel a kol. 1996; Siddall a Whiting 1999; Zrzavý a Hypša, 2003; Jimenez-Guri a kol. 2007; Evans a kol. 2010). Teorie příbuznosti s bilateriemi byla dále podpořena morfologií *Buddenbrockia plumatellae* ze skupiny Malacosporea (Okamura a kol. 2002) a identifikace Hox genů myxozoi, které byly shodné s bilateriemi (Anderson a kol. 1998). Později však bylo zjištěno, že tyto geny byly hostitelského původu (Jiménez-Guri a kol. 2007).

Morfologická, biochemická a funkční podobnost pólových váčků myxozoi a nematocyst žahavců a především nedávná identifikace genu myxozoi, který je homologický s minicollagenem nematocyst žahavců, poukazují na jejich příbuzenský vztah (Holland a kol. 2011).

Na základě fylogenetické analýzy byla Myxozoa rozdělena do dvou hlavních větví: mořské a sladkovodní (Kent a kol. 2000, 2001). Výjimku tvoří *Ceratomyxa shasta*, někteří zástupci rodů *Myxobolus* a *Henneguya*, *Chloromyxum leydigi* (Fiala a Dyková 2004), *Parvicapsula minibicornis* (Jones a kol. 2004) a druhy rodu *Sphaeromyxa* (Diamant a kol. 2004), kteří neodpovídají tomuto rozdělení.

Vnitřní topologie hlavních větví naznačuje, že Myxozoa spolu klastrují na základě různých charakteristik. Salim a Desser (2000) analyzovali pozici sedmi zástupců rodu *Myxobolus*, kteří klastrovali spolu na základě morfologie spor. Naproti tomu, analýza deseti jiných zástupců tohoto rodu (Andree a kol. 1999) odhalila klastrování na základě lokalizace uvnitř hostitele. Toto potvrdila také studie Holzer a kol. (2004). Whipps (2004) se také domnívá, že místo infekce v hostiteli je důležitým kritériem pro zástupce rodu *Kudoa*. Zástupci jednotlivých podskupin mají ve většině případů společnou lokalizaci v hostiteli. A právě tento faktor se zdá být klíčovým v příbuzenských vztazích myxozoi.

Dalším faktorem odlišujícím sladkovodní a mořská Myxozoa je délka SSU rDNA sekvence. Zástupci sladkovodní větve mají SSU rDNA sekvenci obsahující více než 2 000 nukleotidů (nt), zástupci mořské linie mají SSU rDNA sekvenci kratší - přibližně 1800 nt.

Kromě dvou hlavních fylogenetických linií byla identifikována třetí, nejbazálnější, která zahrnuje druhy s dlouhými SSU inzerty: *Sphaerospora truttae*, *S. elegans*, *S. ranae* a *Leptotheca fugu* (Jirků a kol. 2007). Díky inzertům může délka SSU rDNA přesahovat 2 500 nt (Holzer a kol. 2007).

Sladkovodní linie se dále fylogeneticky dělí do podskupin. Fylogenetické vztahy mezi podskupinami sladkovodní linie se v jednotlivých analýzách zásadně neliší. Naproti tomu fylogenetické vztahy v rámci podskupin u mořské linie nejsou zcela jasné. Řešení nepřinesla ani kombinovaná analýza SSU a LSU rDNA (Bartošová a kol. 2009), která vycházela z více než dvojnásobného datasetu než samotná analýza SSU rDNA.

1.6. Taxonomie čeledi *Ceratomyxidae*

Čeď Ceratomyxidae ješře do nedávna zahrnovala řtyři rody: *Ceratomyxa* Thélohan, 1892, *Leptotheca* Thélohan, 1895, *Meglitschia* Kovaleva, 1988 a *Ellipsomyxa* K ie, 2003 (Lom a Dyková 2006). Tato klasifikace m la dlouhou avšak nejasnou historii.

Thélohan (1892) sestavil klasifikaci na základě morfologie spor. Šest druhů, vřetn  typového druhu, *Leptotheca agilis*, bylo přiřazeno k rodu *Leptotheca*. *L. agilis* byla ovšem p vodn  popsána jako *Ceratomyxa agilis* Thélohan, 1892.

Doflein (1899) sestavil klasifikaci na základě vegetativního vývoje, ve které řeď Ceratomyxidae zahrnovala v té době pouze rody *Ceratomyxa* a *Leptotheca*.

Jameson (1929) nevril, že rozdělení rodů *Ceratomyxa* a *Leptotheca* na základě variability spor je oprvn n . Navrhoval zařazen druhů rodu *Leptotheca* do rodu *Ceratomyxa* a zd razn n podobností mezi nimi. Nicméně jeho návrhy byly ignorovány a řada zástupců, kter  přiřadil do rodu *Ceratomyxa*, byly později Kudou (1933) přeřazeny do rodu *Leptotheca*. Od té doby však bylo mnoho zástupců z rodu *Leptotheca* postupn  přeřazeno do jiných rodů, např.: *L. parva* Thélohan, 1895, *L. coris* Stempel, 1918, *L. inaequalis* Doflein, 1898, *L. obovalis* Fantham, 1930, *L. macrospora* Auerbach, 1909, *L. platichthys* Fujita, 1923 a *L. yoichiensis* Fujita, 1923 byly p vedeny do rodu *Ceratomyxa* (Kudo 1933; Dogiel 1948). *L. acheilognathi* Fujita, 1927 je nyní popisován jako *Myxobolus acheilognathi* (Landsberg a Lom, 1991). *L. brevis* Polyanskii, 1955, *L. ohlmacheri* Whinery, 1893 a *L. ranae* Thélohan, 1895 byly přemístěny do rodu *Sphaerospora* (Arthur a Lom 1985; Desser a kol. 1986; Jirků a kol. 2007). *Ceratomyxa abbreviata* Davis, 1917, *C. fisheri* Jameson, 1929, *C. galeata* Jameson, 1929, *C. inconstans* Jameson, 1929 a *C. faba* Meglitsch, 1960 byly naopak přeřazeny do rodu *Leptotheca* (Kudo 1933; Zhao a Song 2003). Tyto změny však jsou v některých případech p ehlzeny a v publikacích se parazity stále objevují pod svými původními jmény.

Z morfologie spory a definice rodů je zřejm , že v některých případech je velmi problematick  od sebe odlišit druhy rodu *Ceratomyxa* a *Leptotheca* nebo *Leptotheca* a *Sphaerospora*. N kter druhy rodu *Leptotheca* mají charakteristick  znaky, které jsou velmi podobn  znakům u *Ceratomyxa* spp. Např. délka chlopn a axiln průměr spor jsou v poměru 1:1 nebo méně, poměr délky a tloušřky spory je 1:2 nebo méně. Gunter a Adlard (2010) se domnívají, že tyto poměry by neměly být považovány za adekvtn měřítko pro rozdělení těchto dvou rodů, zejména kdyř zařazen typového druhu *L. agilis* (Thélohan, 1892) je velmi

nejednoznačné. Proto se ve své studii pokusili tuto problematiku vyřešit. Navrhují zrušení rodu *Leptotheca* a tím zjednodušení klasifikace.

Ve své studii navrhuje tyto změny:

Čtyřicet dva druhů formálně patřících k rodu *Leptotheca* přesunují do rodu *Ceratomyxa* na základě morfometrické podobnosti a tkáňové lokalizaci uvnitř hostitele. Např. *Ceratomyxa acanthopagri* původně *Leptotheca acanthopagri*, *Ceratomyxa agilis* původně *Leptotheca agilis*, *Ceratomyxa elongata* původně *Leptotheca elongata*, *Ceratomyxa informis* původně *Leptotheca informis*, *Ceratomyxa longipes* původně *Leptotheca longipes*. Jeden druh formálně patřící k rodu *Leptotheca* byl přesunut do rodu *Ellipsomyxa* na základě morfologie spor. Je to *Ellipsomyxa fusiformis* původně *Leptotheca fusiformis*. Stejně tak na základě morfometrické podobnosti a tkáňové lokalizace byl jeden druh formálně patřící do rodu *Leptotheca* přemístěn do rodu *Myxobolus*. Je to *Myxobolus lalithakumarii* původně *Leptotheca lalithakumarii*. Osmnáct druhů formálně patřících k rodu *Leptotheca* je přesunuto do rodu *Sphaerospora* na základě morfometrické podobnosti, molekulárních dat a lokalizace v hostiteli. Např. *Sphaerospora armatura* původně *Leptotheca armatura*, *Sphaerospora compressa* původně *Leptotheca compressa*, *Sphaerospora subsphaerica* původně *Leptotheca aubsphaerica*.

1.7. *Fylogeneze druhů rodu Ceratomyxa*

Druhy rodu *Ceratomyxa*, jako jedny z mála myxosporeí, klastrují v jednom kladu a mají tedy společného předka. Výjimku tvoří druh *C. shasta*, který je fylogeneticky unikátní parazit, jehož pozice představuje samostatnou linii bez pevného vztahu k jakékoli skupině mořských myxozoí. Nikdy se nepřičítá dovnitř žádné dobře ustanovené skupiny. Klastruje např. jako blízký příbuzný *Enteromyxum* spp. (Fiala 2006, Freeman a kol. 2008, Fiala a Bartošová 2010), *Parvicapsula* spp. (Koie a kol. 2008, Heiniger a kol. 2008, Gunter a Adlard 2009), jako sesterský taxon všech skupin mořských myxozoí s výjimkou skupiny infikující žlučový měchýř (Jirků a kol. 2007) nebo jako sesterský taxon skupiny mořských myxozoí infikující žlučový měchýř (Fiala a Dyková 2004, Jirků a kol. 2006). Nicméně žádná z uvedených studií nebyla zaměřena přímo na fylogenetickou pozici *C. shasta*. Rozsáhlé studie Gunter a Adlard (2008) a Gunter a kol. (2009), které byly zaměřeny na fylogenetické vztahy všech *Ceratomyxa* spp., jejichž sekvence jsou dostupné v Genové bance, umístili *C. shasta* do pozice sesterského taxonu všech *Ceratomyxa* spp. Ke stejným závěrům došli ve

své studii i Gleeson a Adlard (2011). Z této práce je zřejmý fylogenetický vztah *C.shasta* a *Ceratomyxa* spp., ale vzhledem k tomu, že analýza zahrnuje sekvence pouze *Ceratomyxa* spp. a outgroupovou skupinu, není již jasná pozice *C. shasta* vzhledem k dalším myxozoím. Avšak bootstrapová podpora tohoto umístění byla vždy nízká, pouze ve studii Gunter a kol. (2009) byla maximální podpora v analýze metodou Bayesian posterior probabilities, ovšem tento uzel měl v analýze metodou maximální pravděpodobnosti bootstrapovou podporu pod 50%.

Ve své bakalářské práci (Hlavničková 2010) jsem sekvenčně charakterizovala a fylogeneticky analyzovala jedenáct vzorků myxosporeí, které sekvenčně odpovídaly charakteristice rodů *Ceratomyxa* a *Leptotheca*. Dva vzorky, získané ze žlučového měchýře ryb, morfologicky odpovídaly charakteristice rodu *Leptotheca* a byly identifikované jako *Leptotheca informis* a *Leptotheca longipes*. Fylogenetickou analýzou SSU rDNA sekvencí těchto vzorků byla zjištěna jejich pozice uvnitř rodu *Ceratomyxa* a tím i potvrzena správnost přeřazení těchto druhů do rodu *Ceratomyxa*. V magisterské práci jsem navázala na práci bakalářskou s tím, že těžiště zájmu bylo přesunuto na objasnění fylogenetické pozice druhu *C. shasta*. Hlavním cílem bylo rozšířit sekvenční dataset zejména druhů rodu *Ceratomyxa* o nové molekulární markery a o nové sekvence za účelem co možná nejuvěrohodnější fylogenetické rekonstrukce druhu *C. shasta*, významného střevního parazita ryb.

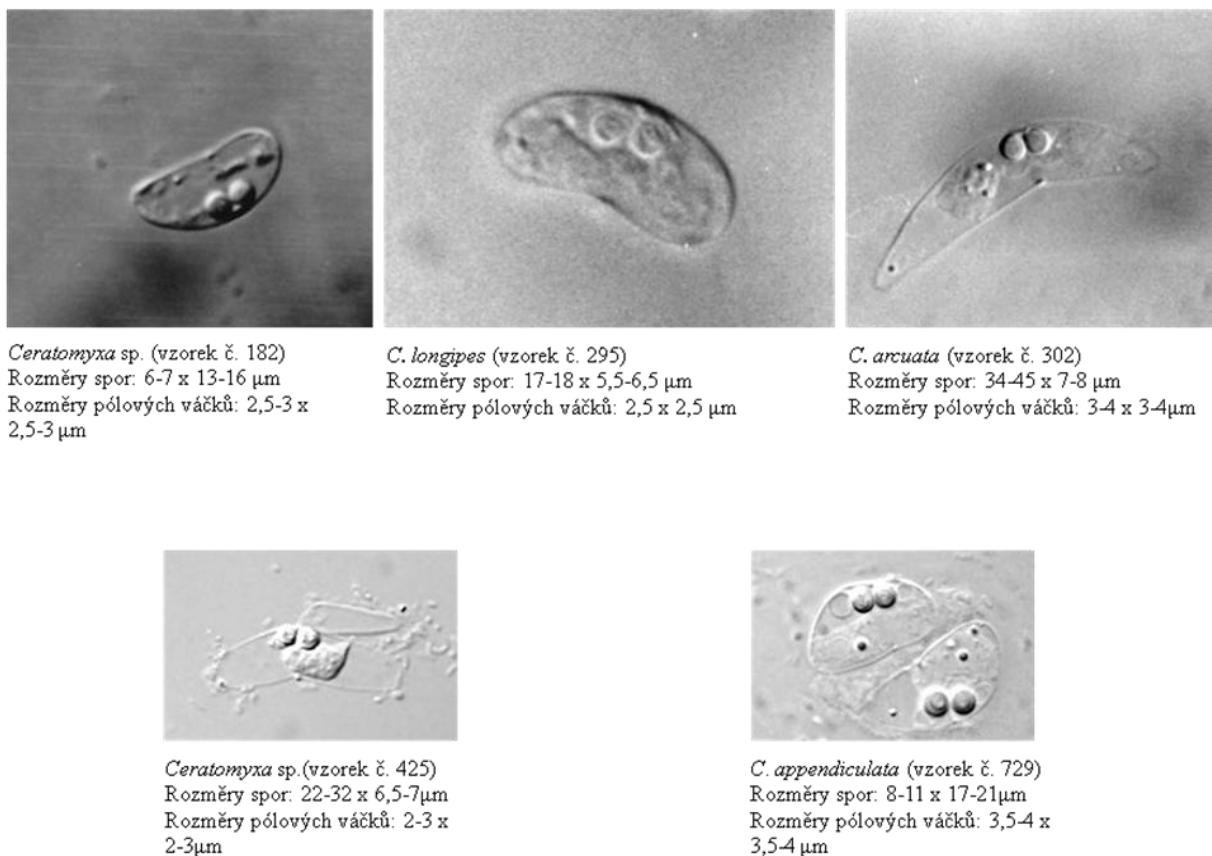
2. Cíle práce

1. Získání sekvencí LSU rRNA a EF2 genu u druhů *Ceratomyxa shasta* a *Ceratomyxa* sp. infikujících střevo ryb.
2. Doplnění existujícího datasetu SSU rDNA, LSU rDNA a EF2 genů myxosporeí o vhodné sekvence pro fylogenetickou analýzu rodu *Ceratomyxa*.
3. Multigenová fylogenetická analýza získaných sekvencí - zjištění fylogenetického vztahu střevních a žlučnickových druhů rodu *Ceratomyxa*.

3. Materiál

Většinu vzorků DNA určených k fylogenetické analýze mi byla poskytnuta mým školitelem, který je získal v minulosti během terénních sběrů. Při jejich získávání byla také zhotovena dokumentace a zaznamenány rozměry spor. Tyto údaje byly použity v bakalářské práci (Hlavničková 2010) při identifikaci získaných druhů rodu *Ceratomyxa* s již popsány druhy. Podrobná obrazová dokumentace analyzovaných spor druhů rodu *Ceratomyxa* byla prezentována v bakalářské práci.

Na obrázku (Obr. 1) je zobrazena fotodokumentace a rozměry spor analyzovaných druhů rodu *Ceratomyxa* u nichž byla získána nová sekvenční data.



Obr. 1: Fotodokumentace a rozměry spor analyzovaných druhů rodu *Ceratomyxa* s novými sekvenčními daty.

Vzorky druhů *Parvicapsula minibicornis*, *Ceratomyxa shasta* a *Ceratomyxa* sp. z *Gasterosteus aculeatus* byly poskytnuty Dr. Stephanem Atkinsonem (Oregon State

University, USA). Vzorky *Myxodavisia* sp. z *Megalops cyprinoides*, *Ceratomyxa* sp. (LJ1) a *Ceratomyxa* sp. (LJ2) byly poskytnuty Dr. Markem Freemanem (Institute of Ocean and Earth Sciences, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia). K těmto vzorkům nemáme k dispozici obrazovou dokumentaci.

Seznam a popis poskytnutých vzorků je uveden v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Seznam a popis vzorků.

Označení	Myxospora	Hostitel	Tkáňová lokalizace	Geografická lokalizace
Cs II	<i>Ceratomyxa shasta</i>	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Střevo	USA
182	<i>Ceratomyxa</i> sp.	<i>Scorpaena porca</i>	Žlučový měchýř	Chorvatsko
295	<i>Ceratomyxa longipes</i>	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Žlučový měchýř	Skotsko
297	<i>Ceratomyxa informis</i>	<i>Merlangius merlangus</i>	Žlučový měchýř	Skotsko
302	<i>Ceratomyxa arcuata</i>	<i>Lophius piscatorius</i>	Žlučový měchýř	Skotsko
425	<i>Ceratomyxa</i> sp.	<i>Synaphobranchus kaupii</i>	Žlučový měchýř	Skotsko
729	<i>Ceratomyxa appendiculata</i>	<i>Lophius piscatorius</i>	Žlučový měchýř	Norsko
Ca Ga	<i>Ceratomyxa</i> sp.	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Střevo	USA
LJ1	<i>Ceratomyxa</i> sp.	<i>Aluterus monoceros</i>	Žlučový měchýř	Malajsie
LJ2	<i>Ceratomyxa</i> sp.	<i>Aluterus monoceros</i>	Žlučový měchýř	Malajsie
MyxD	<i>Myxodavisia</i> sp.	<i>Megalops cyprinoides</i>	Žlučový měchýř	Malajsie
Pm Ga	<i>Parvicapsula minibicornis</i>	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Žlučový měchýř	USA

4. Metodika

4.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Izolovaná DNA sloužila jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Reakční směs o výsledném objemu 25 μ l se připravovala do 0,5 ml mikrozkušavek. Na jednu reakci se smíchalo 2,5 μ l 10x PCR pufru, 2 μ l nukleotidů (250 μ mol), 1 μ l forward primeru, 1 μ l reverse primeru (10 pmol), 1 μ l Taq purple polymerázy (1u) (Top-Bio), 1 μ l vzorku DNA a doplnilo se 16,5 μ l deionizované vody. Při použití Titanium PCR polymerázy (Clontech) byl celkový reakční objem pouze 10 μ l. Na jednu reakci byl smíchán 1 μ l 10x pufru, 0,8 μ l nukleotidů, 0,4 μ l od každého primeru, 0,2 μ l Titanium PCR polymerázy, 1 μ l DNA a 6,2 μ l vody. Tato polymeráza byla použita v případě negativních výsledků při amplifikaci LSU rDNA.

Jednotlivé primery se lišily v závislosti na sekvenci hledaného genu:

Protože LSU rDNA je dlouhý gen, byl sekvenován nadvakrát a za použití nested PCR.

První část LSU rDNA byla amplifikována použitím primerů NLF 164, NLR 2571 pro první PCR a 1LSU-CER-F2, 1LSU-CER-R2 pro následnou PCR.

Pro druhou část LSU rDNA byla použita kombinace primerů NLF 1050, NLR 3284 pro první PCR a primery 2LSU-CER-F2, 2LSU-CER-R2 pro následnou PCR.

Pokud nedošlo ke správnému navázání primerů, byly pro první PCR použity primery 1LSU-CER-F1, 1LSU-CER-R1 v případě první část LSU rDNA a primery 2LSU-CER-F1, 2LSU-CER-R1 v případě druhé části LSU rDNA.

Při amplifikaci EF2 genu byla použita nested PCR s kombinací primerů EF2-F, EF2-R pro první PCR a EF2-INT2-R, EF2-INT2-R pro následnou PCR.

SSU rDNA byla amplifikována pomocí nested PCR s primery ERIB 1, ERIB 10 pro první PCR a pro následnou PCR se specifickými primery pro druhy rodu *Ceratomyxa* SSU-CER-FOR a SSU-CER-REV.

Seznam použitých primerů je sepsán v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: Seznam použitých primerů.

Název	Sekvence 5' → 3'	Reference
1LSU-CER-F1	GTAAGTGGCGAGTGAAGCG	Předložená práce

1LSU-CER-F2	CCGATAGCGAACAAGTAC	Předložená práce
1LSU-CER-R1	TTTGCCKACTTCCCTTACCC	Předložená práce
1LSU-CER-R2	TCACCTWGGAGACCTGMTGCGG	Předložená práce
2LSU-CER-F1	GTGTCTAACAACCTCACCTGCCG	Předložená práce
2LSU-CER-F2	GTGCAGATCTTGGTGGTAGTAG	Předložená práce
2LSU-CER-R1	GGGTGAACAATCCAACACTWTGGG	Předložená práce
2LSU-CER-R2	TAGGAAGAGCCGACATCGAAGG	Předložená práce
EF2-F	GGNGCNGGNGARYTNCAYYTNGA	Hashimoto a kol. 1995
EF2-R	CCARTGRTCRAANACRCAYTGNGGR AA	Hashimoto a kol. 1995
EF2-INT2-F	GATTTRGARGARGATCATGC	Bartošová a kol. (v tisku)
EF2-INT2-R	CAGTAAAACCRAAAGATTC	Bartošová a kol. (v tisku)
ERIB 1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Bárta a kol. 1997
ERIB 10	CTCCGCTGGTTCACCTACGG	Bárta a kol. 1997
NLF 160	ACCTCCACTCAGGCAAGATTA	Bartošová a kol. 2009
NLF 1050	AATCGAACCATCTAGTAGCTGG	Bartošová a kol. 2009
NLR 2571	CTCAACAGGGTCTTCTTTCC	Bartošová a kol. 2009
NLR 3284	TTCTGACTTAGAGGCGTTCAG	Van der Auwera a kol. 1994
SSU-CER-FOR	CTWGTTGGTADGGTAGTG	Předložená práce
SSU-CER-REV	GTACAAGAGGCAGAGACGTAT	Předložená práce

Vždy byly připravovány negativní kontroly.

PCR probíhala v přístrojích termocyklerech Tpersonal (Biometra).

Amplifikace LSU rDNA probíhala za těchto podmínek:

První PCR:

1. 94°C 120 s
2. 94°C 60 s
3. 48°C 60 s
4. 72°C 105 s
5. 2-4 opakovat 4x
6. 94°C 60 s
7. 52°C 60 s
8. 72°C 105 s
9. 6-8 opakovat 24x
10. 68°C 10 min

Následná PCR:

1. 94°C 120 s
2. 94°C 60 s
3. 52°C 60 s
4. 72°C 105 s
5. 2-4 opakovat 29x
6. 72°C 8 min

V případě negativních výsledků byly upravovány nasedací teploty u nested PCR v rozmezí 46-56 °C. Při použití Titanium PCR polymerázy byla nasedací teplota při první PCR 68 °C a při nested PCR byly nasedací teploty upravovány v rozmezí 45-68 °C.

Amplifikace EF2 genu probíhala za těchto podmínek:

První PCR:

1. 94°C 120 s
2. 94°C 45 s
3. 48°C 50 s
4. 72°C 50 s
5. 2-4 opakovat 4x
6. 94°C 45 s
7. 50°C 60 s
8. 72°C 60 s

9. 6-8 opakovat 29x

10. 72°C 10 min

Cykklus pro nested PCR byl shodný s cyklem pro první PCR.

Amplifikace SSU rDNA probíhala za těchto podmínek:

První PCR:

1. 95°C 180 s

2. 94°C 60 s

3. 46°C 60 s

4. 72°C 90 s

5. 2-4 opakovat 29x

6. 72°C 9min

Následná PCR:

1. 95°C 180 s

2. 94°C 60 s

3. 48°C 60 s

4. 72°C 60 s

5. 2-4 opakovat 4x

6. 94°C 60 s

7. 50°C 60 s

8. 72°C 60 s

9. 6-9 opakovat 24x

10. 72°C 10 min

4.2. Gelová elektroforéza

Pro vizualizaci PCR produktů byla používána gelová elektroforéza. Pro přípravu 1% agarózového roztoku bylo smícháno 0,50 g agarózy a 50 ml 0,5x TAE pufru. Po smíchání se roztok nechal projít varem v mikrovlnné toubě a poté se schladil na cca 45°C. Po přidání 3 μ l ethidium bromidu (0,5 μ g/ml) se roztok nalil do vaničky s hřebínky a nechal se ztuhnout při pokojové teplotě cca 30 min. Po ztuhnutí gelu bylo do první jamky nanášeno 4 μ l 1kb DNA markeru a do ostatních 25 μ l vzorku. DNA byla dělena při 70-75 V asi půl hodiny a vizualizována na UV světle. Velikost fragmentů byla porovnávána s DNA markrem a při vhodné velikosti byl fragment vyříznut a vyizolován z gelu.

4.3. Izolace PCR produktu

Izolace PCR produktu se prováděla pomocí kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Postupovalo se dle přiloženého protokolu.

4.4. Ligace

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

Složení reakční směsi o výsledném objemu 5 μ l:

Cloning vector 0,5 μ l

Master Mix ligation 2,5 μ l

PCR produkt 2 μ l

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

4.5. Transformace

Ligační směs se smíchala se 100 μ l kompetentních buněk DH5 α a poté se zkumavka inkubovala 10-20 min na ledu. Následně se zkumavka vložila na 30 s do vodní lázně předehřáté na 42°C a poté na 2 min na led. Po tomto teplotním šoku se ke vzorku přidalo 200 μ l SOC media o pokojové teplotě a zkumavka se dala třepat na 1 hodinu při teplotě 37°C. Po třepání se obsah nanesl na Petriho misky s bakteriální půdou a s X-galem a hokejkou se rovnoměrně rozetřel. Následovala inkubace ve 37°C přes noc (cca 16 hod).

4.6. PCR screening

Z každého vzorku na Petriho misce byly vybrány bílé kolonie buněk, které byly špičkou přeneseny do 1,5 ml mikrozskumavky s 30 μ l sterilizované vody a rozmíchány. Poté byla připravena PCR reakční směs s primery M13F a M13R, které nasedají na plasmidovou DNA a umožňují amplifikaci vloženého PCR produktu. Jako templát sloužily 2 μ l resuspendovaných buněk DH5 α . Byly připravovány negativní kontroly.

Amplifikace probíhala za těchto podmínek:

1. 95°C 10 min
2. 95°C 50 s
3. 52°C 50 s
4. 72°C 60 s
5. 2-4 opakovat 19x
6. 72°C 10 min

Poté se provedla vizualizace pomocí gelové elektroforézy (viz. 3.2 Gelová elektroforéza). Pokud byly přítomny fragmenty o správné délce, přistoupilo se k namnožení plazmidu.

4.7. Namnožení a izolace plazmidu

Pro namnožení bakterií s vektorem nesoucí inzert byla do zkumavky se 3 ml LB media přidána bakteriální suspenze připravená v kapitole 4.6. a 12 μ l ampicilinu. Poté se zkumavky daly třepat přes noc při teplotě 37°C. Izolace plazmidového vektoru se prováděla pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Postupovalo se dle přiloženého protokolu.

4.8. Sekvenace

Sekvenace probíhala v servisní laboratoři genomiky BC AV ČR. Plazmidová DNA byla sekvenována po obou řetězcích pomocí univerzálních primerů M13F a M13R a tzv. vnitřních primerů specifických pro SSU a LSU rDNA (Tab. 3). Standardně byly sekvenovány dva klony jednoho PCR produktu. Sekvenace byla provedena pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM 3130xl.

Tab. 3: Vnitřní primery pro SSU a LSU rDNA.

Název	Sekvence 5' → 3'	Reference
MyxospecR	GGTTTCNCDGRGGGMCCAAC	Fiala 2006
Ameb620F	GCCAGCAGCCGCGGTAATATC	nepublikován
NLF 184	ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT	Van der Auwera a kol. 1994
NLF 1050	AATCGAACCATCTAGTAGCTGG	Bartošová a kol. 2009
NLF 1105	CCGAAGTTTCCCTCAGGATAGC	nepublikován
NLR 1270	TTCATCCCGCATCGCCAGTTC	Bartošová a kol. 2009
NLR 1432	GTTGTTACACACTCCTTAGCGG	Bartošová a kol. 2009
NLR 3113	GTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCT	Van der Auwera a kol. 1994

4.9. Fylogenetická analýza

Částečná sekvenční data ze sekvenátoru byla kompletována v programu SeqMan (DNASTAR) do výsledného sekvenčního kontigu. Z genové banky (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) byly získány dostupné SSU rDNA, LSU rDNA a EF2 sekvence druhů rodu *Ceratomyxa* a vybraných zástupců hlavních mořských skupin myxosporeí. K nim byly přidány získané sekvence a byl sestaven dataset. Jako outgroup byly použity sekvence *Chloromyxum cyprini*, *Henneguya salminicola*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus lentisuturalis*, *Sphaeromyxa zaharoni* a *Zschokkella nova*. Sekvence byly uspořádány v programu MAFFT verze 6.864 (Kato a kol. 2005) metodou L - INS-i. Z alignmentu byly vybrány konzervativní části pomocí programu Gblocks 0.91.b (Castresana 2000) s méně striktními parametry.

Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximální pravděpodobnosti (ML - maximum likelihood) a metodou maximální úspornosti (MP – maximum parsimony). ML analýza byla provedena v programu RAxML 7.0.3. (Stamatakis 2006) za použití modelu GTRGAMMA. Bootstrapové hodnoty byly vypočítány bootstrapovou analýzou s 500ti opakováními. MP byla provedena v programu PAUP 4.0b10 (Swofford a kol. 2001) s heuristickým vyhledáváním a poměrem transicí ku transverzím 1:2. Bootstrapové hodnoty byly stanoveny analýzou s tisíci opakováními. Bayesovská analýza (BI) byla provedena

v programu MrBayes v. 3.0 (Ronquist a Huelsenbeck 2003) pomocí Markovova řetězce za použití GTR + G modelu. Posteriorní pravděpodobnosti byly analyzovány s 1 milionem generací ve dvou nezávislých bězích. Každý stý výsledný strom byl uložen a „burn-in“ byl stanoven na hodnotě 10 000. Ke stanovení hodnoty „burn-in“ byl využit program Tracer v1.5.0 (Rambaut a Drummond 2007).

Fylogenetické stromy byly zobrazeny v programu TreeView 32 (Page 1996) a na úpravu byl použit program Adobe Illustrator 10 CE.

5. Výsledky

Celkem bylo získáno 11 nových LSU rDNA a 10 nových EF2 sekvencí myxosporeí (Tab. 4). Dataset SSU rDNA sekvencí z bakalářské práce (Hlavničková 2010) byl rozšířen o 5 nových sekvencí včetně sekvece *Ceratomyxa* sp. ze střeva *Gasterosteus aculeatus*. Délka alignmentu SSU rDNA je 1485 znaků, LSU rDNA 2096 znaků a EF2 246 znaků. Délka konkatenovaného alignmentu sekvencí SSU a LSU rDNA je 3581 znaků a konkatenovaný alignment všech tří genů má délku 3827 znaků.

Tab. 4: Získané sekvence u jednotlivých vzorků; ● nově získaná sekvence, Bp sekvence získaná v bakalářské práci, GB sekvence získaná z genové banky.

Označení	Myxosporea	SSU rDNA (bp)	LSU rDNA (bp)	EF2 gen (bp)
Cs II	<i>Ceratomyxa shasta</i>	GB	●	●
182	<i>Ceratomyxa</i> sp.	Bp	●	●
295	<i>Ceratomyxa longipes</i>	Bp	●	●
279	<i>Ceratomyxa informis</i>	●	-	-
302	<i>Ceratomyxa arcuata</i>	Bp	●	●
425	<i>Ceratomyxa</i> sp.	Bp	●	●
729	<i>Ceratomyxa appendiculata</i>	Bp	●	●
Cs Ga	<i>Ceratomyxa</i> sp.	●	●	-
LJ1	<i>Ceratomyxa</i> sp.	●	●	●

LJ2	<i>Ceratomyxa</i> sp.	●	●	●
MyxD	<i>Myxodavisia</i> sp.	●	●	●
Pm Ga	<i>Parvicapsula</i> <i>minibicornis</i>	GB	●	●

Výsledný strom získaný fylogenetickou analýzou SSU rDNA je zobrazen na obrázku (Obr. 2). *Ceratomyxa* sp. ze střeva *Gasterosteus aculeatus* (vzorek Cs Ga) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa shasta* s vysokou bootstrapovou podporou. Tyto taxony představují samostatnou lini bez pevného vztahu k jakékoli skupině mořských myxozoí. Nově získané sekvence druhů rodu *Ceratomyxa* a druhu *Myxodavisia* sp. se větví v rámci kladu tvořeného výhradně druhy rodu *Ceratomyxa* a jedním zástupcem rodu *Palliatius*. *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182) se větví samostatně bez blízké příbuznosti ke konkrétnímu druhu. *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa aegyptiaca* se střední bootstrapovou podporou. Jejich nejbližšími příbuznými je skupina tvořená druhy *Ceratomyxa hallettae*, *Ceratomyxa robertsthomsoni*, *Ceratomyxa thalassomae* a *Ceratomyxa gleesoni*. Nejbližšími příbuznými *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) je skupina zahrnující druhy *Ceratomyxa cheilinae*, *Ceratomyxa oxycheilinae*, *Ceratomyxa* sp. (FJ417043) a *Ceratomyxa* sp. z *Aluterus monoceros* (vzorek LJ2). *Ceratomyxa* sp. ze *Synaphobranchus kaupi* (vzorek 425) tvoří sesterský taxon s *Palliatius indecorus* se střední bootstrapovou podporou v ML a MP a s vysokou bootstrapovou podporou v analýze metodou MrBay. Tyto dva druhy spolu s jejich nejbližším příbuzným *Ceratomyxa* sp. (DQ377699) se větví jako bazální taxony. *Ceratomyxa appendiculata* (vzorek 729) je nejbližší příbuzný druhu *Ceratomyxa anko* s vysokou bootstrapovou podporou. *Ceratomyxa* sp. 1 a *Myxodavisia* sp. jsou bazálními taxony této fylogenetické skupiny zahrnující převážně druhy rodu *Ceratomyxa*. *Parvicapsula minibicornis* tvoří sesterský taxon s *Sphaerospora testicularis* s vysokou bootstrapovou podporou.

LSU a EF2 dataset je do počtu taxonů méně rozsáhlý z důvodu absence sekvencí v genové bance. Výsledná topologie stromů je proto ovlivněná tímto faktorem a poloha některých zkoumaných taxonů se liší.

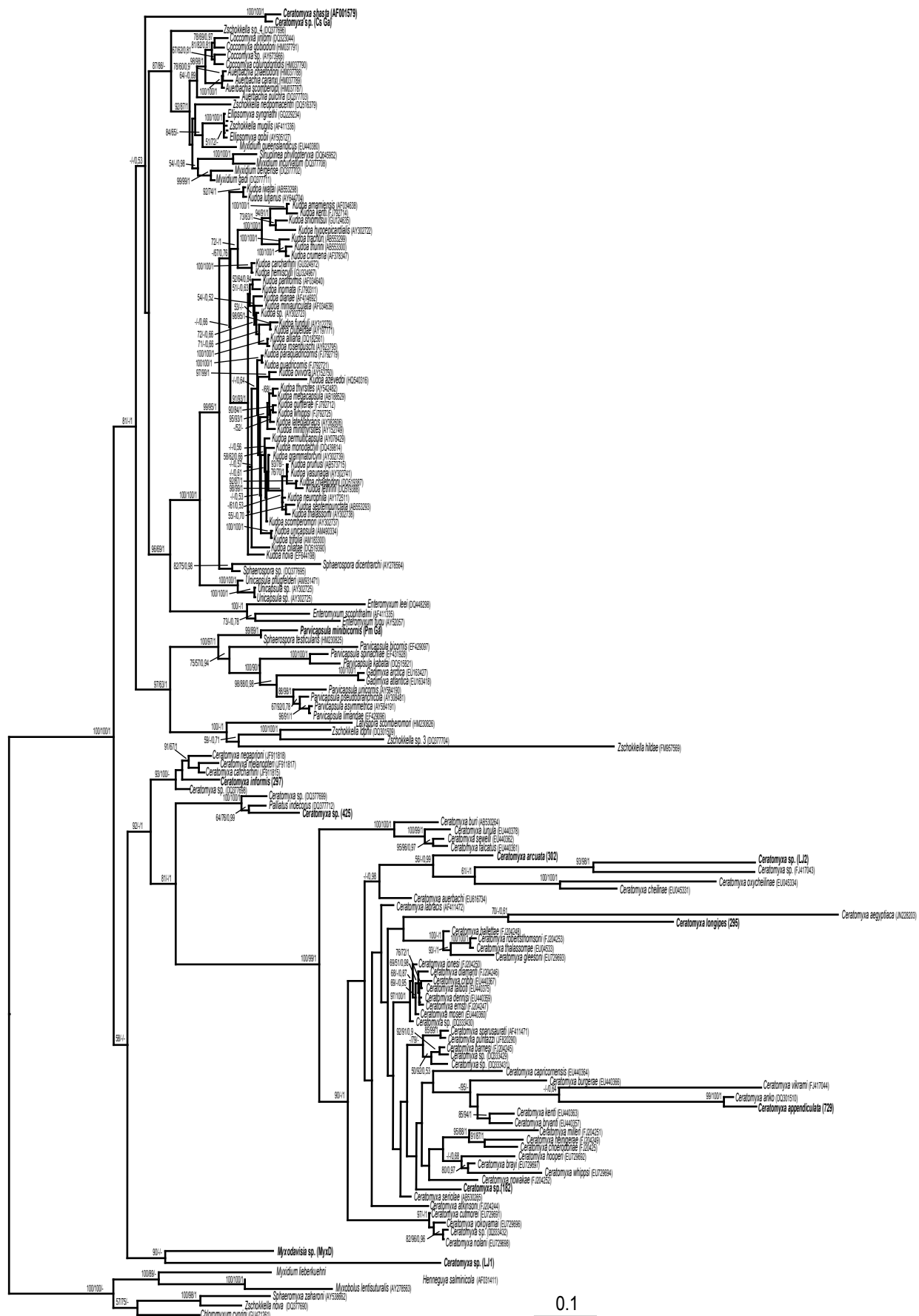
Fylogenetická analýza LSU rDNA sekvencí (Obr. 3) potvrdila větvení druhů *Ceratomyxa shasta* a *Ceratomyxa* sp. z *Gasterosteus aculeatus* (Cs Ga) mimo hlavní skupinu tvořenou druhy rodu *Ceratomyxa*. *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) s maximální podporou bootstrapu. *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) tvoří ve stromě samostatný taxon, tato pozice je podpořena středními hodnotami bootstrapu. *Ceratomyxa* sp. ze *Synaphobranchus kaupi* (vzorek 425) je nejbližší příbuzná dvojici tvořené druhy *Palliatius indecorus* a *Ceratomyxa* sp. (DQ377699) s maximální podporou bootstrapu. *Ceratomyxa appendiculata* (vzorek 729) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa vikrami*, tato pozice je podpořena střední hodnotou bootstrapu v analýzách metodami MP a ML a vysokou hodnotou v analýze metodou MrBay. *Parvicapsula minibicornis* (vzorek Pm Ga) tvoří sesterský taxon *Zschokkella* sp. (FJ417081).

Výsledný strom fylogenetické analýzy konkatenovaných sekvencí SSU a LSU rDNA je zobrazen na obrázku (Obr. 4). *Ceratomyxa shasta* a *Ceratomyxa* sp. z *Gasterosteus aculeatus* (Cs Ga) tvoří sesterský taxon a větví se mimo hlavní skupinu tvořenou druhy rodu *Ceratomyxa*. Pozice analyzovaných sekvencí je obdobná jako v případě analýzy LSU rDNA. *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295). *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) tvoří samostatný taxon. *Ceratomyxa* sp. ze *Synaphobranchus kaupi* (vzorek 425) je nejbližší příbuzná druhu *Palliatius indecorus*. *Ceratomyxa appendiculata* (vzorek 729) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa vikrami*, tato pozice je podpořena vysokou hodnotou bootstrapu v analýzách metodami ML a MrBay a se střední hodnotou v analýze metodou MP. Nejbližším příbuzným *Parvicapsula minibicornis* (vzorek Pm Ga) je *Zschokkella* sp. (FJ417081).

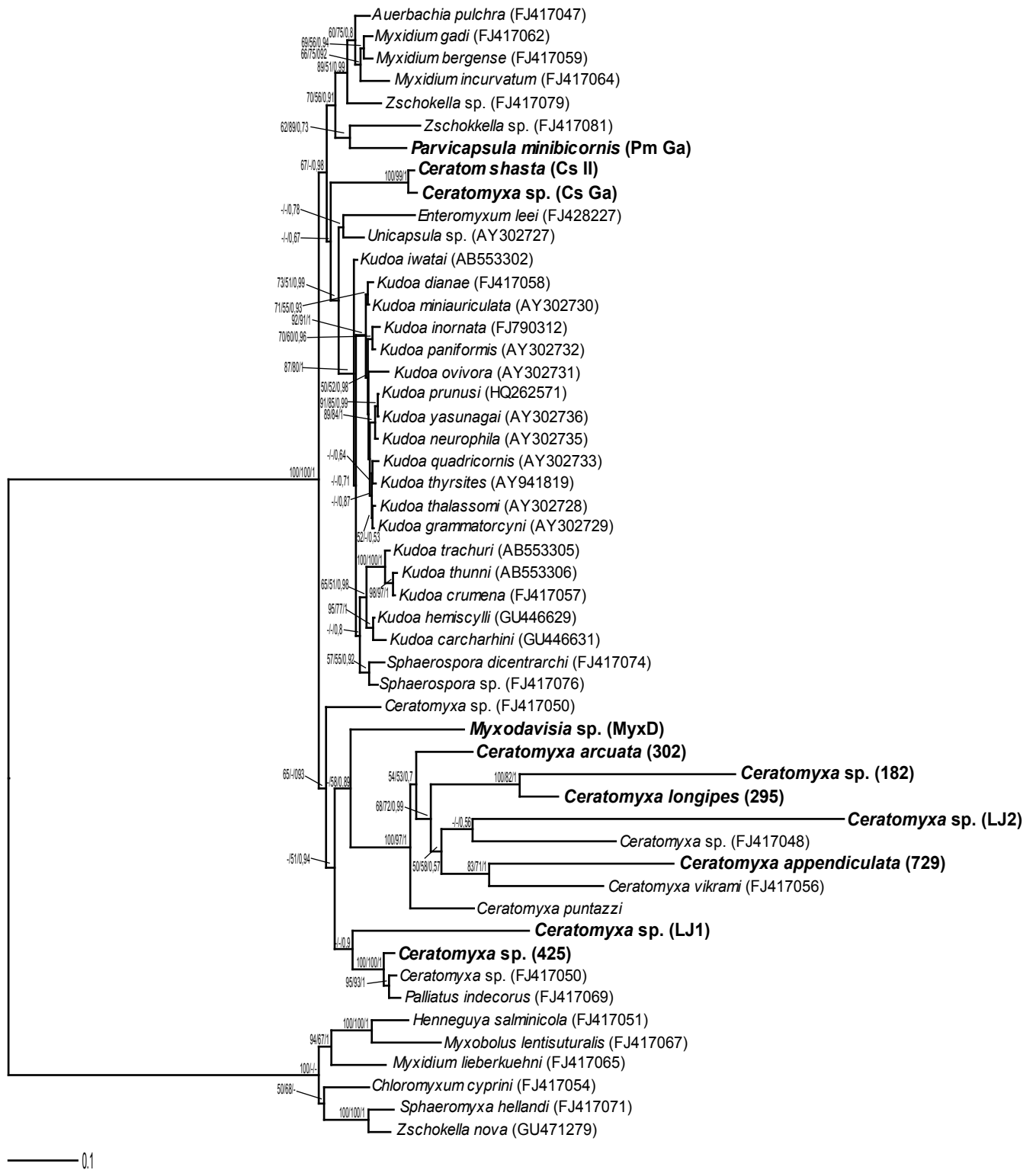
Fylogenetická analýza genu pro elongační faktor 2 (Obr. 5) potvrdila pozici *Ceratomyxa shasta* vně skupiny mořských myxozoí. *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182) se větví samostatně bez blízké příbuznosti ke konkrétnímu druhu. *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa* sp. (LJ2). *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa appendiculata* s maximální bootstrapovou

podporou. *Ceratomyxa* sp. ze *Synaphobranchus kaupi* (vzorek 425) je nejbliže příbuzná druhu *Myxodavisia* a druhu *Ceratomyxa* sp. (LJ1).

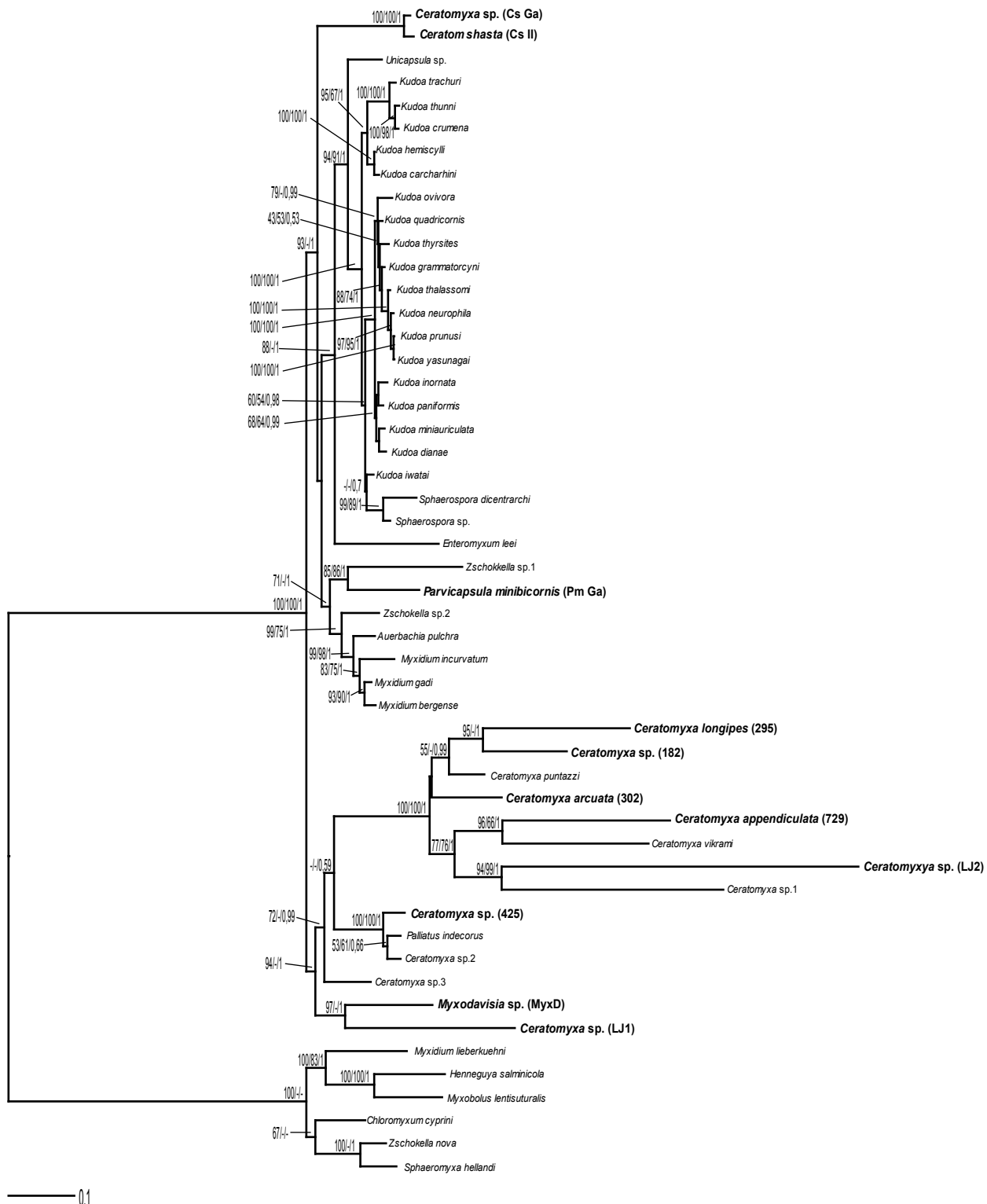
Výsledný strom fylogenetické analýzy konkatenovaných sekvencí EF2 genu a dvou rDNA genů je zobrazen na obrázku (Obr. 6). Pozice *Ceratomyxa shasta* a *Ceratomyxa* sp. z *Gasterosteus aculeatus* (Cs Ga) odpovídá předchozím analýzám, tyto dva druhy tvoří sesterský taxon a větví se mimo hlavní skupinu tvořenou druhy rodu *Ceratomyxa*. *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) s vysokou bootstrapovou podporou. *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) tvoří samostatný taxon. *Ceratomyxa* sp. ze *Synaphobranchus kaupi* (vzorek 425) je nejbliže příbuzná dvojici tvořené druhy *Palliatus indecorus* a *Ceratomyxa* sp. (DQ377699). *Ceratomyxa appendiculata* (vzorek 729) tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa vikrami* s vysokou podporou bootsrapu. *Ceratomyxa* sp. 1 a *Myxodavisia* sp. jsou bazálními taxony studované fylogenetické skupiny.



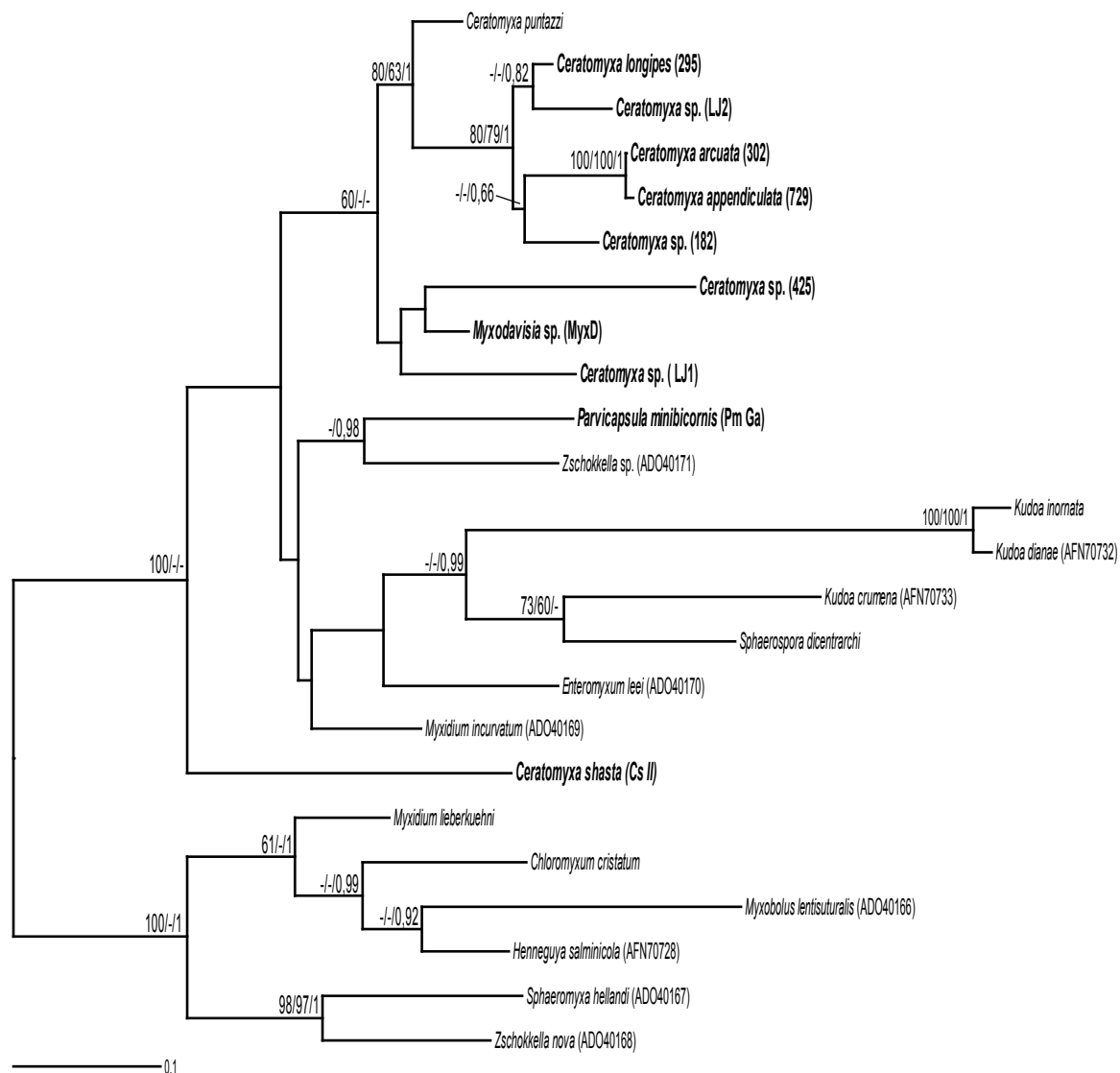
Obř. 2: Fylogenetické vztahy druhů třidy Myxosporea na základě analýzy SSU rDNA sekvencí. Hodnoty bootstrapů ML/MP nad 50% a podpory BI nad 0,5 jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Měřítko délky větvi je uvedeno pod stromem. Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence. Čísła genové banky jsou uvedena v závorkách. Jako outgroup byly použity sekvence *Chloromyxum cyprini*, *Henneguya salminicola*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus lentisuturalis*, *Sphaeromyxa zaharoni* a *Zschokkella nova*



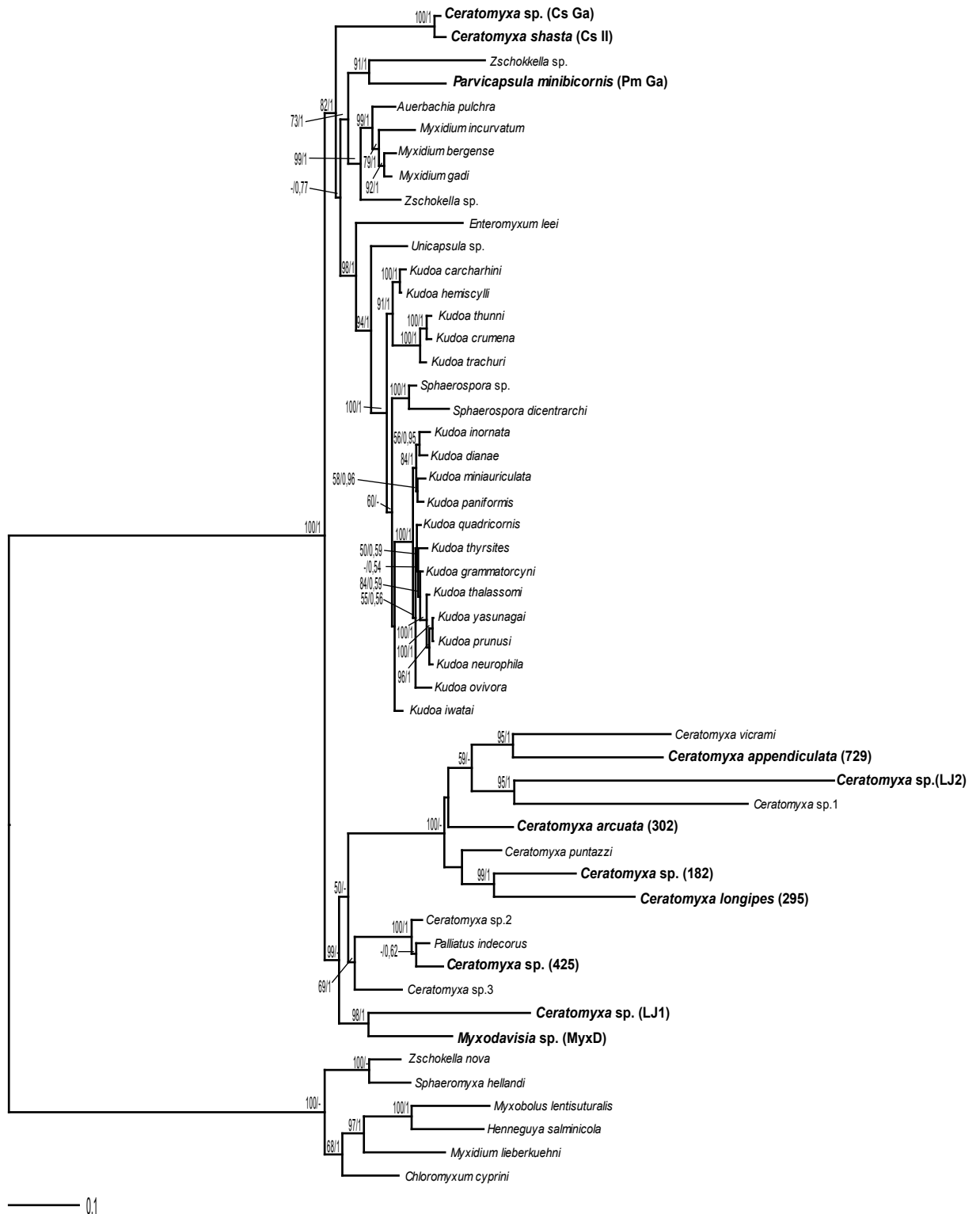
Obř. 3: Fylogenetické vztahy druhů řádu Myxosporea na základě analýzy LSU rDNA sekvencí. Hodnoty bootstrapů ML/MP nad 50% a podpory BI nad 0,5 jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence. Čísła genové banky jsou uvedena v závorkách. Jako outgroup byly použity sekvence *Chloromyxum cyprini*, *Henneguya salminicola*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus lentisuturalis*, *Sphaeromyxa zaharoni* a *Zschokella nova*



Obř. 4: Fylogenetické vztahy druhů třídy Myxosporea na základě analýzy konkatenovaných SSU rDNA a LSU rDNA sekvencí. Hodnoty bootstrapů ML/MP nad 50% a podpory BI nad 0,5 jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence. Jako outgroup byly použity sekvence *Chloromyxum cyprini*, *Henneguya salminicola*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus lentisuturalis*, *Sphaeromyxa zaharoni* a *Zschokella nova*



Obr. 5: Fylogenetické vztahy druhů třídy Myxosporea na základě analýzy genu pro elongační faktor 2. Hodnoty bootstrapů ML/MP nad 50% a podpory BI nad 0,5 jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence. Čísla genové banky jsou uvedena v závorkách. Jako outgroup byly použity sekvence *Chloromyxum cyprini*, *Henneguya salminicola*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus lentisuturalis*, *Sphaeromyxa zaharoni* a *Zschokkella nova*



Obr. 6: **Fylogenetické vztahy druhů třídy Myxosporia na základě analýzy konkatenovaných SSU rDNA, LSU rDNA a EF2 sekvencí. Hodnoty bootstrapů ML nad 50% a podpory BI nad 0,5 jsou uvedeny u jednotlivých uzlů. Měřítka délky větví je uvedeno pod stromem. Tučně jsou zvýrazněny nové získané sekvence. Jako outgroup byly použity sekvence *Chloromyxum cyprini*, *Henneguya salminicola*, *Myxidium lieberkuehni*, *Myxobolus lentisuturalis*, *Sphaeromyxa zaharoni* a *Zschokkella nova***

6. Diskuze

Ve všech provedených analýzách se *Ceratomyxa shasta* větví mimo skupinu zahrnující všechny dosud sekvenované druhy rodu *Ceratomyxa*. To tedy nepodporuje závěry Gunter a Adlard (2008), Gunter a kol. (2009) a Gleeson a Adlard (2011), kteří umisťují *C. shasta* do pozice sesterského taxonu všech *Ceratomyxa* spp. Ve všech analýzách je s menší či větší podporou nodů mořská větev myxosporeí rozdělená na linii vedoucí ke kladu s druhy rodu *Ceratomyxa* a k linii zahrnující zbylá mořská Myxosporea. Zde je pouze stabilní sesterský vztah druhů rodu *Enteromyxum* a kladu zahrnující převážně druhy rodu *Kudoa*. Ostatní vztahy hlavních podskupin mořské větve nejsou stabilní včetně polohy *C. shasta* v souladu s rozdílnými výsledky dříve publikovaných analýz (Fiala 2006, Fiala a Bartošová 2010, Fiala a Dyková 2004, Freeman a kol. 2008, Gunter a Adlard 2009, Heiniger a kol. 2008, Jirků a kol. 2006, 2007, Koie a kol. 2008).

Analýzy konkatenovaných alignmentů podpořily analýzy jednotlivých genů a co je důležité, že zvýšily podporu uzlů, které oddělují skupinu druhů rodu *Ceratomyxa* od ostatních myxosporeí včetně *C. shasta*. Zvýšená podpora uzlů v konkatenovaných analýzách byla také pozorována ve studii Bartošové a kol. 2009, ve které ovšem chyběla sekvence *C. shasta* a druhy rodu *Ceratomyxa* byly zastoupeny pouze čtyřmi zástupci. V současné prezentované konkatenované analýze je v kladu *Ceratomyxa* spp. 14 sekvencí a podpora tohoto klastru se zvýšila z 89/0,83 (SSU analýza, ML/BI Bartošová a kol. 2009) na 94/1.0 (SSU +LSU rDNA, ML/BI) respektive na 99/1.0 (SSU + LSU rDNA + EF2, ML/BI). Vzestup podpory uzlů je i přes zvýšený počet sekvencí v analýze a zvýšený počet nestabilních taxonů, což obecně působí pokles podpory uzlů (Pattengale 2011), tak jako v případě analýzy SSU rDNA se všemi v současnosti dostupnými sekvencemi *Ceratomyxa* spp. Bootstrapová podpora této skupiny je pouze 58% (61 taxonů ve skupině) oproti publikované analýze (Bartošová a kol. 2009) s podporou 89% (5 taxonů ve skupině).

Důležitým faktorem pro přesnější rekonstrukci fylogenetické pozice *C. shasta* je získání sekvence z nově objeveného druhu *Ceratomyxa* sp., který také parazituje ve střevě ryb. Dr. Stephen Atkinson (Oregon State University, USA) bude tento druh popisovat jako druh pro vědu nový, přičemž naší laboratoři poskytl vzorek DNA pro sekvenční analýzu. Fylogenetickou analýzou se potvrdil fakt, že Myxozoa klastrují více podle tkáňové specifity než podle podobnosti v morfologii spor (Holzer a kol. 2004, Fiala 2006). Nový střevní druh se

větvil v blízké příbuznosti s *C. shasta*. Linie myxosporeí infikujících střev s morfologií spor totožnou s druhy rodu *Ceratomyxa* a tedy zařazených do rodu *Ceratomyxa* je od tohoto objevu složená ze dvou taxonů. Středně dlouhá větev linie je tedy „přelomená“ a měla by být méně náchylná pro možné artefakty vznikající při fylogenetických analýzách.

Pouze LSU rDNA analýza podporuje domněnku Fialy a Bartošové (2010), jejíž podstatou je společná evoluce histozoických druhů v rámci mořské větve, tedy druhů rodu *Kudoa* + *Enteromyxum* + *Ceratomyxa shasta*. Podpora uzlů pro tento vztah je ovšem velmi slabá. V případě, že scénář evoluce by neodpovídal výše uvedenému vztahu, vznikla by specifita k parazitismu v tkáních u myxosporeí v rámci mořské linie dvakrát nezávisle. Podobný patern je u sladkovodní větve myxosporeí, ve které je přítomna jedna druhově početná skupina histozoických druhů několika rodů (typicky *Myxobolus* a *Henneguya*).

SSUr DNA a konkatenované analýzy naznačují konkurenční scénář evoluce: z předka mořských myxosporeí se oddělila linie vedoucí k současným druhům rodu *Ceratomyxa* obývajících žlučový měchýř ryb a linie ze které se mezi prvními odštěpil předek současných střevních druhů rodu *Ceratomyxa*. Takovéto hypotetické schéma evoluce je naznačeno v práci Fialy a Bartošové (2010), ale doposud nebylo potvrzeno žádnou fylogenetickou analýzou.

Fylogenetická pozice ostatních druhů rodu *Ceratomyxa* na základě LSU rDNA, které jsem nově získala v předkládané práci je více méně v souladu s SSU rDNA analýzou. Nově získané sekvence druhů rodu *Ceratomyxa* a druhu *Myxodavisia* sp. se větví v rámci kladu tvořeného výhradně druhy rodu *Ceratomyxa* a jedním zástupcem rodu *Palliatius*. Rozdílná je pozice *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182), v analýze na základě SSU rDNA se větví samostatně bez blízké příbuznosti ke konkrétnímu druhu, zatímco v analýze LSU rDNA tvoří sesterský taxon s *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) s vysokou podporou bootstrapu. Na základě SSU rDNA analýzy tvoří *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) sesterský taxon s *Ceratomyxa aegyptiaca* se střední bootstrapovou podporou. Pozice *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) se také liší, v LSU rDNA analýze se větví jako samostatný taxon, pozice je podpořena středními hodnotami bootstrapu, avšak v analýze na základě SSU rDNA je blíže příbuzná skupině zahrnující druhy *Ceratomyxa cheilinae*, *Ceratomyxa oxycheilinae*, *Ceratomyxa* sp. (FJ417043) a *Ceratomyxa* sp. z *Aluterus monoceros* (LJ2), tato pozice má nízkou bootstrapovou podporu. *Parvicapsula minibicornis* (Pa Gm) tvoří v SSU rDNA analýze sesterský taxon s *Sphaerospora testicularis* s vysokou bootstrapovou podporou, avšak v analýze LSU rDNA tvoří sesterský taxon s *Zschokkella* sp. (FJ417081) se střední

bootstrapovou podporou. Odlišnost v topologii stromů je zřejmě způsobená nižším počtem sekvencí v datasetu pro LSU rDNA analýzu.

Pozice nově získaných sekvencí druhů rodu *Ceratomyxa* na základě fylogenetické analýzy konkatenovaných sekvencí SSU a LSU rDNA je téměř totožná s LSU rDNA analýzou. Rozdílné jsou pouze některé hodnoty bootstrapové podpory uzlů. Sesterský taxon *Ceratomyxa* sp. ze *Scorpaena porca* (vzorek 182) a *Ceratomyxa longipes* (vzorek 295) má vysokou bootstrapovou podporu uzlu v LSU rDNA analýze, ovšem v analýze konkatenovaných sekvencí je nízká podpora v případě metody maximální úspornosti (MP). *Ceratomyxa appendiculata* (vzorek 729) tvoří v obou analýzách sesterský taxon s *Ceratomyxa vicrami*, v analýze LSU rDNA je tato pozice podpořena střední hodnotou bootstrapu v analýzách metodami maximální úspornosti (MP) a maximální pravděpodobnosti (ML) a vysokou hodnotou podpory v Bayesovské analýze, zatímco v analýze konkatenovaných sekvencí je stejná pozice podpořena vysokými hodnotami v Bayesovské analýze a analýze ML a se střední hodnotou v analýze metodou MP.

Překvapivá je pozice *Myxodavisia* sp. na bazi kladu *Ceratomyxa* sp. ve všech provedených analýzách, což potvrzuje teorii, že druhy rodu *Myxodavisia* parazitující v žlučovém měchýři nesou znaky podobné druhům rodu *Ceratomyxa* a jsou zřejmě nesprávně taxonomicky zařazeny do svého rodu (Zhao a kol. 2008). Většina druhů rodu *Myxodavisia* jsou parazité močového měchýře ryb a jejich předpokládaná pozice je v rámci skupiny mořských myxosporeí infikující vylučovací soustavu. *Myxodavisia* sp. ze žlučového měchýře je prvním druhem tohoto rodu, jejíž sekvence je známa a potvrzuje zjištění, že tkáňová afinita se mnohem více shoduje s aktuální fylogenezí než s morfologií spor a tedy taxonomií (Kent a kol. 2001, Holzer a kol. 2003, Fiala 2006, Burger a kol. 2007, Gunter a Adlard 2008). Pro vyjasnění vztahů druhů rodu *Myxodavisia* bude nutné získat molekulární data zejména druhů parazitujících v močovém systému ryb.

Zajímavá je pozice *Ceratomyxa informis* (vzorek 297) z *Merlangius merlangus* v analýze SSU rDNA. Větví se jako bazální taxon všech druhů rodu *Ceratomyxa* a klastruje do skupiny tvořené *C. carcharhini*, *C. melanopteri* a *C. negaprioni*, což jsou parazité u podtřídy Elasmobranchii. Tato skupina má spolu s *Ceratomyxa* sp. (DQ377698) z *Scyliorhinus canicula* vysokou bootstrapovou podporu v analýzách metodami ML a MP. Nicméně tuto pozici nemůžeme potvrdit dalšími analýzami, jelikož se nepodařilo získat LSU rDNA sekvenci ani sekvenci pro elongační faktor 2.

Jelikož pozice typového druhu rodu *Ceratomyxa*, *C. sphaerulosa* Thélohan, 1892, není zatím známá, bylo by zatím předčasné měnit zavedenou taxonomii a přerazovat druhy *Ceratomyxa shasta* a *Ceratomyxa* sp. ze stěva *Gasterosteus aculeatus* do nového rodu. Podle Gunter 2009 a Glesona a Adlarda 2011 *C. sphaerulosa*, původně popsaná u dvou žraloků čeledi Triakidae (*Mustelus vulgaris*, *Galeus canis*), bude klastrovat do podskupiny *Ceratomyxa* spp. parazitujících ve žlučovém měchýři u podtřídy Elasmobranchii.

7. Závěr

1. Podařilo se získat LSU rDNA sekvenci i sekvenci pro elongační faktor 2 u druhu *Ceratomyxa shasta* a LSU rDNA a SSU rDNA sekvenci u druhu *Ceratomyxa* sp. ze střeva *Gasterosteus aculeatus*.
2. Celkem bylo získáno 11 LSU rDNA sekvencí, 10 sekvencí pro elongační faktor 2 a dataset SSU rDNA byl rozšířen o sekvence *Ceratomyxa* sp. ze střeva *Gasterosteus aculeatus*, 2 sekvence *Ceratomyxa* sp. (LJ1, LJ2) z *Aluterus monoceros*, sekvenci z *C. informis* a *Myxodavisia* sp.
3. Ve všech provedených fylogenetických analýzách se *Ceratomyxa shasta* větví mimo skupinu zahrnující všechny dosud sekvenované druhy rodu *Ceratomyxa*.
4. Nový druh *Ceratomyxa* sp. ze střeva *Gasterosteus aculeatus* se větvil v blízké příbuznosti *C. shasta*.
5. SSU rDNA a konkatenované analýzy naznačují scénář evoluce, který zatím nebyl potvrzen žádnou fylogenetickou analýzou: z předka mořských myxosporeí se oddělila linie vedoucí k současným druhům rodu *Ceratomyxa* obývajících žlučový měchýř ryb a linie ze které se mezi prvními odštěpil předek současných střevních druhů rodu *Ceratomyxa*.
6. Fylogenetická pozice ostatních druhů rodu *Ceratomyxa* se v jednotlivých analýzách výrazně neliší.
7. *Myxodavisia* sp. klastruje na bázi kladu *Ceratomyxa* sp. ve všech provedených analýzách a může představovat původní morfotyp předků rodu *Ceratomyxa*.
8. *Ceratomyxa informis* (vzorek 297) z *Merlangius merlangus* se v analýze SSU rDNA větví jako jeden z bazálních taxonů všech druhů rodu *Ceratomyxa* a klastruje do skupiny tvořené druhy parazitujícími u podtřídy Elasmobranchii.

8. Seznam literatury

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

ANDERSON C. L., CANNING E. U., OKAMURA B. 1998: A triploblast origin for Myxozoa? *Nature*, 392: 346 – 347.

ANDREE K. B., SZEKELY C., MOLNAR K., GRESOVIAC S. J., HEDRICK R. P. 1999: Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvulidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology*, 85: 68–74.

ARTHUR J. R., LOM J. 1985: *Sphaerospora araii* n. sp. (Myxosporea: Sphaerosporidae) from the kidney of a longnose skate (*Raja rhina* Jordan and Gilbert) from the Pacific Ocean off Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 63: 2902–2906.

ATKINSON S. D., BARTHOLOMEW J. L. 2010: Disparate infection patterns of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) correlate with internal transcribed spacer 1 sequence variation in the parasite. *International Journal for Parasitology*, 40 (5): 599–604.

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

BARTHOLOMEW J. L., ATKINSON S. D., HALLETT S. L., LOWENSTINE L. J., GARNER M. M., GARDINER CH. H., RIDEOUT B. A., KEEL M. K., BROWN J. D. 2008: Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology*, 38: 1199 – 1207.

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

BARTHOLOMEW J. L., WHIPPLE M. J., STEVENS D. G., FRYER J. L. 1997: The life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, requires a freshwater polychaete as an alternate host. *Parasitology*, 83: 859–868.

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

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

BURGER M. A. A., CRIBB T. H., ADLARD R. D., 2007: Patterns of relatedness in the Kudoidae with descriptions of *Kudoa chaetodoni* n. sp. and *K. lethrini* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida). *Parasitology*, 134: 669–681.

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

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

CANNING E. U., OKAMURA B. 2004: Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology*, 56: 44-131.

CASTRESANA J. 2000: Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 540 – 552.

DESSER S. S., LOM J., DYKOVÁ I. 1986: Development stages of *Sphaerospora ohlmacheri* (Myxozoa: Myxosporea) in the renal tubules of bullfrog tadpoles, *Rana catesbeiana*, from Lake of Two Rivers, Algonquin Park, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 64: 2213–2217.

DIAMANT A., LOM J., DYKOVA I. 1994: *Myxidium leeii* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus-aurata*. *Diseases of Aquatic Organism*, 20: 137-141.

DIAMANT A., WHIPPS C. M., KENT M. L. 2004: A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: morphology, ultrastructure, and phylogeny. *Journal of Parasitology*, 90: 1434–1442.

DOFLEIN F. 1899: Fortschritte auf dem Gebiete der Myxosporidienkunde. Zusammenfassende Uebersicht. *Zoologischeskii zhurnal*, 6: 361-379.

DOGIEL V. A. 1948: [Parasitic protozoa of fishes from Peter the Great Bay.] *Izvestiya Vsesoyuznogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Ozernogo i Rechnogo Rybnogo Khozyaistva*, 27: 17–66 (in Russian).

DYKOVÁ I., TYML T., FIALA I., LOM J. 2007: New data on *Sorycimyxum fegati* (Myxozoa) including analysis of its phylogenetic position inferred from the SSU rRNA gene sequence. *Folia Parasitologica*, 54: 272 – 276.

EIRAS J. C. 2005: An overview on the myxosporean parasites in amphibians and reptiles. *Acta Parasitologica*, 50: 267 – 275.

EVANS N. M., HOLDER M. T., BARBEITOS M. S., OKAMURA B., CARTWRIGHT P. 2010: The phylogenetic position of Myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 2733–2746.

FIALA I. 2006: The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36: 1521 – 1534.

FIALA I., BARTOŠOVÁ P. 2010: History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 228.

FIALA I., DYKOVÁ I. 2004: The phylogeny of marine and freshwater species of the genus *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxosporea: Bivalvulida) based on small subunit ribosomal RNA sequences. *Folia Parasitologica*, 51: 211 – 214

FREEMAN M. A., YOKOYAMA H., OGAWA K. 2008: Description and phylogeny of *Ceratomyxa anko* sp. n. and *Zschokkella lophii* sp. n. from the Japanese anglerfish, *Lophius litulon* (Jordan). *Journal of Fish Diseases*, 31: 921–930.

FRIEDRICH C., INGOLIC E., FREITAG B., KASTBERGER G., HOHMANN V., SKOTFITSCH G., NEUMEISTER U., KEPKA O. 2000: A myxozoan- like parasite causing xenomas in the brain of the mole *Talpa europia* L., 1758. *Parasitology*, 121:483-492.

FUJITA T. 1923: Studies on Myxosporidia of Japan. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido, Imperial University, Japan*, 10: 191–248.

GLEESON R., ADLARD R. D. 2011: Morphological and genetic analysis of three new species of *Ceratomyxa* The'lohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea) from carcharhinid sharks off Australia. *Systematic Parasitology*, 80:117–124.

GUNTER N. L., ADLARD R. D. 2008: Bivalvulidan (Myxozoa: Myxosporea) parasites of damselfishes with description of twelve novel species from Australia's Great Barrier Reef. *Parasitology*, 135: 1165–1178.

GUNTER N. L., ADLARD R. D. 2009: Seven new species of *Ceratomyxa* from the gall bladders of serranids from the Great Barrier Reef, Australia. *Systematic parasitology*, 73: 1-11.

GUNTER N. L., ADLARD R. 2010: The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Kōie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). *Systematic parasitology*, 75: 81 – 104.

GUNTER N. L., WHIPPS C. M., ADLARD R. D. 2009: *Ceratomyxa* (Myxozoa: Bivalvulida) parasites of damselfishes with description of twelve novel species from Australia's Great Barrier Reef. *Parasitology*, 135:1165-1178.

HARTIGAN A., FIALA I., DYKOVA I., ROSE K., PHALEN D. N., ŠLAPETA J. 2012: New species of Myxosporea from frogs and resurrection of the genus *Cystodiscus* Lutz, 1889 for species with myxospores in gallbladders of amphibians. *Parasitology*, 139: 478 – 496.

HASHIMOTO T., NAKAMURA Y., KAMAISHI T., NAKAMURA F., ADACHI J., OKAMOTO K., HASEGAWA M. 1995: Phylogenetic place of mitochondrial-lacking protozoan, *Giardia lamblia* inferred from amino-acid sequences of elongation factor 2. *Molecular Biology and Evolution*, 12(5):782-793.

HEDRICK R. P., EL-MATBOULI M., ADKISON M. A. a MACCONNELL E. 1998: Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews*, 166:365-376.

HEDRICK R. P., McCONNELL E., DE KINKELIN P. 1993: Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3: 277–290.

HEINIGER H., GUNTER N. L., ADLARD R. D. 2008: Relationships between four novel ceratomyxid parasites from the gall bladders of labrid fishes from Heron Island, Australia. *Parasitology International*, 57: 158–165.

HLAVNIČKOVÁ M. 2010: Fylogenetické vztahy druhů čeledi Ceratomyxidae (Myxozoa). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Bakalářská práce.

HOFFMASTER J. L., SANDERS J. E., ROHOVEC J. S., FRYER J. L., STEVENS D. G. 1988: Geographic distribution of the myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950, in the Columbia River basin, USA. *Journal of Fish Diseases*, 11: 97–100.

HOLLAND J. W., OKAMURA B., HARTIKAINEN H., SECOMBES C. J. 2011: A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278: 546–553.

HOLZER A. S., SOMMERVILLE CH., WOOTTEN R. 2003: Tracing the route of *Sphaerospora truttae* from the entry locus to the target organ of the host, *Salmo salar* L., using an optimized and specific in situ hybridization technique, *Journal of Fish Diseases*, 26: 647–655.

HOLZER A. S., SOMMERVILLE CH., WOOTTEN R. 2004: Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 34: 1099 – 1111.

HOLZER A.S., WOOTTEN R., SOMMERVILLE C. 2007: The secondary structure of the unusually long 18S ribosomal RNA of the myxozoan *Sphaerospora truttae* and structural evolutionary trends in the Myxozoa. *International Journal for Parasitology*, 37: 1281 – 1295.

IBARRA A. M., GALL G. A. E., HEDRICK R. P. 1991: Susceptibility of two strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to experimentally induced infections with the myxosporean *Ceratomyxa shasta*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10: 191–194.

IKEDA J. 1912: Studies on some sporozan parasites of sipunculoids. I. The life history of new *Actinomyxidian*, *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. *Archiv für Protistenkunde*, 25:240-242.

JAMESON A. P. 1929: Myxosporidia from Californian fishes. *Journal of Parasitology*, 16: 59-68.

JIMENEZ-GURI E., PHILLIPPE H., OKAMURA B., HOLLAND P. W. H. 2007: *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. *Science*, 317: 116-118.

JIRKŮ M., BOLEK M. G., WHIPPS C. M., JANOVY J. J. R., KENT M. L., MODRÝ D. 2006: A new species of *Myxidium* (Myxosporea: Myxidiidae), from the western chorus frog, *Pseudacris triseriata triseriata*, and Blanchard's cricket frog, *Acris crepitans blanchardi* (Hylidae), from Eastern Nebraska: morphology, phylogeny, and critical comments on amphibian *Myxidium* taxonomy. *Journal of Parasitology*, 92: 611-619.

JIRKŮ M., FIALA I., MODRÝ D. 2007: Tracing the genus *Sphaerospora*: a case of the *Sphaerospora ranae* (Morelle, 1929) n. comb. (Myxosporea, Sphaerosporidae), renal myxosporean from the European frogs of the genus *Rana* – rediscovery, redescription, phylogeny and emendation of the genus *Sphaerospora*. *Parasitology*, 134: 1727-1739.

JONES S., PROSPERI-PORTA G., DAWE S., TAYLOR K., GOH B. 2004: *Parvicapsula minibicornis* in anadromous sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and Coho (*Oncorhynchus kisutch*) salmon from tributaries of the Columbia river. *Journal of Parasitology*, 90: 882–885.

KATOH K., KUMA K., TOH H., MIYATA T. 2005: MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33: 511 – 518.

KENT M. L., ANDREE K. B., BARTHOLOMEW J. L., EL-MATBOULI M., DESSER S. S., DELVIN R. H., FEIST S. W., HEDRICK R. P., HOFFMANN R. W., KHATTRA J., HALLET S. L., LESTER R. J. G., LONGSHAW L., PALENZUALA O., SIDDALL M. E., XIAO C. 2001: Recent Advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 395-413.

KENT M. L., KHATTRA J., HEDRICK R. P., DEVLIN R. H. 2000: *Tetracapsula renicola* n. sp. (Myxozoa: Saccosporidae); the PKX myxozoan – the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *Journal of Parasitology*, 86:103–111.

KOVALEVA A. A. 1988: Suborder *Sphaeromyxina* (Myxosporea, Bivalvulida) its structure and placement in myxosporean system. *Zoologicheskii zhurnal*, 67: 1616-1620. (In Russian with English summary).

KØIE M. 2003: *Ellipsomyxa gobii* gen. et sp. n. (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) from Denmark. *Folia Parasitologica*, 50: 269–271.

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

KUDO R. R. 1933: A taxonomic consideration of Myxosporidia. *Transactions of the American Microscopical Society*, 52: 195-216.

LANDSBERG J. H., LOM J. 1991: Taxonomy of the genera of the Myxobolus/Myxosoma group (Myxobolidae: Myxosporea), current listing of species and revision of synonyms. *Systematic Parasitology*, 18: 165–186.

LOM J., DYKOVÁ I. 1992: Protozoan parasite of fish. Elsevier, 187:275-281.

LOM J., DYKOVÁ I. 2006: Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53: 1-36.

LOM J., NOBLE E. R. 1984: Revised classification of the myxosporea Bütschli (1881). *Folia Parasitologica*, 31:93-205.

MATSUKANE Y., SATO H., TANAKA S., KAMATA Y., SUGITA-KONISHI Y. 2010: *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitology Research*, 107: 865-72.

MORRIS D. J. 2010: Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma. *Proceedings of Royal Society of Biological sciences*, 277: 2565 – 2570.

NEHRING R. B., WALKER P. G. 1996: Whirling disease in the wild: the new reality in the Intermountain West. *Fischeries (Bethesda)*, 21: 28-32.

NICKUM D. 1999: Whirling disease in the United States: a summary of progress in research and management. Trout Unlimited, Arlington, Virginia.

OKAMURA B., CURRY A., WOOD T. S., CANNING E. U. 2002: Ultrastructure of *Buddenbrockia* identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa. *Parasitology*, 124: 215 – 223.

PAGE R. D. M. 1996: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357 – 358.

PATTENGALE N. D., ABERER A. J., SWENSON K. M., STAMATAKIS A., MORET B. M. 2011: Uncovering hidden phylogenetic consensus in large data sets. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 8(4): 902-11.

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

RAMBAUT A., DRUMMOND A. J. 2007: Tracer v1.4, available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

RIGOS G., KATHARIOS P. 2010: Pathological obstacles of newly introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20:47–70.

RONQUIST F., HUELSENBECK J. P. 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180.

SALIM K. Y., DESSER S. S., 2000. Descriptions and phylogenetic systematics of *Myxobolus* spp. from cyprinids in Algonquin Park, Ontario. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 309–318.

SIDDALL M. E., MARTIN D. S., BRIDGE D., DESSER S. S., CONE D. K. 1995: The demise of a phylum of protists: phylogeny of myxozoan and other parasitic Cnidaria. *Journal of Parasitology*, 81: 961–967.

SIDDALL M. E., WHITING M. F. 1999: Long-branch abstractions. *Cladistics*, 15: 9–24.

SCHLEGEL M., LOM J., STECHMANN A., BERNHARD D., LEIPE D., DYKOVÁ I., SOGIN M.L. 1996: Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde*, 147: 1–9.

SMOTHERS J. F., VON DOHLEN C. D., SMITH JR. L. H. a SPALL R. D. 1994: Molecular evidence that the myxozoan protist are metazoans, *Science*, 265: 1719-1721.

STAMATAKIS A. 2006: RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688 – 2690.

SWOFFORD D. L. 2001: PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), Version 4.0b8. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

THÉLOHAN P. 1892: Observations sur les myxosporidies et assai de classification de ces organismes. *Bulletin de la Société Philomathique de Paris*. 4:165-178.

THÉLOHAN P. 1895: Recherches sur les Myxosporidies. *Bulletin scientifique de la France et de la Belgique*, 26:100-394.

UDEY L. R., FRYER J. L., PILCHER K. S. 1975: Relation of water temperature to ceratomyxosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 32: 1545–1551.

VAN DER AUWERA G., CHAPELLE S., DE WACHTER R., 1994: Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the oomycetes. FEBS Letters. 338: 133–136.

VINCENT E. R. 1996: Whirling disease and wild trout: the Montana experience. Fisheries (Bethesda), 21:32–34.

WHIPPS C. M., GROSSEL G., ADLARD R. D., YOKOYAMA H., BRYANT M. S., MUNDAY B. L., KENT M. L. 2004: Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporidia) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. Journal of Parasitology, 90: 618–622.

WOLF K., MARKIWI M. E. 1984: Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science, 225: 1449 – 1452.

YANAGIDA T., SAMESHIA M., NASU H. 2006: Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp. (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). Journal of Fish Diseases, 29:561-567.

YANAGIDA T., YOKOYAMA H., PALENZUELA O. 2008: Myxosporean emaciation disease of cultured Red Sea Bream *Pagrus major* and spotted Knifejaw *Oplegnathus punctatus*. Fish Pathology, 48:45-48.

YASUDA H., OYAMA T., NAKAMURA A. 2005: Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathology, 40:175-180.

YOKOYAMA H., WHIPPS C. M., KENT M. L., MIZUNO K., KAWAKAMI H. 2004: Post-mortem myoliquefaction caused by *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Multivalvulida) from

Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass. *Fish Pathology*, 39: 79–85.

ZHAO Y. J., SONG W. B. 2003: Myxosporea in marine fishes in the Yellow Sea and Bohai Sea. In W. Song, Y. Zhao, K. Xu, X. Hu, & J. Gong (Eds) *Pathogenic protozoa in mariculture*. Beijing: Science Press, pp. 217–224 (in Chinese).

ZHAO Y., ZHOU Y., KENT M. L., WHIPPS C. M., 2008: Replacement of the preoccupied name *Davisia* Laird 1953, and description of a new myxozoan species (Myxosporea: Sinuolineidae) from *Sebastiscus marmoratus* (Cuvier, 1829) in the East China Sea. *Journal of Parasitology*, 94: 269–279.

ZINN J. L., JOHNSON K. A., SANDERS J. E., FRYER J. L. 1977: Susceptibility of salmonid species and hatchery strains of chinook salmon (*Oncorhynchus Tshawytscha*) to infections by *Ceratomyxa Shasta*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34: 933-936.

ZRZAVÝ J., HYPŠA V. 2003: Myxozoa, Polypodium, and the origin of the Bilateria: the phylogenetic position of 'Endocnidozoa' in light of the rediscovery of *Buddenbrockia*. *Cladistics*, 19: 164–169.